

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И
МИКРООРГАНИЗМОВ – ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ
ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА
«САРАТОВСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

профессор, доктор биологических наук

Никитина Валентина Евгеньевна

Саратов – 2026

ВВЕДЕНИЕ	10
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ГЛАВА 1. МОРФОГЕНЕЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ	19
1.1 Молекулярно-генетические аспекты биологии развития базидиомицетов	19
1.2 Изучение некоторых аспектов морфогенеза базидиомицетов с помощью методов высокопроизводительного секвенирования	22
1.3 Молекулярно-генетические исследования и транскриптомное профилирование немодельных организмов, на примере базидиомицета <i>L. edodes</i>	26
1.3.1 Характеристики транскриптома <i>de novo</i> вегетативного мицелия	27
1.3.2 Характеристика транскриптов, связанных с происхождением грибного аромата плодовых тел	29
1.3.3 Характеристика транскриптов, связанных с деградацией лигноцеллюлозных субстратов	29
1.3.4 Транскриптомные изменения, происходящие в грибных клетках после сбора урожая плодовых тел	31
1.3.5 Транскриптомные изменения и молекулярные механизмы, лежащие в основе генетики плодоношения	33
1.3.6 Транскриптомные изменения, происходящие при дифференциации дикариотического мицелия в примордии	38
1.3.7 Транскриптомные изменения, происходящие при светоиндуцированном образовании коричневой мицелиальной пленки и плодовых тел	39
1.4 Генетический механизм реакции <i>L. edodes</i> на температурный стресс	42
1.5 Молекулярные механизмы, лежащие в основе токсического действия и накопления тяжелых металлов	45
1.6 Заключительные замечания	47
ГЛАВА 2. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ	48
2.1 Базидиальные макромицеты как источник биологически активных и лекарственных соединений	48
2.2 Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства грибных метаболитов	49
2.3 Изучение противоопухолевой и иммуномодулирующей активности полисахаридов лекарственных базидиомицетов	51
2.4 Изучение противоопухолевой и иммуномодулирующей активности вторичных метаболитов лекарственных базидиомицетов	60

2.4.1	Изучение активности тритерпеноидов ланостанового типа (кислот, альдегидов, спиртов) лекарственных базидиомицетов	61
2.4.2	Изучение активности стероидов лекарственных базидиомицетов	66
2.4.3	Другие биологически активные низкомолекулярные соединения лекарственных базидиомицетов	67
2.5	Изучение противоопухолевой и иммуномодулирующей активности гликопротеинов лекарственных базидиомицетов	70
2.6	Заключительные замечания	72
ГЛАВА 3. «ЗЕЛЕНый» СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ, ОПОСРЕДОВАНный ГРИБАМИ		74
3.1	Способы получения наночастиц	74
3.2	Микосинтез наночастиц серебра	77
3.2.1	Грибы, восстанавливающие ионы серебра с образованием наночастиц	77
3.2.2	Условия получения и параметры микогенных наночастиц серебра	82
3.2.3	Свойства и применение микогенных наночастиц серебра	83
3.3	Микосинтез наночастиц золота	83
3.3.1	Грибы, восстанавливающие ионы золота с образованием наночастиц	83
3.3.2	Условия получения и параметры микогенных наночастиц золота	86
3.3.3	Свойства и применение микогенных наночастиц золота	87
3.4	Микосинтез наночастиц селена	88
3.4.1	Грибы, восстанавливающие ионы селена с образованием наночастиц	88
3.4.2	Условия получения и параметры микогенных наночастиц селена	91
3.4.3	Свойства и применение микогенных наночастиц селена	93
3.4.4	Микосинтез наночастиц оксида селена (SeO ₂)	94
3.5	Механизмы биологического «зеленого» синтеза наночастиц	95
3.6	Преимущества синтеза наночастиц с помощью грибов и перспективы применения микогенных наночастиц	96
3.7	Заключительные замечания	99
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ		
ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ		101
4.1	Объекты исследований и методы культивирования	101
4.2	Методы микроскопии	102
4.2.1	Приготовление проб для световой и электронной микроскопии	102
4.2.2	Анализ образцов методом световой микроскопии	103

4.2.3	Анализ ультраструктуры грибных клеток методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)	103
4.2.4	ПЭМ и дифракции электронов в выбранной области (SAED)	103
4.2.5	Характеристика наночастиц	104
4.3	Рентгеновская флуоресценция и рентгенофазовый анализ	104
4.4	Ультрафиолетовая (UV-vis) спектроскопия	105
4.5	Динамическое светорассеяние (фотонная корреляционная спектроскопия)	105
4.6	Определение общего содержания белков, углеводов и пигментов	105
4.7	Выделение, очистка и характеристика полисахаридов и гликопротеинов	106
4.7.1	Получение суммарной фракции водорастворимых полисахаридов	106
4.7.2	Получение суммарной фракции экзо-и эндогликопротеинов	106
4.7.3	Определение кинематической вязкости растворов гликополимеров	106
4.7.4	Определение состава углеводов экзо- и эндополисахаридов	106
4.7.5	Определение химической структуры фракций полисахаридов	107
4.7.6	Получение белковых экстрактов	107
4.7.7	Фракционирование гликопротеинов методом гель-хроматографии	108
4.7.8	Очистка белков методом ионообменной хроматографии	108
4.7.9	Исследование белкового состава и визуализация гликопротеинов	108
4.7.10	Специфическое окрашивание гелей для визуализации ферментов	108
4.8	Определение активности ферментов на разных стадиях онтогенеза базидиомицетов	109
4.8.1	Определение активности хитиназ, амилаз, инвертаз, ксиланаз и целлюлаз по реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой	109
4.8.2	Определение активности α -, β -галактозидаз и α -, β -глюкозидаз	111
4.8.3	Определение активности протеазы	112
4.8.4	Определение активности пектатлиазы	113
4.8.5	Определение активности ферментов лигнинолитического комплекса (Mn-пероксидаз, лигнин пероксидаз и лакказ) ксилотрофных базидиомицетов	113
4.8.6	Определение активности тирозиназы	113
4.9	Определение активности и углеводной специфичности лектинов	114
4.10	Транскриптомное профилирование немодельных организмов (на разных стадиях онтогенеза <i>L. edodes</i>), алгоритм для физиологической интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования (Illumina HiSeq 2500)	114
4.10.1	Выделение РНК, подготовка библиотек и их секвенирование	114

4.10.2	Оценка качества и сортировка прочтений	114
4.10.3	Сборка и сортировка транскриптов, проверка качества сборки, аннотация и классификация транскриптов	115
4.10.4	Выравнивание прочтений на транскрипты <i>L. edodes</i> , поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ)	115
4.10.5	Классификация ДЭГ по метаболическим путям, визуализация результатов	116
4.11	Выделение РНК и синтез кДНК при помощи реакции обратной транскрипции в реальном времени (ПЦР-РВ)	116
4.12	Аmplification участков ДНК базидиомицетов с помощью ПЦР-РВ	117
4.13	Определение цитотоксичности гликопротеинов и полисахаридов базидиомицетов <i>L. edodes</i> , <i>G. frondosa</i> и <i>G. lucidum</i>	119
4.13.1	Культуры клеток млекопитающих	119
4.13.2	Оценка цитотоксичности <i>in vitro</i> фракций гликопротеинов и полисахаридов на клеточных линиях млекопитающих	119
4.13.3	Цитоморфометрические исследования раковых клеток	120
4.14	Противоопухолевая активность гликопротеинов <i>L. edodes</i> , <i>G. frondosa</i> и <i>G. lucidum</i>	121
4.14.1	Определение <i>in vivo</i> противоопухолевой активности фракций водорастворимых гликопротеинов в отношении рака почки РА	121
4.14.2	Цитоморфометрические исследования опухолевых тканей и структурных изменений в органах лабораторных животных	122
4.14.3	Исследование морфометрии опухолевых клеток с помощью автоматизированной микроскопической системы «Agiol»	122
4.15	Изучение цитотоксичности биогенных наночастиц Au^0 и Ag^0	122
4.16	Реактивы и материалы	123
4.17	Статистическая обработка результатов	124
ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА БАЗИДИАЛЬНЫХ МАКРОМИЦЕТОВ		125
5.1	Особенности морфогенеза базидиомицетов <i>P. ostreatus</i> , <i>A. mellea</i> , <i>L. edodes</i> , <i>G. frondosa</i> и <i>G. lucidum</i>	125
5.2	Микроскопические исследования особенностей роста мицелия и строения клеток на разных стадиях развития базидиомицетов	131
5.2.1	Исследование структуры гиф методом световой микроскопии	131
5.2.2	Исследование ультраструктурного строения клеток на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов методом ПЭМ	138
5.2.3	Исследование ультраструктуры клеточной стенки гиф на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов методом ПЭМ	142

5.3	Характеристика содержания белков и углеводов в клетках базидиальных макромицетов на разных стадиях морфогенеза	146
5.4	Характеристика содержания пигментов (меланинов) в клетках базидиальных макромицетов на разных стадиях морфогенеза	148
5.5	Сравнительный анализ активности ключевых ферментных систем в мицелиальных пленках <i>A. mellea</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>L. edodes</i> , <i>G. lucidum</i> и <i>G. frondosa</i> с оценкой предполагаемых функций в онтогенезе базидиомицетов	150
5.6	Гемагглютинирующая активность на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов <i>P. ostreatus</i> , <i>A. mellea</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. frondosa</i> и <i>L. edodes</i>	159
5.7	Транскриптомное профилирование немодельных организмов, на примере <i>L. edodes</i> , алгоритм для физиологической интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2500	161
5.7.1	Первичный анализ, селекция прочтений и сборка транскриптов <i>L. edodes</i>	162
5.7.2	Аннотация собранных <i>de novo</i> транскриптов <i>L. edodes</i>	164
5.7.3	Выявление ДЭГ на разных стадиях онтогенеза <i>L. edodes</i>	169
5.7.4	Классификация ДЭГ по функциональным категориям с использованием базы данных KEGG и их визуализация	171
5.7.5	Общий анализ активации/репрессии функциональных групп генов с использованием базы данных KOG	203
5.7.6	Классификация ДЭГ по функциональным категориям с использованием базы данных Gene Ontology (GO) на стадиях непигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки <i>L. edodes</i>	210
5.7.7	Классификация ДЭГ по функциональным категориям с использованием web-ресурса BioСус на стадиях непигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки <i>L. edodes</i>	213
5.8	Верификация данных транскриптомного профилирования	215
5.8.1	ДЭГ, кодирующие ферменты хитиназы, хитинсинтазы, глюканазы и глюкансинтазы в зависимости от стадии онтогенеза <i>L. edodes</i>	215
5.8.2	Динамика экспрессии генов хитиназы (<i>chi</i>) и глюканазы (<i>exg</i>)	220
5.8.3	Динамика активности ферментов хитиназ и эндоглюканаз на разных стадиях онтогенеза базидомицета <i>L. edodes</i>	221
5.8.4	ДЭГ, кодирующие ферменты лигнинолитического комплекса	222
5.8.5	Динамика активности ферментов Mn-пероксидаз и лигнин пероксидаз	224
5.8.6	Динамика экспрессии генов лакказы (<i>lcc</i>) и тирозиназы (<i>tyr</i>)	224
5.8.7	Динамика активности ферментов фенолоксидаз на разных стадиях онтогенеза базидомицета <i>L. edodes</i>	225
5.8.8	Состав комплекса фенолоксидаз на разных стадиях онтогенеза <i>L. edodes</i>	226

5.8.9	Динамика активности гена специфического фактора транскрипции (<i>exp</i>) в процессе цитодифференцировки и плодообразования <i>L. edodes</i>	227
5.8.10	ДЭГ, кодирующие ферменты амилазы и инвертазы	229
5.8.11	ДЭГ, кодирующие ферменты пектатлиазы и протеазы	231
5.8.12	ДЭГ, кодирующие ферменты ксиланазы/целлюлазы/экзоглюканазы	234
5.8.13	ДЭГ, кодирующие ферменты галактозидазы и глюкозидазы	235
5.8.14	ДЭГ, кодирующие углеводсвязывающие гликопротеины (лектины)	237
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ, ПОЛИСАХАРИДНЫХ ФРАКЦИЙ И ОТДЕЛЬНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ГЛУБИННОГО МИЦЕЛИЯ И ПЛОДОВЫХ ТЕЛ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ		241
6.1	Характеристика метаболитов гликопротеиновой природы базидиомицета <i>L. edodes</i> в условиях глубинного и поверхностного культивирования	242
6.1.1	Растворимость эндо- и экзогликополимеров <i>L. edodes</i>	242
6.1.2	Определение вязкости и угла вращения гликополимеров <i>L. edodes</i>	243
6.1.3	Углеводный и аминокислотный состав экзо- и эндогликопротеинов <i>L. edodes</i>	243
6.1.4	Характеристика внутриклеточных лектинов разных морфоструктур <i>L. edodes</i>	244
6.1.5	ИК-спектроскопия препаратов гликопротеинов. Определение структуры и конфигурации экзо- и эндогликопротеинов	246
6.1.6	Периодатное окисление полисахаридов базидиомицета <i>L. edodes</i>	247
6.2	Цитотоксичность гликопротеиновых и полисахаридных фракций из глубинного мицелия <i>L. edodes</i>	248
6.3	Микроскопическая оценка метаболической активности раковых клеток при воздействии гликопротеинов и полисахаридов глубинного мицелия <i>L. edodes</i>	251
6.4	Апоптотические морфологические особенности клеток глиомы крысы (C6), подвергнутые воздействию гликопротеинов <i>L. edodes</i>	253
6.5	Цитотоксичность гликопротеиновых и полисахаридных фракций из глубинного мицелия лекарственных трутовиков <i>G. frondosa</i> и <i>G. lucidum</i>	253
6.6	Микроскопическая оценка метаболической активности раковых клеток при воздействии гликопротеинов и полисахаридов глубинного мицелия <i>G. frondosa</i> и <i>G. lucidum</i>	259
6.7	Ингибирование метаболической активности раковых клеточных линий HeLa и C6 очищенными белковыми препаратами из глубинного мицелия <i>G. frondosa</i> и <i>G. lucidum</i>	261
6.8	Цитотоксичность, белковый и субъединичный состав отдельных гликопротеиновых фракций из глубинного мицелия <i>L. edodes</i> после ионообменной хроматографии	263

6.9	Микроскопическая оценка метаболической активности раковых клеток при воздействии очищенных фракций гликопротеинов из глубинного мицелия <i>L. edodes</i>	265
6.10	Гемагглютинирующая активность и углеводная специфичность лектинов глубинного мицелия <i>L. edodes</i> из гликопротеиновых фракций, обладающих высокой цитотоксической активностью	267
6.11	Сравнительный анализ транскриптомов на разных стадиях онтогенеза <i>L. edodes</i> для выявления ДЭГ, входящих в функциональную категорию вторичных метаболитов	270
6.12	Сравнительный анализ цитотоксичности гликопротеинов коричневой мицелиальной пленки и непигментированного мицелия <i>L. edodes</i>	274
6.13	Сравнительный анализ цитотоксичности гликопротеинов вегетативного мицелия и плодовых тел <i>G. lucidum</i>	275
6.14	Сравнительный анализ цитотоксичности гликопротеинов и полисахаридов вегетативного мицелия и плодовых тел <i>L. edodes</i>	276
6.15	Изменение объема и массы опухоли рака почки (РА) под действием гликопротеинов глубинного мицелия и плодовых тел базидиомицетов	277
6.16	Гистологические исследования опухолевых тканей рака почки (РА) под действием гликопротеинов глубинного мицелия и плодовых тел базидиомицетов	279
6.17	Исследование морфометрии опухолевых клеток с применением автоматизированной микроскопической системы «Ariol»	282
6.18	Изучение действия гликопротеиновых фракций глубинного мицелия <i>L. edodes</i> , <i>G. frondosa</i> и <i>G. lucidum</i> на иммунную и пищеварительную системы животных <i>in vivo</i>	282
	ГЛАВА 7. БИОЛОГИЧЕСКИЙ «ЗЕЛЕНый» СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА, СЕРЕБРА И СЕЛЕНА ПОЧВЕННЫМИ И КСИЛОТРОФНЫМИ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ	286
7.1	Влияние ионов золота, серебра и селена на рост ксилотрофных и почвенных базидиомицетов при твердофазном выращивании	287
7.2	Влияние ионов золота, серебра и селена на рост и накопление биомассы ксилотрофных и почвенных базидиомицетов при глубинном выращивании	291
7.3	Биоредукция соединений HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 ксилотрофными базидиомицетами <i>L. edodes</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. frondosa</i> с образованием наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 , условия восстановления, характеристика и локализация	297
7.3.1	Образование наночастиц золота ксилотрофными базидиомицетами. ПЭМ	297
7.3.2	Образование наночастиц серебра ксилотрофными базидиомицетами. ПЭМ	301
7.3.3	Образование наночастиц селена ксилотрофными базидиомицетами. ПЭМ	302
7.4	Исследование наночастиц золота, серебра и селена в среде культивирования ксилотрофных базидиомицетов методом рентгеновской флуоресценции	303

7.5	Характеристика наночастиц с помощью электронно-спектроскопического изображения (ESI) и спектроскопии энергетических потерь электронов (EELS)	304
7.6	Биоредукция соединений HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 почвенными базидиомицетами <i>A. arvensis</i> и <i>A. bisporus</i> с образованием наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 , условия восстановления, характеристика и локализация	306
7.6.1	Образование наночастиц золота почвенными базидиомицетами. ПЭМ	306
7.6.2	Образование наночастиц серебра почвенными базидиомицетами. ПЭМ	307
7.6.3	Образование наночастиц селена почвенными базидиомицетами. ПЭМ	307
7.7	Исследование наночастиц золота, серебра и селена в среде культивирования почвенных базидиомицетов методом рентгеновской флуоресценции	308
7.8	Восстановление ионов металлов и металлоидов внеклеточными и внутриклеточными экстрактами ксилотрофных и почвенных базидиомицетов	309
7.8.1	Восстановление ионов Au^0 , Ag^0 и Se^0 внеклеточными и внутриклеточными экстрактами ксилотрофных базидиомицетов. ПЭМ	310
7.8.2	Восстановление ионов Au^0 , Ag^0 и Se^0 внеклеточными и внутриклеточными экстрактами почвенных базидиомицетов. ПЭМ	312
7.9	Фенолоксидазы ксилотрофных <i>L. edodes</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. frondosa</i> и почвенных <i>A. arvensis</i> , <i>A. bisporus</i> базидиомицетов, активность и участие в биоредукции соединений металлов	315
7.10	Синтез наночастиц с помощью грибных фенолоксиляющих ферментов и его возможный механизм	317
7.11	Синтез наночастиц с помощью внутриклеточных экстрактов из разных морфоструктур базидиомицетов	322
7.12	Характеристика наночастиц золота, серебра и селена, биообразованных при помощи микосинтеза	324
7.13	Исследование наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 с помощью методов динамического светорассеяния, рентгеновской флуоресценции, рентгенофазового анализа и дифракции электронов в выбранной области SAED	331
7.14	Изучение цитотоксичности биогенных наночастиц Au^0 и Ag^0	334
7.15	Способ получения наночастиц благородных металлов (Au^0 , Ag^0) с заданными свойствами и условия влияния на их параметры	336
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	343
	ВЫВОДЫ	345
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	346
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	349
	ПРИЛОЖЕНИЯ	418

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Онтогенез базидиальных макромицетов представляет собой сложный многогранный комплекс событий, затрагивающий физиологические, структурные, генетические, метаболические процессы, происходящие в клетках, отражение которых проявляется в изменении транскрипционного профиля, цитодифференцировке, морфообразовании, биосинтезе метаболитов. Это важная в научном и практическом отношении область микологии, и несмотря на активизацию работ в этом направлении в последнее время, еще многое предстоит узнать (Pelkmans *et al.*, 2016).

Молекулярно-физиологические аспекты роста и развития многих базидиальных макромицетов до сих пор изучены недостаточно, исследования жизненного цикла проведены чаще всего на немногих модельных видах, ограниченном круге вопросов, которые нередко носили разрозненный характер. Исследования по выявлению генов, связанных с морфогенезом, проводили на базидиомицете *Coprinopsis cinerea* (Moore, 1998; Kües, 2000). Гидрофобины, играющие важную роль во многих морфогенетических процессах, включая спороношение и развитие плодовых тел, изучались у модельного гриба *Schizophyllum commune* (Wösten, 2001; Van Wetter *et al.*, 2002). Формирование дикариона и регуляция плодоношения генами типа спаривания изучалась на примере *C. cinerea* и *S. commune* (Vaillancourt *et al.*, 1997; Kamada, 2002; Kües *et al.*, 2002). С развитием методов геномного анализа стало возможным выявить сложную организацию и понять функцию локусов спаривания A и B у базидиомицетов. Показана центральная роль регуляторного белка Ras, который связывает рост, сигнализацию феромонов, половое развитие и мейоз с различными путями передачи сигналов (Knabe *et al.*, 2013). Для более простых видов грибов истощение питательных веществ часто необходимо и достаточно для начала полового размножения. Пути, вызванные голоданием, хорошо изучены у *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*, где ключевые роли играют GPCRs, Ras, cAMP-зависимые пути и MAPK (Böttcher *et al.*, 2016; Conrad *et al.*, 2014). Регулирование транскрипции при воздействии света осуществляет белковый комплекс WCC (White Collar Complex), принцип работы которого был подробно описан для *Neurospora crassa* и *Alternaria alternata* (Bayram and Bayram, 2023; Schuhmacher *et al.*, 2024).

Предположительно можно экстраполировать информацию от более простых организмов к базидиальным макромицетам, однако программы развития у последних могут включать гораздо больше внутренних и внешних решений. Кроме того, проводимые исследования практически не затрагивали характерные стадии онтогенеза базидиомицетов, и происходящие в них процессы, образование которых необходимо для последующего перехода к плодоношению.

Последние полтора десятилетия характеризуются стремительным накоплением геномных и транскриптомных данных, развитие методов транскриптомного профилирования переводит исследования по молекулярной биологии и генетики на качественно новый уровень,

позволяя изучать полный набор транскриптов, синтезируемых в клетке или организме при определенных условиях. Опираясь на накопленные знания по биологии и генетике грибов, а также данные полногеномного секвенирования, становится возможным идентифицировать, сравнивать и количественно оценивать уровни экспрессии сотен различных генов, что важно для понимания молекулярных механизмов морфогенеза грибов (Ohm *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015; Sipos *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021; Marian *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2023).

На момент начала данной работы, исследования по секвенированию немодельных организмов с аннотацией данных, носили единичный характер. Первые попытки полногеномного секвенирования *de novo* вегетативного мицелия *L. edodes*, были представлены практически без аннотации, и для характеристики генома информации, по мнению самих авторов, было недостаточно (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 базидиальных макромицетов и механизмов формирования плодовых тел, наряду с фундаментальной значимостью, представляет интерес и для решения прикладных задач и, несомненно, может повлиять на коммерческое производство экономически ценных грибных культур. Потенциал грибов в плане получения высокоэффективных биологически активных и лекарственных препаратов огромен, и в настоящее время это направление набирает популярность. Макромицеты содержат спектр разнообразных биологически активных соединений, которые представляют собой обширный и все же в значительной степени неосвоенный источник новых мощных фармацевтических продуктов. В качестве ценного сырья для получения эффективных метаболитов используют в основном полисахаридные фракции и терпеноиды плодовых тел макромицетов (Krasnopol'skaya *et al.*, 2005; Wasser, 2014; Chaturvedi *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2023). Гораздо менее изучены гликопротеиновые соединения и метаболиты низкомолекулярной природы вегетативного мицелия базидиомицетов.

Также грибные метаболиты, живые культуры, биомасса, экстракты, клеточные фракции и культуральные среды могут быть использованы в «зеленом» синтезе наночастиц (Adebayo *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). Нанотехнологии и наноматериалы являются быстро развивающимися областями, которые вносят большой вклад в развитие современных технологий в здравоохранении, биомедицине, пищевой и химической промышленности, оптике, охране окружающей среды и многих других (Sharma *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2016). В настоящее время повышенное внимание уделяется экологической безопасности, истощаемости природных ресурсов и безопасности для здоровья человека. Данные тенденции привели к росту развития «зеленых» технологий производства наночастиц методами биологического синтеза (Grasso *et al.*, 2020; Saravanan *et al.*, 2021). Использование базидиомицетов и их метаболитов

является перспективным, простым и экологически чистым методом для наносинтеза. Преимуществом грибов по сравнению с другими организмами является их способность продуцировать широкий спектр биологически активных соединений. Они обладают набором мощных ферментативных систем, благодаря которым способны образовывать наночастицы различных химических элементов, переводить ионы тяжелых металлов и других микроэлементов в менее токсичные формы и накапливать их в больших количествах как внутри мицелия, так и вне клетки. Несомненной помощью для идентификации генов, связанных с синтезом биологически активных соединений, будет транскриптомный анализ базидиомицетов.

Таким образом, очевидна актуальность исследований молекулярно-физиологических аспектов онтогенеза съедобных и лекарственных грибов. Особое внимание необходимо уделить характерным стадиям, образование которых предшествует и необходимо для перехода к плодоношению. Приоритетно выявление противоопухолевых и иммуностимулирующих метаболитов, содержащихся в мицелии. Необходимы исследования по углублению знаний о «зеленом» синтезе наночастиц с помощью грибов и оптимизации наносинтеза для изготовления наночастиц с желаемыми свойствами. Результаты исследований могут быть учтены при промышленном выращивании плодовых тел, разработках и оптимизации получения мицелия, биологически активных метаболитов медицинского назначения, а также применимых в наносинтезе и других процессах, представляющих большой биотехнологический потенциал.

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

Основные задачи исследования:

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. Впервые, с применением технологий высокопроизводительного секвенирования, охарактеризованы особенности метаболизма *L. edodes* на разных этапах развития. Сравнительный анализ транскриптомов непигментированного мицелия, коричневой мицелиальной пленки, примordia и плодового тела позволил выявить перестройку метаболических путей и различия в целом ряде физиологических процессов в ходе онтогенеза базидиомицета.

Получены новые данные по динамике активности ряда ключевых ферментных систем: лиаз (пектатлиаз), гидролаз (пептидаз), гликозил-гидролаз (амилаз, инвертаз, хитиназ, ксиланаз, целлюлаз, эндоглюканаз, α -, β -глюкозидаз и α -, β -галактозидаз), а также оксидоредуктаз (лакказ, тирозиназ, лигнин пероксидаз, Mn-пероксидаз), входящих в состав целлюлозолитического, лигнинолитического комплексов базидиомицетов и принимающих участие в биогенезе клеточной стенки высших грибов, а также лектинов в процессе онтогенеза *P. ostreatus*, *A. mellea*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*.

Микроскопические исследования показали существенные изменения и особенности морфологии, цитодифференцировки и ультраструктуры клеток мицелия 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 биологически активных метаболитов, как в плодовом теле, так и в мицелии. Впервые выявлено достоверное снижение метаболической активности ряда раковых клеточных линий млекопитающих (A549, Hep-2, HeLa, SPEV-2, C6 и рак почки PA) под действием водорастворимых внутриклеточных гликопротеинов из глубинного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, не уступающих по активности полисахаридам плодовых тел, а в некоторых случаях (линия C6) значительно их превосходящих.

Получены новые данные о способности базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum*, *A. bisporus* и *A. arvensis*, их мицелиальных экстрактов, культуральных жидкостей 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 съедобного и лекарственного 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 и цитотоксической активности внутриклеточных гликопротеинов из мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* в отношении ряда раковых клеточных линий млекопитающих, 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 до элементного состояния с образованием наночастиц с помощью экстрактов и отдельных метаболитов (фенолоксиляющих ферментов) ксилотрофных и почвенных 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 проведении общеобразовательных лекций и экскурсий в организациях биологического и биотехнологического профиля. Материалы диссертационной работы внедрены в производственную практику грибоводческих хозяйств.

Методология и методы исследований. В диссертации использованы современные методы: молекулярно-генетические методы применялись для проведения высокопроизводительного секвенирования и изучения экспрессии генов; биоинформатический анализ использован для обработки и интерпретации данных транскриптомного профилирования; биохимические методы применялись для выделения и очистки белков и полисахаридов, определения активности ферментов и лектинов; с помощью световой, конфокальной и электронной микроскопии изучались ультраструктура клеток грибов, цитоморфометрия опухолевых тканей и структурные изменения в органах лабораторных животных, а также характеристика наночастиц.

Основные 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 Мп-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: «Гликопротеины и биогенные низкомолекулярные соединения в жизнедеятельности бактерий и грибов» (№ 01200606184), «Физиолого-биохимические показатели адаптационных процессов у бактерий и грибов» (№ 01201359054), «Изучение гликопротеинов и низкомолекулярных физиологически активных метаболитов в адаптации и коммуникации бактерий и грибов» (№ АААА-А17-117102740098-8), «Структура, функции и иммунохимический анализ физиологически активных метаболитов про- и эукариотов в условиях адаптации и процессе их коммуникаций» (№ 121031100266-3) и «Структурно-функциональные особенности коммуникативных взаимоотношений про- и эукариотов и их взаимодействий с биорецепторами» (№ 1022040700963-8).

Часть исследований по характеристике грибных гликополимеров выполнена совместно с сотрудниками Института микробиологии НАН Беларуси, Минск. Анализ ультраструктуры грибных клеток на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов проводили на базе лаборатории микроскопии КИББ КазНЦ РАН, Казань. Часть исследований по характеристике наночастиц была проведена совместно с сотрудниками кафедры общей и неорганической химии Института химии СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Саратов. Проведение экспериментов *in vivo* по изучению противоопухолевой активности проводили совместно с сотрудниками кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России. На базе лаборатории экстремальной биологии Казанского Федерального Университета на платформе Illumina HiSeq 2500 осуществляли определение нуклеотидных последовательностей библиотек кДНК; совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной биологии КИББ КазНЦ РАН проводили анализ транскриптомов базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза. Изучение некоторых морфолого-культуральных признаков базидиальных макромицетов в процессе культивирования проводилось совместно с сотрудниками производственно-коммерческого предприятия «Сантана», Саратов. Большинство исследований выполнено на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ ФИЦ СарНЦ РАН, Саратов.

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 10-04-09357_моб_з (Беларусь, Минск, 2010), № 11-04-09253-моб_з (Prague, Czech Republic, 2011), № 11-04-00000-моб_з_рос (Москва, 2011), № 11-04-90811-моб_ст «Протеомный и транскриптомный анализ экспрессии генов и синтеза белков, принимающих участие в морфогенетическом развитии лекарственных базидиомицетов», (Казань, 2011), № 12-04-90828-моб_нр_рос «Исследование морфологии и цитологии грибных гиф и базидиом лекарственных базидиомицетов в процессе морфогенетического развития с помощью лазерной сканирующей конфокальной и электронной

просвечивающей микроскопии» (Казань, 2012), № 16-34-50025 мол_нр «Механизмы ферментативного синтеза наночастиц металлов и металлоидов у почвенных и ксилотрофных базидиомицетов» (Москва, 2016), № 15-04-02926_А «Изучение транскриптомных, протеомных и ультраструктурных перестроек в процессе морфогенеза съедобных лекарственных культивируемых базидиомицетов» (Саратов-Казань, 2015-2017); грантом Корпорации «Сибирское здоровье» «Биологический синтез наночастиц различной химической природы культурами лекарственных базидиомицетов» (Саратов, 2012-2013) и грантом поддержки молодых ученых компании ОПТЭК «Biological synthesis of nanoparticles of various chemical natures by edible cultivated medicinal xylotrophic basidiomycetes belonging to various systematic groups» (Саратов, 2013-2014).

Личный вклад автора. Все результаты, представленные в диссертации, получены лично соискателем или при его непосредственном участии в период с 2009 по 2025 г. Автору принадлежит выбор направления исследований, разработка задач и методических подходов, получение экспериментальных данных, анализ и обсуждение материала, оформление и обобщение полученных результатов. Научные положения диссертации и выводы базируются на собственных исследованиях автора. В работах, проведенных в соавторстве с коллегами из других организаций, личный вклад автора заключался в постановке задачи, в непосредственном участии и руководстве при проведении экспериментов, в обсуждении полученных результатов и оформлении их в виде публикаций. 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 и обсуждены на **18 российских конференциях**: I и II Междисциплинарный микологический форум с международным участием (Москва, 2009, 2010), Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» (Москва, 2009), V, VI, VII, VIII Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2009, 2010, 2011, 2012), V, VI, VII Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010, 2012, 2016), III, IV, V Съезд микологов России «Современная микология в России» (Москва, 2012, 2017, 2022), I и II Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология», I Всероссийская научная школа молодых

ученых «Сложные углеводы: биохимия, основы формирования надмолекулярных структур и практические аспекты применения в биологии и медицине» (Казань, 2012, Саратов, 2014), III Всероссийская молодежная конференция с участием иностранных ученых «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» (Новосибирск, 2014), 1-й Российский Микробиологический конгресс (Москва, 2017) и **25 международных конференциях**: 11-я международная конференция «Экосистемы, Организмы, Инновации» (Москва, 2009), VII Международная научная конференция «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Беларусь, Минск, 2010), International Conference «Ecology of soil microorganisms» (Prague, Czech Republic, 2011), International Conference «Microbiological solutions for the modern agricultural challenges» (St. Petersburg, Russia, 2011), Международная школа–конференция «Перспективные технологии для современного сельскохозяйственного производства» (Санкт-Петербург–Пушкин, 2011), III Международный симпозиум «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011), II(X) Международная Ботаническая Конференция молодых ученых (Санкт-Петербург, 2012), Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2013), Международная выставка-конференция «Биоиндустрия-2013» в рамках Петербургского международного форума здоровья (Санкт-Петербург, 2013), Международный микологический конгресс «Успехи медицинской микологии» (Москва, 2014), III Международный микологический форум (Москва, 2015), Международная научно-практическая конференция «Вавиловские чтения», (Саратов, 2015., 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2022, 2024), Юбилейная конференция по микологии и микробиологии (Москва, 2018, 2023), III Международная научная конференция PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Санкт-Петербург, 2022), IV Международный Микологический Форум (Москва, 2024), V Международная научно-практическая конференция «Проектирование здоровья: стратегии и практики инноваций» (Саратов, 2024), Мемориальная конференция по микологии (Москва, 2025).

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.

ГЛАВА 1. МОРФОГЕНЕЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

1.1. Молекулярно-генетические аспекты биологии развития базидиомицетов

Морфогенез базидиомицетов, смена форм и стадий развития – это многоуровневый динамичный процесс, происходящий на внутриклеточном и межклеточном уровне в процессе жизненного цикла или под воздействием различных внешних факторов, предполагающий молекулярно-генетические, морфологические, физиологические, ультраструктурные изменения и клеточную дифференцировку. Это интересная и многогранная тема для исследований и, несмотря на активное изучение данного процесса на протяжении последних десятилетий, еще очень многое предстоит узнать. Формирование дикариотического мицелия и образование плодовых тел представляют собой чрезвычайно сложные программы развития, которые активируются сочетанием факторов окружающей среды и регулируются / координируются широким спектром белков. С идентификацией первых генов, участвующих в развитии грибов, мы находимся лишь в начале понимания процесса формирования плодовых тел (Pelkmans *et al.*, 2016).

Первые попытки объединить накопленные знания по физиологии, структуре, биохимии и молекулярно-генетическим аспектам биологии развития грибов предпринял Дэвид Мур в книге «Грибной морфогенез». Автор рассматривает широкий спектр тем, связанных с морфогенезом, обращает внимание на широкое биологическое значение грибов и предлагает идеи, которые могут стать основой для будущих исследований (Moore, 1998). Генетические основы формирования плодовых тел начали изучаться в конце 20 века, и открытие функций генов в основном основывалось на анализе естественных или лабораторно созданных мутантов. Исследования по выявлению генов, связанных с морфогенезом, проводились на модельных системах, например на базидиомицете *Coprinopsis cinerea* (Moore, 1981; Moore and Pukkila, 1985). Работы по изучению жизненного цикла и стадиям развития *C. cinerea* были систематизированы и продолжены в исследованиях Урсулы Кюес (Kües, 2000). Описаны монокариотический и дикариотический мицелий, процесс формирования плодовых тел и стадий покоя гриба – склероции, оидии, хламидоспоры. С помощью методов мутантной комплементации и ПЦР-анализа было идентифицировано несколько генов, участвующих в процессах кариогамии и мейоза. Среди высоко экспрессирующихся генов в плодовом теле, обнаружены гены двух β -галактозоспецифичных лектинов, которые, вероятно, необходимы для гифальной агрегации (Kües, 2000).

Важную роль во многих морфогенетических процессах, включая спороношение и развитие плодовых тел, играют гидрофобины. Данные белки участвуют в прикреплении гиф к гидрофобным поверхностям, что может служить сигналом для определенных процессов развития (Wessels *et al.*, 1991). Гидрофобное покрытие направляет рост гиф в воздух, позволяет рассеивать

споры и обеспечивает газообмен в плодовых телах (Wösten, 2001). Было установлено, что у модельного базидиомицета *Schizophyllum commune* ген гидрофобина SC3 экспрессируется как в монокариотическом, так и в дикариотическом мицелии. Белок SC3 снижает поверхностное натяжение воды, покрывает воздушные гифы гидрофобным слоем и опосредует прикрепление гиф к гидрофобным поверхностям. Гидрофобин SC4, специфичный только для дикарионов, выстилает газовые каналы внутри плодовых тел гидрофобной мембраной, предотвращая их заполнение водой во влажных условиях и обеспечивая непрерывный газообмен (Van Wetter *et al.*, 2002). Интересно, что белки SC3 и SC4 имели активность, похожую на лектиновую, хотя и с разной углеводной специфичностью. Эта особенность может быть важна для определения силы прикрепления гидрофобной мембраны к гидрофильной клеточной стенке (Van Wetter *et al.*, 2002).

Формирование дикариона и образование плодовых тел у базидиомицетов регулируются генами типа спаривания. Эти гены кодируют ДНК-связывающие белки, феромоны и их рецепторы. Регуляция плодоношения генами типа спаривания осуществляется нижестоящими транскрипционными факторами. Основные молекулярные механизмы были изучены на модельных агарикомицетах *C. cinerea* и *S. commune* (Vaillancourt *et al.*, 1997; Kamada, 2002; Kües *et al.*, 2002). Половое развитие грибов осуществляется под контролем двух локусов спаривания – А и В. Было установлено, что гены локуса спаривания А кодируют факторы транскрипции гомеодоменного типа, которые индуцируют дифференцировку клеток, запуская каскады генов, необходимых для морфогенеза грибов. Гены локуса спаривания В кодируют феромон-рецепторную систему, функция которой может быть связана с обменом и миграцией ядер между клетками (Raudaskoski, 1998). С развитием методов геномного анализа стало возможным выявить сложную организацию и понять функцию локусов спаривания А и В у базидиомицетов. В настоящее время идентифицировано несколько генов, кодирующих такие регуляторные белки. Структура локуса типа спаривания А содержит как минимум три пары генов, каждая из которых кодирует по одному члену семейства гомеодоменных белков HD1 и HD2. Также идентифицированы предполагаемые компоненты феромон-зависимых сигнальных путей, индукция которых приводит к развитию дикариотического мицелия, образованию мейоспор и формированию плодовых тел. Показана центральная роль регуляторного белка Ras, который связывает рост, сигнализацию феромонов, половое развитие и мейоз с различными путями передачи сигналов (Knabe *et al.*, 2013). Проводятся исследования направленные на определении роли гетеротримерных G-белков, играющих ключевую роль в передаче сигналов в клетках, компонентов митогенно-активируемой каскад протеинкиназы и циклических АМР-зависимых путей. Прогнозируется феромон-зависимая сигнализация через мономерные малые GTP-азы, потенциально контролирующие перестройку цитоскелета, необходимую для ядерного обмена и миграции во время спаривания (Zarnack *et al.*, 2008; Raudaskoski and Kothe, 2010).

Было установлено, что транскрипционные факторы Bril и Hom1 модельного базидиомицета *S. commune* участвуют в поздних стадиях развития, тогда как Wc-2, Hom2 и Fst4 функционируют на ранних этапах. Показано, что факторы транскрипции, участвующие в образовании плодовых тел, также моделируют вегетативный рост мицелия, Bril и Hom1 стимулируют формирование биомассы, тогда как Wc-1, Wc-2, Hom2, Fst4 и Tea1 подавляют вегетативный рост базидиомицета (Pelkmans *et al.*, 2017). Гомологи генов данных регуляторных белков были выявлены также у *Laccaria bicolor*, *Agaricus bisporus* и *C. cinerea* (Ohm *et al.*, 2010; Morin, 2012; Plaza *et al.*, 2014). Кроме того, обнаружено, что чрезмерная экспрессия гомолога гена C2H2 у *A. bisporus* ускоряла развитие плодовых тел, проявляя сходство с соответствующим фенотипом *S. commune* (Pelkmans *et al.*, 2016a).

Транскрипционные факторы в конечном итоге активируют гены, кодирующие структурные белки или ферменты, участвующие в формировании плодовых тел. Помимо гидрофобин, роль которых хорошо изучена, фенольные соединения, полимеризованные под действием лакказ, могут способствовать гидрофобности поверхности плодовых тел. Также предполагается, что эти ферменты сшивают клеточные стенки гиф в плодовых телах. Экспериментальные данные указывают на то, что ферменты цитохрома P450, лектины, гемолизины и экспансины также участвуют в развитии грибов. Лектины могут участвовать в агрегации гиф, гемолизины – в передаче сигналов, в частности, для индукции апоптоза отдельных гиф в плодовом теле, а экспансины – в модификации и удлинении клеточной стенки (Pelkmans *et al.*, 2016b). Процесс идентификации генов и определении их функций будет ускорен благодаря исследованиям экспрессии генов во всем геноме и расширению доступности молекулярных инструментов (Pelkmans *et al.*, 2016b).

Индукция формирования плодовых тел является результатом сложных взаимодействий между внутренними и внешними сигналами, такими как доступность питательных веществ, температура, освещение, CO₂. Для более простых видов грибов истощение питательных веществ часто необходимо и достаточно для начала полового размножения. Пути, вызванные голоданием, хорошо изучены у *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*, где ключевые роли играют GPCRs, Ras, cAMP-зависимые пути и MAPK (Böttcher *et al.*, 2016; Conrad *et al.*, 2014). Механизмы, лежащие в основе ощущения голодания у макромицетов, и молекулярные аспекты реакции на изменения температуры, изучены недостаточно (Virágh *et al.*, 2022). На развитие плодовых тел также влияет концентрация CO₂, высокие концентрации, как правило, способствуют росту мицелия и подавляют плодоношение, тогда как низкие концентрации углекислого газа приводят к образованию деформированных плодовых тел с более длинными ножками и уменьшенными шляпками (Sakamoto, 2018; Eastwood *et al.*, 2013). Углекислый газ воспринимается через сигнальный путь cAMP, и его концентрация может передаваться путем предварительного превращения CO₂ в бикарбонат карбоангидразами, которые затем

модулируют активность растворимой аденилатциклазы (AC), так что синтезируется вторичный мессенджер cAMP, используемый для внутриклеточной передачи сигналов во многих биологических процессах (Bahn and Mühlischlegel, 2006).

Регулирование транскрипции при воздействии света осуществляет белковый комплекс WCC (White Collar Complex), который состоит из светового рецептора WC-1, использующего флавины (FAD или FMN) в качестве хромофоров для восприятия синего света, образуя временную ковалентную связь с остатком цистеина при освещении и транскрипционного регулятора WC-2, инициирующего сигнальные каскады. Принцип работы комплекса был подробно описан для *Neurospora crassa* и *Alternaria alternata* (Bayram and Bayram, 2023; Schuhmacher *et al.*, 2024). WC-1/ WC-2 и гомологичные белки были выявлены у многих грибов, которые действуют как фоторецепторы синего света, но грибные геномы содержат дополнительные гены фоторецепторов, например криптохромов и фитохромов (Corrochano, 2019). В конечном итоге влияние света связано с координированной транскрипционной регуляцией WCC, дополнительных фоторецепторов и активацией сигнальных путей, таких как MAP-киназы, Ras- и G-белки (Bayram and Bayram, 2023; Corrochano, 2019).

Возможно регуляции цитодифференцировки и образования базидиом, в том числе с помощью сигналов окружающей среды, являются общими механизмами для макромицетов. Однако нередко видовые отклонения от общей программы, например, отсутствие световой регуляции у *A. bisporus* (Eger-Hummel, 1980) или формирование коричневой пленки у *L. edodes* (Yoo *et al.*, 2019). Предположительно можно экстраполировать информацию от более простых организмов к базидиальным макромицетам, однако данные программы у последних могут включать гораздо больше внутренних и внешних сигналов для решения о половом размножении (Virágh *et al.*, 2022).

1.2. Изучение некоторых аспектов морфогенеза базидиомицетов с помощью методов высокопроизводительного секвенирования

Последние полтора десятилетия характеризуются стремительным накоплением геномных и транскриптомных данных, на данный момент секвенировано более 100 геномов грибов, которые имеют собранные, аннотированные и опубликованные полные последовательности генома, 1/3 из них геномы *Agaricomycetes*. Развитие методов транскриптомного профилирования переводит исследования по молекулярной биологии и генетики на качественно новый уровень, позволяя изучать полный набор транскриптов, синтезируемых в клетке или организме при определенных условиях. Опираясь на накопленные знания по биологии и генетике грибов, а также данные полногеномного секвенирования, становится возможным идентифицировать, сравнивать и количественно оценивать уровни экспрессии сотен различных генов, что важно для понимания молекулярных механизмов морфогенеза грибов, в том числе развития плодовых тел.

Продолжаются исследования модельных культур *C. cinerea* и *S. commune*. Сравнительный анализ генома *S. commune* размером 38.5 Мб, кодирующего 13210 предсказанных генов, выявил уникальный механизм разложения древесины у этого вида. Было установлено, что одна треть из 471 генов, кодирующих факторы транскрипции, дифференциально экспрессируются во время полового развития *S. commune*. Инактивация одного из них (*fst4*) предотвращала образование плодовых тел, инактивация другого (*fst3*) привела к образованию большего количества, хотя и меньших по размеру, плодовых тел, чем у дикого типа (Ohm *et al.*, 2010). На основе результатов технологии секвенирования отдельных молекул в реальном времени был представлен черновой вариант генома размером 41.1 Мб монокариотического штамма *S. commune* IUM1114-SS01, продемонстрировавшего высокую обесцвечивающую активность в отношении нескольких текстильных красителей. Среди 13380 генов, кодирующих белки, 534 гена кодировали ферменты, участвующие в образовании углеводсодержащих соединений (Kim *et al.*, 2021).

Изучалась регуляция экспрессии ферментов целлюлаз у *S. commune*. Сравнительный геномный и транскриптомный анализ двух диких изолятов выявил ген фактора транскрипции типа Zn2Cys6 (*Roc1*), который значительно активировался при росте на целлюлозе по сравнению с глюкозой. Метод ChIP-Seq идентифицировал 1474 сайта связывания транскрипционного фактора *Roc1*. Промоторы генов, участвующих в деградации лигноцеллюлозы, были обогащены этими сайтами связывания, особенно промоторы ферментов LPMO (литической полисахаридной монооксигеназы), что указывает на прямую регуляцию этих генов со стороны *Roc1*, являющегося, таким образом, ключевым регулятором деградации целлюлозы у ксилотрофа *S. commune* (Marian *et al.*, 2022). По мнению авторов, более глубокое понимание механизмов образования грибов должно повлиять на коммерческое производство грибов и их промышленное использование для производства ферментов и фармацевтических препаратов.

С помощью метода высокопроизводительного секвенирования были исследованы транскрипционные изменения у *C. cinerea* в процессе прорастания спор, вегетативного роста, образования оидий, формирования склеротий и плодовых тел. Было отмечено, что у *C. cinerea* происходили и функционировали ткане- и стадийспецифичные альтернативные сплайсинг и редактирование РНК. Эти модификации отрицательно коррелировали с консервативными характеристиками генов и могли обеспечивать дополнительную пластичность транскриптома во время развития гриба (Xie *et al.*, 2023). Была проведена высококачественная аннотация генов *C. cinerea*, которая объединила новую сборку на уровне хромосом, данные кДНК-секвенирования, информацию из других доступных аннотаций и несколько этапов ручной коррекции. Для улучшения функционального описания генов было проведено профилирование экспрессии в десятках разных условий, для получения новых данных о состояниях транскриптома, связанных с голоданием (выявлено 1759 генов), световой индукцией (2340 генов) и дифференциацией мицелия (197 генов в воздушном и 247 генов в прикрепленном мицелии) (Hegedüs *et al.*, 2025).

Понимание молекулярно-физиологических аспектов морфогенеза базидиальных грибов и механизмов формирования плодовых тел, наряду с фундаментальной значимостью, также представляет интерес для решения прикладных задач и может повлиять на коммерческое производство экономически ценных грибных культур и их использование. Результаты подобных исследований могут быть учтены в грибоводческих хозяйствах при разработках и оптимизации практического получения грибного мицелия и при промышленном выращивании плодовых тел съедобных и лекарственных грибов, с большим биотехнологическим потенциалом.

Проводятся работы по полногеномному секвенированию и транскриптомному анализу культивируемых съедобных и лекарственных базидиомицетов. Были выявлены закономерности экспрессии путей синтеза гиббереллинов во время удлинения ножки у *Flammulina filiformis*, а также молекулярные механизмы, посредством которых гиббереллины, в общей сложности 1000 генов, могут влиять на синтез компонентов клеточной стенки посредством ферментов, факторов транскрипции, передачи сигналов и контроля клеточного цикла, тем самым регулируя удлинение ножки. Полученные результаты полезны для понимания роли гиббереллинов и закладывают основу для рационального регулирования длины ножки у грибов при выращивании (Li *et al.*, 2023). Изучалось развитие плодовых тел у *F. filiformis* путем сравнения транскриптомов разных стадий морфогенеза, а также генов других грибов, для выявления консервативных генов, участвующих в развитии плодовых тел, реакциях термочувствительности и термоустойчивости на тепловой стресс. Сравнительный анализ показал, что особое значение имеют гены *hsp70*, *hsp90* и *fes1*, которые могут способствовать адаптации к тепловому стрессу на ранних стадиях развития плодового тела (Liu *et al.*, 2020).

С помощью высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina были собраны транскриптомы базидиомицетов *Phellinus igniarius* и *Sparassis crispa*, которые широко используются в традиционной фитотерапии в странах Азии, расшифровка геномов будет способствовать расширению потенциала этих организмов для медицинских и фармакологических целей. Собранный геном *S. crispa* содержал 13157 предсказанных генов. Были обнаружены несколько специфических особенностей генома, включая локус типа спаривания А с генами гетеродоменных транскрипционных факторов HD1 и HD2, митохондриальной промежуточной пептидазы (MIP) и локус типа спаривания В с семьей генов рецепторов феромонов и тремя генами предшественников феромонов. Были охарактеризованы гены ферментов, участвующих в метаболизме углеводов (CAZyme) и генов β -глюкансинтазы, а также кластеры генов связанных с синтезом вторичных метаболитов, таких как терпены, индолы, поликетиды и эстрогены (Kiyama *et al.*, 2018). Из полученных 11847 генов *P. igniarius*, было идентифицировано в общей сложности 832, обнаружены 9 генов, участвующих в работе лакказ, и 17 генов, участвующих в биосинтезе тритерпеноидов, которые заслуживают дальнейшего исследования (Dong *et al.*, 2021).

Секвенированы и проанализированы геномы четырех видов *Armillaria*, а также инвазивных и репродуктивных стадий развития *A. ostoyae*. Сравнение с 22 родственными грибами выявило значительное расширение генома у *Armillaria*, затрагивающее несколько генов, связанных с патогенностью, ферментами, разлагающими лигноцеллюлозу, и специфические гены, экспрессирующиеся во время развития ризоморфов, транскриптом которых имеет общие черты с транскриптомами как плодовых тел, так и вегетативного мицелия (Sipos *et al.*, 2017).

Грибы разработали мощные геномные и химические системы защиты для противодействия генетической дестабилизации и воздействию других организмов. Проведен анализ полной последовательности генома размером 48.96 Мб, кодирующий 15688 генов, дающий целостное представление о вторичном метаболизме и процессах защиты у модельного лекарственного гриба *Ganoderma sinense*. Выделено более тридцати кластеров генов, участвующих в биосинтезе вторичных метаболитов, а также большое количество генов, ответственных за их транспорт и регуляцию. Выявлены компоненты механизмов защиты генома, а именно точечные мутации, индуцированные повторами (RIP), метилирование ДНК и подавление генов с помощью малых РНК (Zhu *et al.*, 2015).

Проведена сборка генома *de novo* одного из самых популярных съедобных грибов в мире *Agaricus bisporus*. Основной задачей данного исследования было установление генов, отвечающих за потемнение плодовых тел после сбора урожая. Механическое воздействие вызывало повышение экспрессии генов, связанных с активностью лигазы длинных жирных кислот, а также генов биосинтеза меланина, особенно на ранних этапах (Jo *et al.*, 2022).

Транскриптомное исследование в вегетативном мицелии и в процессе развития плодовых тел *Cyclocybe aegerita*, обнаружило дифференциальную экспрессию генов, участвующих в формировании плодовых тел гриба, что демонстрирует корреляции, связанные с разными стадиями развития и с плодоношением. Идентифицированы ферменты, предположительно участвующие в биосинтезе С8-оксилипинов у *C. aegerita*, включая липоксигеназы (LOX), диоксигеназы (DOX), гидропероксидлиазы (HPL), алкогольдегидрогеназы (ADH). Кроме того, установлено, что мицелий является основным источником сесквитерпенов, приобретающих во время спорообразования. Изменения в профиле С8-оксилипинов, обнаруженные на поздних стадиях развития, вероятно, обусловлены активностью ферментов, расположенных в плодовых телах (Orban *et al.*, 2021).

Исследование по секвенированию и сборке генома *de novo* с использованием технологий Illumina и Pac-Bio CLR было проведено на съедобном устойчивом к высоким температурам виде *Pleurotus giganteus*. Было идентифицировано в общей сложности 480 ферментов, действующих на углеводы (CAZymes), включая 15 лакказ и 10 пероксидаз, что свидетельствует о высокой способности *P. giganteus* к деградации лигноцеллюлозы. Локус типа спаривания А у *P. giganteus* состоял из пары гомеодоменных генов типа HD1 и HD2, локус типа спаривания В

как минимум из четырех генов рецепторов феромонов и трех генов феромонов. Исследование полезно для геномно-ориентированной селекции, а также помогает понять устойчивость гриба к высоким температурам (Yu *et al.*, 2022).

Базидиомицет *Grifola frondosa* используется в медицине и кулинарии, богат биоактивными соединениями, такими как тритерпеноидные полисахариды, которые способствуют укреплению здоровья. Используя технологии секвенирования Illumina, PacBio HiFi и Hi-C, был получен геном размером 35.74 Мб с 12526 генами, кодирующими белки. Показатели полноты BUSCO 95,1% и 99,1% для генома и генов соответственно указывают на высокое качество сборки и высокую полноту предсказания генов. Транскриптомный анализ в различных условиях освещения показал изменения в экспрессии генов, особенно тех, которые связаны с синтезом терпеноидов, при этом несколько генов CAZymes и CYP450 также демонстрировали светоиндуцированные изменения. Было идентифицировано десять кластеров генов вторичных метаболитов тритерпеноидов, три из которых были светочувствительными, что указывает на то, что воздействие света регулирует метаболизм тритерпеноидов (Yang and Hu, 2025).

Микологи подводят итоги текущего состояния знаний о плодовых телах базидиальных макромицетов с акцентом на филогению и биологию развития, подкрепляя накопленные данные результатами генетических исследований в отдельных модельных системах. Для достижения истинного понимания природы развития и морфогенеза у грибов необходимо сопоставить наблюдения классических прегеномных подходов, выводы из экспериментов *in vivo*, и данные по геномике и другим аспектам глобального анализа макромолекул. Авторы подчеркивают, что генетическая информация о развитии плодовых тел, накапливаемая стабильными темпами, также способствует развитию прикладных аспектов, таких как получение грибов с улучшенными свойствами и различные биотехнологии (Loftus *et al.*, 2020; Nagy *et al.*, 2021; Virágh *et al.*, 2022; Tarafder E *et al.*, 2024). Геномные данные по Agaricomycetes быстро накапливаются, однако это не сопровождается улучшением аннотации генов, из-за чего функции генов остаются крайне плохо изученными, большинство геномов представляют собой черновики, и лишь немногие являются сборками на уровне хромосом, что оставляет много работы на будущее (Hegedüs *et al.*, 2025).

1.3. Молекулярно-генетические исследования и транскриптомное профилирование немодельных организмов, на примере базидиомицета *L. edodes*

Современные методы высокопроизводительного секвенирования позволяют описать профиль экспрессии всех генов и, таким образом, сформировать базу для масштабной характеристики метаболизма исследуемого организма. Важное условие, необходимое для получения наглядной физиологической картины по данным высокопроизводительного секвенирования, – наличие последовательности генома и ее качественной аннотации у целевого организма. Однако список организмов с полностью аннотированными геномами невелик.

Зачастую исследователи выполняют транскриптомное профилирование так называемых немодельных организмов, то есть тех, у которых последовательности геномов либо не известны, либо плохо собраны и/или аннотированы. Проведение транскриптомных исследований на немодельных объектах возможно благодаря алгоритмам *de novo* сборки транскриптов из последовательностей, полученных в ходе РНК-секвенирования, с помощью которого возможно оценить экспрессию всего генома и на основе этого охарактеризовать физиологические параметры клеток/тканей/организма глобально, а не только по анализу активности отдельных генов. При этом процедура физиологической интерпретации данных осложнена из-за отсутствия аннотации собранных транскриптов и их классификации по метаболическим путям и функциональным категориям. Как правило, в таких исследованиях часто обсуждают только ограниченный круг генов, выбираемых авторами; в то время как описание многих активируемых/репрессируемых процессов остается «за кадром», вследствие их многообразия, которое сложно анализировать, ограничиваясь «ручным» анализом данных.

Ксилотрофный базидиомицет *L. edodes*, также известный как шиитаке, ценится как высококачественный съедобный и лекарственный гриб и является третьим по распространенности типом грибов после *Agaricus* и *Pleurotus*, обеспечивая более 20% мировых поставок грибов (Royse *et al.*, 2017). Также, обладая высоким потенциалом эффективно биodeградировать лигноцеллюлозные отходы, *L. edodes* является биотехнологически полезной культурой (Sánchez, 2009). Благодаря этим качествам, а также новым открытиям и разработкам лекарственных свойств данной культуры, сельскохозяйственное выращивание и биотехнологическое применение *L. edodes* с каждым годом возрастают. Несмотря на это, данная культура не является модельным организмом, молекулярно-физиологические аспекты роста и развития базидиального макромицета недостаточно изучены, геномные и транскриптомные исследования находятся на начальных этапах. Было представлено несколько геномных последовательностей *L. edodes*, однако до сих пор нет хорошо аннотированного генома шиитаке, в результате практическое использование этих геномных ресурсов весьма ограничено, и генетическая программа сложных фенотипов, таких как признаки, связанные с формированием морфогенных структур базидиального макромицета остается невыясненной.

1.3.1 Характеристики транскриптома *de novo* вегетативного мицелия

Первым исследованием, посвященным характеристике транскриптома базидиомицета *L. edodes* с применением метода полногеномного секвенирования, была работа китайских исследователей Zhong M. с соавторами, где с помощью технологии секвенирования Illumina/Solexa представлена сборка транскриптома *de novo* для немодельного объекта шиитаке (Zhong *et al.*, 2013). Авторы отмечают, что, несмотря на популярность, употребление в пищу и использование данной культуры, в том числе в терапии различных заболеваний, мало что

известно о генах, участвующих в синтезе активных метаболитов, и отсутствие геномов *L. edodes* является препятствием для развития исследований функциональной геномики. С помощью технологии высокопроизводительного секвенирования Solexa в сборке *de novo* транскриптома 10 суточного мицелия *L. edodes* было получено более 57 миллионов прочтений секвенирования, которые были собраны в 28923 уникальных последовательностей, включая 18120 уникальных генов с кодирующей последовательностью. На основе поиска сходства с известными белками собранные последовательности были аннотированы с описаниями генов с применением баз данных онтологии генов (GO), ортологических групп эукариот (KOG) и Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG). На основе гомологии последовательностей 2853 генов были разделены на 38 функциональных групп. В каждой из трех основных категорий (биологический процесс, клеточный компонент и молекулярная функция) классификации GO доминировали термины «метаболический процесс», «строение клетки» и «каталитические функции», соответственно. Также был отмечен высокий процент генов из категорий «клеточный процесс», «органелла» и «связывание» и несколько генов из терминов «биологическая адгезия», «подвижность», «рост», «белковое связывание» и «запас питательных веществ». С помощью базы данных KOG 6203 гена были расклассифицированы по 25 функциональным категориям, среди которых самая большая группа (1809 генов) была представлена кластером для общего прогнозирования функций, далее следовали функциональные группы «транспорт и метаболизм углеводов» (1053 гена), «внеклеточные структуры» (8 генов) и «защитные механизмы» (8 генов). Для определения биологических путей активных у *L. edodes*, было сопоставлено 14075 аннотированных последовательностей с референсными генами из базы данных KEGG. В общей сложности 2264 уникальных гена были распределены по 214 путям, с наибольшим представительством уникальных последовательностей отвечающих за пуриновый (966 генов) и пиримидиновый метаболизм (878 генов). На тот момент это была первая попытка характеристики транскриптома *de novo* и обнаружения генов в немодельном грибе *L. edodes*, предоставляющая ресурс для дальнейших исследований функциональной геномики базидиомицета шиитакэ, особенно для исследования экспрессии генов и функциональной аннотации белков *L. edodes* (Zhong *et al.*, 2013).

Немногим позже был представлен проект полногеномного секвенирования *de novo* монокариона *L. edodes* размером 46.1 Мб, включающий 13028 предсказанных моделей генов (Shim *et al.*, 2016). Несмотря на то, что авторы представляют данную работу как полногеномное секвенирование и функциональную аннотацию генома, с представлением ключевой информации о различных сигнальных путях и вторичных метаболитах *L. edodes*, на самом деле кратко касаются лишь нескольких функциональных категорий генов, участвующих в метаболизме аминокислот, работе ферментов лигнинолитического комплекса и связанных с синтезом β -глюканаз. Так были идентифицированы 22 гена, связанных с компонентами вкуса гриба шиитакэ,

участвующих в метаболизме аминокислот, связанных со сладким вкусом, таких как глицин, серин и треонин, и 17 генов, участвующих в метаболизме молекул, связанных со вкусом, подобных глутамату натрия, включая аланин, аспартат и глутамат. Было показано, что геном *L. edodes* содержит гены лигноцеллюлозолитических ферментов, таких как целлюлаза (5 генов), лакказы (15), пероксидаза (15) и глиоксалооксидаза (3). Также были идентифицированы гены, связанные с 1,3- β -глюканазой, которые могут быть вовлечены в биосинтез лентинана (Sakamoto *et al.*, 2005). Авторы предлагают использовать результаты для разработки программ генетической селекции шиитаке (Shim *et al.*, 2016). Несомненно, данная информация будет способствовать дальнейшей расшифровке генома *L. edodes*, поможет установлению молекулярно-генетических маркеров метаболических процессов и улучшит понимание структуры и функции генома. Однако для полномасштабной функциональной аннотации генов представленной информации недостаточно и, по мнению самих авторов, необходимы дополнительные исследования.

1.3.2 Характеристика транскриптов, связанных с происхождением грибного аромата плодовых тел

Базидиомицет *L. edodes* культивируется в азиатских странах более восьми веков (Chang and Miles, 1987) и является вторым по распространенности культивируемым видом грибов во всем мире, уступая только *A. bisporus* (Patel *et al.*, 2025). Шиитаке обладает большим количеством белков и полисахаридов, а также уникальными вкусовыми компонентами, которые делают его чрезвычайно популярным среди потребителей Китая, Японии и Кореи. За неповторимый аромат шиитаке, выделяемый в значительных количествах, ответственен лентионин, относящийся к сероорганическим соединениям (Hiraide *et al.*, 2004). Так же как и в предыдущей работе, где были идентифицированы гены, связанные с компонентами вкуса гриба шиитаке и вовлеченные в биосинтез лентинана (Shim *et al.*, 2016), работа Chen с соавторами была посвящена обнаружению и характеристике генов, участвующих в образовании лентионина. Лентионин образуется из лентиновой кислоты (предшественника сульфоксида γ -L-глутамилцистеина), и было показано, что в образовании лентионина участвуют два фермента γ -глутамилтранспептидаза и C-S лиаза (цистеиндесульфуразой, обладающей активностью цистеинсульфоксидлиазы), которые в геноме *L. edodes* кодируются 7 генами ggt и 5 генами Csl, соответственно. В различных грибах обнаружено, как правило, 2-4 гена ggt и 1-2 гена Csl. Большее количество этих генов у *L. edodes* может свидетельствовать о более высокой способности катализа лентиновой кислоты до производного L-цистеина сульфоксида для синтеза сероорганических соединений и о большем потенциале шиитаке в производстве аромата, чем у других съедобных грибов (Chen *et al.*, 2016).

1.3.3 Характеристика транскриптов, связанных с деградацией лигноцеллюлозных субстратов

Популярным направлением в изучении базидиальных грибов являются исследования, связанные с деградацией лигноцеллюлозных субстратов, с целью дальнейшего использования в

различных биотехнологических процессах, в переработке отходов лесной и деревообрабатывающей промышленности, в биотрансформации и отбеливании волокон, для биоремедиации и т.д. Высокопроизводительное секвенирование генома организмов позволяет разобраться в вопросе функционирования лигнинолитических и целлюлозолитических ферментов на геномном уровне. Базидиомицет *L. edodes* как представитель грибов белой гнили, может выделять большое количество лигноцеллюлозолитических ферментов, способных эффективно разрушать растительные волокна (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2012). Активность внеклеточных ферментов и способность к деградации зависят от различных факторов, экспрессия генов, разрушающих целлюлозу, гемицеллюлозу, пектин и лигнин, может быть индуцирована различными субстратами культивирования. С применением методов полногеномного секвенирования в монокариотическом мицелии *L. edodes* был идентифицирован 461 ген, предположительно кодирующих гликопротеины с ферментативной активностью, которые включали 245 гликозидгидролаз, 31 эстеразу, 75 гликозилтрансфераз, 9 полисахаридных лиаз, 58 углеводсвязывающих модулей и 85 ферментов вспомогательной активности (Chen *et al.*, 2016). По сравнению с геномами других съедобных грибов, у *L. edodes* выявлено наибольшее количество гликозилтрансфераз и гликозидгидролаз, что помимо всего прочего указывает на высокий потенциал разложения крахмала. Кроме того, в геноме *L. edodes* было идентифицировано 38 генов целлюлазы, которые были похожи на другие грибы белой гнили, такие как *G. lucidum* (Chen *et al.*, 2012) и *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez *et al.*, 2004), а также были идентифицированы 9 генов гемицеллюлаз и 7 генов, кодирующих пектиназу. Было также идентифицировано два гена, кодирующих Mn-пероксидазу, один ген гибридной пероксидазы, 14 генов медь-содержащих оксидаз, кодирующих, в том числе, лакказы, 6 генов кодирующих другие пероксидазы, такие как L-аскорбатпероксидаза, и 24 гена, кодирующих вспомогательные ферменты, которые могут принимать участие в разложении лигнина. Таким образом, в мицелии культуры шиитакэ было идентифицировано более ста лигноцеллюлозолитических ферментов, сходных с ферментами других грибов белой гнили. Транскриптомный анализ показал, что экспрессия генов, кодирующих две целлюлазы и 16 факторов транскрипции, оказывающих потенциальное регуляционное воздействие, была повышена при культивировании мицелия на целлюлозном субстрате по сравнению с глюкозной средой. Данные результаты, по мнению авторов, могут способствовать лучшему пониманию молекулярного механизма деградации лигноцеллюлозы, что послужит основой при разработке более эффективных стратегий по разложению лигноцеллюлозного сырья и повысит эффективность выращивания съедобных грибов (Chen *et al.*, 2016).

Ксилотрофные базидиомицеты, в том числе *L. edodes*, обладают множеством ферментов, разрушающих лигнин, прежде всего лакказы и Mn-пероксидазы. Однако точное количество лакказ и разнообразие их свойств и биологических функций у *L. edodes* до сих пор неизвестно.

Было проведено исследование по анализу последовательности генома *L. edodes* и идентифицировано 13 генов, кодирующих мультимедные оксидазы – лакказы и две феррооксидазы. По сходству последовательностей и особенностям экспрессии лакказы были разделены на две группы, одни в основном секретировались из мицелия в субстрат, в то время как другие лакказы экспрессировались в основном в плодовых телах во время роста или после сбора урожая, но слабо экспрессировались в мицелии. Также как и две феррооксидазы, которые экспрессировались в основном в плодовых телах во время роста или после срезки плодового тела и демонстрировали очень низкий уровень экспрессии в вегетативном мицелии. Полученные данные указывают на то, что лигнинолитические ферменты лакказы и феррооксидазы базидиомицета *L. edodes* имеют общие особенности экспрессии и, возможно, имеют общие биологические функции. Кроме того, мультимедные оксидазы обладают широким спектром каталитической активности, включая деградацию и синтез полифенолов, деградацию лигнина, образование меланина, а также необходимы при развитии плодового тела (Sakamoto *et al.*, 2015).

Были исследованы транскрипционная регуляция и внеклеточная активность лакказы и целлюлазы на различных стадиях развития плодового тела *L. edodes* при культивировании на субстрате на основе опилок. Активность лакказы и целлюлазы регулировалась на уровне транскрипции генов, и изменения активности выявили связь со стадиями развития плодового тела. Уровень мРНК лакказы был максимальным на стадии полной колонизации и снижался во время развития плодового тела, напротив мРНК целлюлазы начинала накапливаться на стадии формирования миниатюрных плодовых тел и транскрипты мРНК целлюлазы были максимально представлены на стадии раскрытия плодового тела. Эта тенденция была более выражена в плодоносящих культурах с широкодиапазонными штаммами погоды, чем в неплодоносящих холоднопогодных штаммах. Транскрипция генов лакказы и целлюлазы также зависела от водных условий субстрата на основе опилок, инициация образования примордиев происходила когда водный потенциал среды был высоким (Ohga *et al.*, 2000).

1.3.4 Транскриптомные изменения, происходящие в грибных клетках после сбора урожая плодовых тел

Макромицет *L. edodes* является одним из наиболее экономически важных съедобных и лекарственных культивируемых грибов, однако проблемы связанные с порчей после сбора урожая, приводящие к потере свежести и последующей потере пищевой ценности плодовых тел, являются еще одним аспектом в рамках изучения генетики базидиомицета *L. edodes*. Был проведен ряд исследований, рассматривающих физиологические изменения, такие как пигментация пластин гимениального слоя, лизис клеточной стенки, мацерация плодового тела и деградация некоторых биологически активных молекул, например лентинана. А также попытки охарактеризовать механизмы, которые отвечают за потери качества плодовых тел *L. edodes*

происходящие после сбора урожая и во время хранения грибов. Проведен ряд исследований по построению черновика геномной последовательности с помощью сборки *de novo*, транскриптомного анализа с использованием Super-SAGE и прогнозированию генов, участвующих в потере качества плодовых тел *L. edodes* после сбора урожая (Sakamoto *et al.*, 2017). Результаты показали, что многие ферменты, связанные с клеточной стенкой базидиом, активируются после отделения плодовых тел от субстрата, например, ферменты, разрушающие β -1,3 – β -1,6-глюкан из семейства гликозидгидролаз, а также гены, связанные с хитином, например хитиназы, экзохитиназы и хитозаназы. Предположительно данные ферменты, разрушающие клеточную стенку, синергически взаимодействуют для быстрого автолиза плодового тела. После сбора урожая активировались многие гипотетические гены факторов транскрипции, содержащие домены группы высокой подвижности, а также гены, кодирующие белки, связанные с программируемой клеточной гибелью. Авторы приходят к выводу, что у базидиомицета *L. edodes* существует быстрая система автолиза плодового тела после сбора урожая и предлагают дальнейшее изучение генов «потери качества» для селекции штаммов, которые могут сохранять свежесть дольше, чем исследованные штаммы (Sakamoto *et al.*, 2017).

Было установлено также, что потемнение плодовых тел связано с повышенной активностью фенолоксиляющих ферментов. При сравнении особенностей экспрессии генов в свежих плодовых телах *L. edodes* и через несколько дней после сбора урожая, в последних было обнаружено увеличение уровней транскрипции ряда генов, кодирующих ферменты фенолоксидазы (тирозиныазы и лакказы), и нескольких генов, кодирующих ферменты, связанные с деградацией клеточной стенки (глюканаза, хитиназы, хитиндеацетилаза и хитозаназа). Также после сбора урожая высоко экспрессировался ген, кодирующий фактор транскрипции, связанный с ремоделированием хроматина, предположительно участвующий в автолизе базидий во время диффузии спор. Процесс включал запрограммированную клеточную смерть, однако мало известно о связи между апоптозом и морфологией грибов. Данное исследование указывает на возможное участие фенолоксиляющих ферментов и фактора транскрипции в старении плодового тела базидиомицета *L. edodes* (Sakamoto *et al.*, 2009).

Помимо этого, *L. edodes* ценный источник лекарственных соединений, в частности компонент клеточной стенки плодовых тел шиитакэ, β -1,3-1,6-глюкан, называемый лентинаном, используется для противоопухолевой иммунотерапии. Однако содержание лентинана уменьшается во время хранения после сбора урожая (Minato *et al.*, 1999). Автолиз плодового тела *L. edodes* происходит, прежде всего, из-за деградации клеточной стенки, состоящей из нескольких полисахаридов, таких как β -1,3-глюкан, β -1,6-глюкан, хитин и хитозан. Ферменты глюканазы и хитиназы участвуют в деградации клеточной стенки и лентинана после сбора урожая. Таким образом, контроль экспрессии β -1,3-глюканазы очень важен для сохранения содержания лентинана в плодовом теле. После срезки плодового тела происходят резкие изменения в сторону

увеличения экспрессии генов фенолоксидаз (тирозиназы и лакказы) и ферментов клеточной стенки (глюканазы и хитиназы). Это говорит о том, что в *L. edodes* существует система регуляции генов старения. Изучение процесса старения в грибах важно не только для фундаментальной науки, но и для прикладных сельскохозяйственных аспектов (Sakamoto *et al.*, 2012).

1.3.5 Транскриптомные изменения и молекулярные механизмы, лежащие в основе генетики плодоношения

Сравнительный транскриптомный анализ дикариотического мицелия и зрелых плодовых тел *L. edodes* с использованием платформы Illumina HiSeq был проведен группой корейских исследователей для понимания регуляции экспрессии генов и выяснения молекулярных механизмов развития зрелых плодовых тел, их связи с урожайностью и полезными свойствами коммерчески важного культивируемого съедобного гриба шиитакэ (Song *et al.*, 2018). *De novo* сборка этих последовательностей выявила 11675 репрезентативных транскриптов на двух разных стадиях развития *L. edodes*. В общей сложности 9092 генов были аннотированы и подвергнуты анализу с помощью баз данных генов GO, KOG и KEGG. Анализ экспрессии генов показал, что 2080 генов экспрессируются дифференциально, причем 1503 и 577 генов активируются в мицелии и зрелом плодовом теле, соответственно. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с помощью базы данных GO позволил получить информацию о функциональных терминах, распределенных на три основные категории: биологические процессы, клеточный компонент и молекулярные функции. Полученная информация указывает на то, что число ДЭГ в плодовом теле было значительно меньше, чем в мицелии, подводя к выводу о том, что профиль экспрессии генов широко варьирует во время роста мицелия по сравнению с созреванием плодового тела в *L. edodes*. Количество ДЭГ в категориях KOG было также больше в мицелии, чем в зрелом плодовом теле, за исключением категорий «репликация, рекомбинация и репарация» и «структура и динамика хроматина». Развитию плодового тела предшествуют премейотическая репликация, кариогамия и мейоз, и, таким образом, гены, связанные с этими процессами, сверхэкспрессируются на стадиях созревания базидиом. Также, для оценки функциональных путей, участвующих в созревании плодового тела, все ДЭГ были сопоставлены с базой данных KEGG, анализ показал, что большое количество ДЭГ участвует в метаболизме и трансляции углеводов и аминокислот, необходимых для поддержания основных биологических процессов на обеих стадиях. Количество ДЭГ уменьшалось в созревающем плодовом теле по сравнению с мицелием, что согласуется с данными GO и KOG. Было показано, что экспрессия генов лектинов подавлялась во время развития плодового тела, а также на стадии примордий, по сравнению со стадией мицелия. Большинство функциональных категорий, связанных с метаболизмом нуклеотидов, аминокислот, биосинтезом гликанов, метаболизмом кофакторов и витаминов, энергетическим метаболизмом, липидным обменом,

сигнальной трансдукцией, в большом количестве были представлены на стадии мицелия. С другой стороны, наблюдалась незначительная разница в количестве ДЭГ в категориях «метаболизм терпеноидов и поликетидов», «биосинтез других вторичных метаболитов», «мембранный транспорт» и «рост и гибель клеток». Кроме того, гены категорий «репликация и репарация» и «транскрипция» высоко экспрессировались на стадии зрелого плодового тела. Также были идентифицированы специфические для плодовых тел белки, такие как аспарагиновая протеаза, γ -глутамилтранспептидаза и циклогексанонмонооксигеназа, которые участвуют в созревании плодовых тел и выделении функциональных веществ. Выявление генетических изменений при сравнении штаммов на разных стадиях развития с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования, по мнению авторов, потребуется для получения улучшенных сортов грибов с высокой пищевой и лечебной ценностью, в том числе путем генетической модификации (Song *et al.*, 2018).

Для получения представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе роста плодового тела *L. edodes* от ранней стадии примордиев, через промежуточную стадию развития плодового тела до полного созревания, был проведен транскриптомный анализ *de novo* с использованием высокопроизводительного секвенирования. Было обнаружено 9331 генов в базе данных белков NCBI, функционально аннотировано 4758 из них с помощью анализа по базе данных онтологии генов, 2921 с помощью анализа кластеров ортологических групп белков и 3995 генов было распределено по метаболическим путям, используя Киотскую энциклопедию генов и геномов. Кроме того, было идентифицировано 399 дифференциально экспрессируемых генов между ранней стадией развития плодового тела и промежуточной стадией, 1428 между промежуточной стадией и полностью созревшим плодовым телом и 1830 между примордием и зрелыми базидиомами, обнаружив 769 ДЭГ в нескольких метаболических и сигнальных путях. Установлено, что в полностью созревших плодовых телах дифференциальная экспрессия генов была существенно ограничена. Лишь немногие гены, экспрессия которых была либо сильно повышена, либо оставалась на высоком уровне во время роста плодового тела, были специально проаннотированы. Оказалось, что они принадлежат к путям метаболизма пуринов, мейоза и ненасыщенных жирных кислот, что позволяет предположить, что это ключевые молекулярные события, активно происходящие в плодовом теле после развития (Wang *et al.*, 2018b).

Авторы подробно останавливаются на нескольких моментах, связанных с вкусовыми качествами плодовых тел *L. edodes*, данные вопросы были также затронуты и в предыдущей работе (Shim *et al.*, 2016). Были исследованы пути метаболизма аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и некоторых 5'-нуклеотидов, связанных с грибным ароматом и усилителем вкуса, придающим плодовому телу шиитакэ восхитительный вкус. Экстракт гриба можно использовать в качестве приправы вместо глутамата натрия, поскольку аспарагиновая и глутаминовая кислоты являются основными факторами, влияющими на вкус (Dermiki *et al.*, 2013;

Chen *et al.*, 2015; Poojary *et al.*, 2017). Согласно анализу, во время роста плодового тела основным метаболическим путем, насыщенным активированными генами, связанным с грибным ароматом, является производство пуринов. В синтезе и деградации производных пурина участвуют 65 генов, уровни экспрессии которых были повышены на полностью развитой стадии плодового тела по сравнению с ранней стадией примордиев, что приводило к более высокому накоплению нуклеотидов AMP, XMP и IMP. Высокая экспрессия генов, вовлеченных в метаболические пути синтеза аминокислот, связанных с грибным ароматом, приводила к более низкому содержанию аспарагиновой и глутаминовой кислоты в зрелом плодовом теле. Также были обнаружены 16 генов, участвующих в метаболизме ненасыщенных жирных кислот, связанных с грибным ароматом. Сложные молекулярные детерминанты аромата частично состоят из восьми углеродных летучих соединений, некоторые из которых генерируются из ненасыщенных жирных кислот различными ферментами (Pinho *et al.*, 2008; Dermiki *et al.*, 2013). Некоторые из этих генов (Fad1 и Fad2) конститутивно и высоко экспрессировались на протяжении всего роста плодового тела. Увеличение экспрессии данных генов происходит только во время перехода от стадии мицелия к первичной стадии формирования плодового тела, кроме того экспрессия гена Fad1 постоянно повышалась в процессе созревания до полностью развитой стадии (Sakai and Kajiwar, 2003). Таким образом, генерация ароматических молекул оставалась активной во время роста плодового тела. Данные исследования могут представлять молекулярную основу для отбора или создания более ценных штаммов для культивирования, считают авторы (Wang *et al.*, 2018b).

Также как и в предыдущем исследовании (Song *et al.*, 2018), авторы отмечают связанное с мейозом значительное различие в экспрессии некоторых генов между ранними и зрелыми стадиями роста плодового тела. Аннотация 52 генов, участвующих в мейозе, показала, что большинство из них почти не изменяются на уровне транскрипции во время роста плодового тела, таким образом конститутивно экспрессируясь в плодовых телах. Тем не менее, было обнаружено несколько интересных дифференциально экспрессируемых генов, связанных с мейозом. Уровни экспрессии генов Mcm5, Hxt и Orc, связанных с S-фазой; гена Dmc1, связанного с фазой G2; и генов Rad17 и Mad2, связанных с фазой М – разборкой веретена деления, были повышены в зрелом плодовом теле по сравнению со стадией примордиев. Морфологическое преобразование плодового тела *L. edodes* сопровождается образованием спор. Ген Dmc1 – специфичная для мейоза рекомбиназа, необходимая для гомологичного спаривания хромосом и рекомбинации, при подавлении данного гена, образование спор уменьшается (Sakamoto *et al.*, 2009). Результаты РНК-Seq указывали на то, что экспрессия Dmc1 является доминирующей, поскольку он функционирует в фазе G2, было высказано предположение, что процесс мейоза и образования спор у *L. edodes* происходит преимущественно на полностью развитой стадии. Таким образом, авторы предполагают, что Dmc1 или другие гены могут использоваться в качестве маркеров для различения плодовых тел *L. edodes* после развития (Wang *et al.*, 2018b).

Процесс образования и развития плодовых тел базидиальных макромицетов в последние годы привлекает интерес многих исследователей, однако генетические и молекулярные аспекты данных процессов до сих пор изучены плохо. Была предпринята еще одна попытка расшифровать генетическую архитектуру, лежащую в основе признаков, связанных с образованием плодовых тел базидиомицета *L. edodes* по объединенным геномным, генетическим и фенотипическим данным (Zhang *et al.*, 2021). Используя РНК-секвенирование плодовых тел из 110 дикарионов в двуродительской картирующей популяции, была построена сверхплотная генетическая карта *L. edodes* (Lemap2.0) общей длиной 810.14 сМ, которая покрыла 81.7% генома шиитаке. Затем с помощью количественного анализа признаков локусов (QTL) расшифрована схема генетической архитектуры образования плодовых тел. Были идентифицированы двадцать девять QTL и три основных геномных региона, связанных с данным процессом. Обнаружено, что экспрессия 246 генов значительно коррелирует с фенотипическими признаками развития базидиом, тридцать три из них были вовлечены в формирование плодового тела и могли представлять собой гены-кандидаты, контролирующие их форму и размер. Плодовое тело является сложной многоклеточной структурой у грибов, и многие гены, участвующие в их формировании, отвечают также за ответную реакцию на окружающие раздражители, передачу сигналов, регуляцию транскрипции, деградацию белков, перестройку клеточной стенки, регуляцию клеточного цикла и т.д. В данном исследовании были изучены десять признаков, связанных с образованием плодовых тел, и между экспрессией некоторых генов и фенотипическими признаками была установлена корреляционная связь. Ген, кодирующий белок-переносчик гексозы, который индуцируется различными уровнями глюкозы в грибах, и ген, отвечающий за транспорт олигопептидов, играют важную роль в половой дифференциации и половом процессе у грибов. Гены, кодирующие кальций-активируемый катионный канал, могут функционировать в сигнализации Ca^{2+} у *L. edodes*, данный процесс вовлечен в регуляторную роль дифференцировки мицелия у базидиом. Семь генов-кандидатов QTL могут быть вовлечены в передачу сигнала в ходе формирования плодового тела. Установлены гены, кодирующие белок, ассоциированный с циклазой, который участвует в передаче сигнала полимеризации актина и связан с транспортировкой везикул и образованием цитоскелета, а также важен в морфогенезе грибов. Были идентифицированы три гена, кодирующие белки WD40, которые обеспечивают платформу для взаимодействия и сборки нескольких белков в сигналосому и имеют разнообразные функции в грибах, в основном, участвуют в росте, дифференцировке клеток и развитии. Регуляция транскрипции необходима для образования плодового тела у грибов, а транскрипционные факторы управляют изменениями в экспрессии генов во время этого процесса. Были обнаружены гены, кодирующие факторы транскрипции, регулирующие различные аспекты морфообразования у грибов. А также гены, кодирующие фасциклин-подобный белок, способствующий клеточной адгезии, которая в

многоклеточном грибном организме важна в образовании трехмерной структуры плодового тела, и участвующий в клеточной дифференцировке и развитии во время формирования плодового тела у *L. edodes*. Были установлены гены, играющие роль в регуляции клеточного цикла, а также гены, кодирующие углеводактивные ферменты (CAZymes) принимающие участие в ремоделировании клеточной стенки грибов. Обнаружены гены, участвующие в системе убиквитина, которая необходима в деградации белка, а также ряд генов предположительно участвующих регуляции морфогенеза грибов. Многие обогащенные термины Gene Ontology также были связаны с процессом морфообразования плодовых тел. Такие метаболические пути как: клеточный ответ на осмотический стресс, оксидоредуктазная активность, действующая на альдегидную или оксогруппу доноров, НАД или НАДФ в качестве акцептора и GO термины сворачивания белка, были, вероятно, вовлечены в реакции на окружающую среду. Митотический цитокинез, регуляция митотического клеточного цикла, мейотическая сегрегация сестринских хроматид и контрольная точка целостности митотической ДНК, были связаны с регуляцией клеточного цикла. GO термины, относящиеся к положительной регуляции транскрипции и ДНК-шаблон, были связаны с регуляцией транскрипции. Кроме, того три из пяти обогащенных путей KEGG могли быть связаны с метаболизмом белков, а именно, биосинтез валина, лейцина и изолейцина, метаболизм глицина, серина и треонина и метаболизм цистеина и метионина. В совокупности результаты исследований генов-кандидатов для признаков, связанных с образованием плодовых тел, представляют подробный взгляд на генетическую и молекулярную основу развития базидиом шиитаке. Гены, участвующие в реакции на стресс и передаче сигнала, воспринимают сигналы окружающей среды и играют важную роль в инициации плодового тела. На этапе регуляции транскрипции ряд транскрипционных факторов играют критическую роль в регуляции транскрипции формирования плодового тела. Наконец, гены, участвующие в деградации белков, ремоделировании клеточной стенки грибов, клеточной адгезии и критической регуляции клеточного цикла, выполняют функции в морфогенезе и развитии плодового тела у шиитаке. Полученные результаты расширяют набор инструментов для дальнейших исследований *L. edodes* и продвинули общее понимание генетической регуляции образования плодовых тел у макромицетов в целом (Zhang *et al.*, 2021).

Более ранние исследования, направленные на изучение генетики плодоношения *L. edodes*, были получены с помощью данных QTL-анализа, позволяющего определить локализацию и воздействие генов (Miyazaki *et al.*, 2010). Понимание молекулярных механизмов лежащих в основе формирования плодовых тел является важным подходом при культивировании базидиальных макромицетов. Были идентифицированы гены, контролирурующие признаки образования плодового тела, и определены функции этих генов, обнаружено 12 локусов, содержащих специфически и обильно экспрессирующиеся гены на стадии формирования плодовых тел *L. edodes*. Два гена, продукты которых являются ключевыми ферментами в

ферментации этанола, *pr1n009*, кодирующий алкогольдегидрогеназу и *pr130227*, кодирующий пируватдекарбоксилазу, были полностью косегрегированы друг с другом и близко расположены в геноме *L. edodes*. Ген *pr1n009* специфически экспрессировался на стадии первичного формирования плодового тела, что указывает на то, что спиртовое брожение может потребоваться на ранней стадии развития базидиом *L. edodes*. Было установлено, что ген *mfbc* играет роль на заключительном этапе формирования плодового тела и, как было обнаружено, является гомологом *Saccharomyces cerevisiae* YJR070C (Miyazaki *et al.*, 2004). Ген LEEST359 *L. edodes* является гомологом гена C-4 метилстеролоксидазы (*erg25*) *Schizosaccharomyces pombe* (Suizu *et al.*, 2008). Ген *pr1n006* кодировал фермент фосфатидилсериндекарбоксилазу, который катализирует декарбозилирование фосфатидилсерина с образованием фосфатидилэтаноламина (Miyazaki *et al.*, 2005). Ненасыщенные жирные кислоты, как составной элемент фосфатидилэтаноламина, являются важными соединениями для образования спор грибов (Roeder *et al.*, 1982). Авторы отмечают, что беспоровые или малоспоровые штаммы превосходны для культивирования, поскольку эти штаммы не вызывают генетического загрязнения в природе и не выступают в качестве аллергенов. Ранее такие штаммы макромицетов были получены путем мутагенеза (Ravishankar *et al.*, 2006). Выяснение функции гена *pr1n006* могут быть полезны для разработки беспоровых или малоспоровых штаммов базидиомицетов (Miyazaki *et al.*, 2010).

1.3.6 Транскриптомные изменения, происходящие при дифференциации дикариотического мицелия в примордии

Хотя некоторые гены, вовлеченные в процесс плодообразования, были идентифицированы, мало что известно о процессе дифференциации дикариотического мицелия в базидиомы. В попытке продвинуть понимание молекулярной основы развития плодового тела, был применен серийный анализ экспрессии генов (SAGE) для определения профилей экспрессии генов дикариотического мицелия и примордий *L. edodes*. Всего было получено 6363 тега (3278 для дикариотического мицелия и 3085 для примордия), 164 уникальных тега совпали с базой данных экспрессируемых последовательностей тегов (EST). Было обнаружено, что профили экспрессии генов дикариотического мицелия и примордиев сильно отличаются. Разница между профилями экспрессии дикариотического мицелия и примордий указывает, на то, что для развития плодового тела требуется определенный набор генов. Гены с высоким уровнем экспрессии в дикариотическом мицелии обычно были подавлены в примордиях и наоборот. Высокая экспрессия генов, кодирующих структурные белки, белки, обеспечивающие стабильный рост, и ферменты, катализирующие выработку энергии, которые поддерживают вегетативный рост гиф, наблюдалась в дикариотическом мицелии. При переходе к генеративным стадиям развития, в большом количестве представлены гены, кодирующие белки гидрофобины, гены транскрипции и трансляции становились более активными, структурных

генов становилось меньше, однако различные гены, участвующие во внутриклеточном транспорте и в реакции на стресс, стали более выраженными. Формирование плодовых тел может быть инициировано процессом, который характеризуется наличием определенных экологических проблем, стимулирующих специфическую сигнальную трансдукцию, которая вызывает инициацию перехода дикариотического мицелия к плодоношению. Эти генные продукты могут регулировать развитие плодового тела путем активного внутриклеточного трафика, а реконструкция протеома происходит посредством деградации, модификации и синтеза белков. Полученные результаты продвигают понимание развития плодового тела *L. edodes* и биологии грибов в целом (Chum *et al.*, 2008).

1.3.7 Транскриптомные изменения, происходящие при светоиндуцированном образовании коричневой мицелиальной пленки и плодовых тел

Изучалось светоиндуцированное образование коричневой мицелиальной пленки у базидиомицета *L. edodes*, характерного для шиитаке этапа морфогенеза, формирование которой связано с агрегацией гиф мицелия и предшествует образованию плодовых тел (Ветчинкина и Никитина, 2007). Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, не изучены, поэтому было предпринято сравнительное исследование с использованием РНК-секвенирования транскриптомов грибного мицелия, выращенного в условиях, способствующих и не способствующих, по мнению авторов, образованию коричневой мицелиальной пленки (Tang *et al.*, 2013). Этот высокопроизводительный подход глубокого секвенирования для изучения глобальной экспрессии генов был успешно использован для анализа различных физиологических особенностей немодельных организмов, где полные последовательности генома не доступны (Wang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). Чтобы получить представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе процесса образования индуцированной светом мицелиальной пленки у *L. edodes*, для секвенирования были отобраны образцы мицелия, выращенного в трех различных условиях: 30 дней темноты, 80 дней темноты и 30 дней темноты, за которыми следовали 50 дней на свету. Из трех условий роста образование данной структуры происходило только в последнем образце. Свет играет ключевую роль в формировании пленки у *L. edodes*, считают авторы, а количественный анализ и сравнение профилей экспрессии генов в трех образцах выявил несколько активированных генов, связанных с фоторецепцией грибов и биосинтезом пигмента. Уровни экспрессии генов WC-1 и WC-2, вместе с фитохромом, фоторецептором, участвующим в восприятии красного света у грибов (Blumenstein *et al.*, 2005; Froehlich *et al.*, 2005), были значительно повышены в третьем варианте образца мицелия. Сообщается, что фитохром является светорегулируемым комплексом, запускающим развитие и вторичный метаболизм у *Aspergillus nidulans* (Bayram *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2008). Представленные данные экспрессии, по-видимому,

предполагают, что белки WC и фитохром могут также служить фоторецепторами при формировании коричневой мицелиальной пленки. Кроме того, было обнаружено, что грибные специфические факторы транскрипции, входящие в состав данной мицелиальной структуры, которые играют ключевую роль в координации вторичного метаболизма и процессов дифференциации (Bayram and Braus, 2012), также значительно активируются при сравнении профиля экспрессии с другими вариантами мицелия (Tang *et al.*, 2013). Однако роль этих генов в образовании мицелиальной пленки до сих пор остается неясной.

Было также установлено, что экспрессия генов, кодирующих мультиферментные комплексы поликетидсинтазы, отвечающие за синтез низкомолекулярных биологически активных веществ, O-метилтрансферазы, цитохром P450, монооксигеназы, оксидоредуктазы и лакказы, повышалась в мицелии, образующем коричневую мицелиальную пленку, что указывает на возможную роль в производстве пигмента (Tang *et al.*, 2013). Многие окислительно-восстановительные этапы в биосинтезе афлатоксина опосредуются монооксигеназами, связанными с цитохром P450, а O-метилтрансфераза катализирует реакции метилирования, участвующие в биосинтезе желтого пигмента афлатоксигенными штаммами *Aspergillus* (Bhatnagar *et al.*, 2003). Генный кластер, включающий гены, кодирующие поликетидсинтазу и лакказу, контролировали биосинтетический путь другого поликетидного пигмента, ауурофузарина, в *Fusarium graminearum* (Frandsen *et al.*, 2006). Предыдущие исследования также связывали активность фермента лакказы с развитием плодового тела (Ohga *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004) и выработкой пигмента (Leatham and Stahmann, 1981) в съедобных грибах.

Кроме того, авторы указывают на то, что сигнальные пути MAP-киназы и двухкомпонентная фосфорилирующая система (Kanehisa and Goto 2000; Kanehisa *et al.*, 2012) играют критически важную роль в передаче светового сигнала и регуляции метаболизма и могут быть напрямую вовлечены в формирование коричневой мицелиальной пленки. Исследования указывают на то, что MAP-киназы регулируют различные активности вторичных метаболитов у *A. nidulans* (Atoui *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2012) и *C. lagenarium* (Takano *et al.*, 2000), а также контролируют биосинтез меланина под воздействием света у *B. cinerea* (Liu *et al.*, 2011). Двухкомпонентная фосфорилирующая система является основным путем передачи сигналов через автофосфорилирование гистидинкиназы, в ответ на изменения окружающей среды (West and Stock 2001). Отмечается повышенная экспрессия активности фермента гистидинкиназы в мицелии, выращенном на свету, что согласуется с предыдущими исследованиями, связывающими гистидинкиназу с образованием примордиев и развитием плодовых тел у *L. edodes* (Szeto *et al.*, 2008). В заключении авторы суммируют, что данные транскриптомного анализа указывают на зависимость механизма образования коричневой пленки *L. edodes* от фоторецепторов, включая фитохром, а также от систем передачи сигнала, включая двухкомпонентную фосфорилирующую систему и сигнальные пути MAPK, которые

принимают световой сигнал и активируют гены, участвующие в биосинтезе пигментов, связанных с образованием данной морфоструктуры (Tang *et al.*, 2013).

Были охарактеризованы молекулярные механизмы, фенотипические изменения и транскрипционные особенности, связанные с аномальным образованием коричневой мицелиальной пленки базидиомицета *L. edodes* (Yoo *et al.*, 2019). Проведен транскриптомный анализ различных фенотипов: вегетативного мицелия, нормальных коричневых и дефектных темно-желтых частично коричневых пленок, которые подвергались воздействию различных световых условий. Анализ выявил кластеры генов, специфичных для фенотипов коричневой пленки, индуцированной светом. Эти гены были связаны с фоторецепторами, которые используют флавины (FMN и FAD), в качестве хромофоров для восприятия синего света, с сигнальными каскадами MAPK и рецепторами, сопряженными с G-белками (GPCR), также известные как серпантинные рецепторы, составляющие большое семейство трансмембранных рецепторов, выполняющих функцию активаторов внутриклеточных путей передачи сигналов. А также меланогенезом через активацию тирозиназ и деградацией клеточной стенки глюканазами и хитиназами, что предполагает, что эти процессы участвуют в формировании меланизации мицелия у *L. edodes*. Интересно, что гены гидрофобинов, такие как SC1 и SC3, показали разные уровни экспрессии в нормальных коричневых и аномальных мицелиальных пленках, что, по мнению авторов, указывает на способность этих генов принимать участие в инициации образования плодового тела, а также в формировании дикариотического мицелия. Кроме того, была выявлена повышенная регуляция генов, содержащих домен гликозидгидролазы, в нормальной коричневой пленке, но не в аномальном фенотипе пленки, что возможно указывает на то, что деградация клеточной стенки в нормальном фенотипе коричневой пленки имеет решающее значение в процессах развития, связанных с инициацией и формированием плодовых тел. Авторы считают, что полученные результаты предоставляют информацию для дальнейших исследований механизмов формирования коричневой мицелиальной пленки у *L. edodes* и основу для будущей селекции шиитаке (Yoo *et al.*, 2019).

Были предприняты попытки изучения молекулярных механизмов метаболизма *L. edodes*, связанных с экспрессией и регуляцией генов контролирующих процесс образования плодовых тел с помощью света (Kim *et al.*, 2020). Сравнивали морфологические изменения и экспрессию генов в плодовых телах, выращенных при синем свете и в постоянной темноте, результаты показали, что свет в первую очередь индуцировал рост шляпки (диаметр и толщину). С другой стороны, культивирование без доступа света способствовало развитию длины ножки. Анализ транскриптома *L. edodes* в условиях культивирования при синем свете и в темноте с использованием технологии секвенирования Illumina идентифицировало 8 активированных генов в условиях синего света. Активированные продукты генов были представлены белками теплового шока DDR48, фасцилина и четырех углеводной эстеразы, а также белок,

содержащий домен связывания FAD и NAD. Данные молекулы участвуют в морфологическом развитии, клеточной адгезии и влиянии на структуру клеточных стенок при развитии плодового тела, а также на фоторецептор синего света при образовании пигмента. Это исследование дополняет информацию о молекулярных механизмах, лежащих в основе роли синего света в росте и развитии плодовых тел, и может способствовать программам селекции для улучшения выращивания грибов (Kim *et al.*, 2020).

1.4 Генетический механизм реакции *L. edodes* на температурный стресс

Ряд исследований посвящен функциональному анализу белков теплового шока (DnaJ), которые играют важную роль в росте и развитии организма и устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам. Тепловой стресс может привести к огромным потерям в процессе экстенсивного культивирования базидиомицета *L. edodes*, которое может быть устранено благодаря пониманию механизмов защиты от теплового стресса. С помощью биоинформатического анализа были идентифицированы и проанализированы 29 предполагаемых генов DnaJ в мицелии *L. edodes*. В промоторной области генов LeDnaJ были обнаружены множественные цис-элементы, связанные с фитогормонами и стрессом. Кроме того, с помощью анализа qRT-PCR было показано, что белки LeDnaJ могут участвовать в реакциях на множественные стрессы, например в ответ на тяжелые металлы (кадмий) было индуцировано 79.31% генов LeDnaJ, 55.17% генов были индуцированы патогенами *Trichoderma atroviride* и 37.93% генов индуцировались тепловым стрессом. Анализ qRT-PCR также показал, что все LeDnaJ экспрессируются, по крайней мере, на одной стадии развития базидиомицета, что указывает на то, что они могут быть вовлечены в процесс роста *L. edodes* и ответ на абиотические и биотические стрессы (Wang *et al.*, 2019).

Для выяснения физиологического механизма реакции *L. edodes* на высокотемпературный стресс, два штамма шиитакэ с разной толерантностью были протестированы при разной продолжительности высокой температуры, и результаты показали, что произошли значительные изменения в их фенотипах и физиологии. Для дальнейшего изучения механизма реакции, с помощью метода газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ГХ-МС анализ) и с использованием специализированных статистических и биоинформационных инструментов, были выявлены изменения в метаболоме мицелия *L. edodes* после различных обработок при высокой температуре на основе нецелевых метаболитов, далее была принята целевая метаболомика для проверки результатов анализа. Анализ с применением базы данных KEGG показал, что метаболические пути со значительными изменениями включали те, которые связаны с метаболизмом аминокислот, гликолизом, циклом трикарбоновых кислот и метаболизмом углеводов. Было показано, что штамм, у которого отмечалась репрессия в метаболизме аминокислот и углеводов, был более чувствительным к теплу, что согласуется с

физиологическими фенотипическими характеристиками двух штаммов при высокотемпературном стрессе. В то же время при высокой температуре снижение промежуточных продуктов в гликолизе и цикле трикарбоновых кислот приводило к углеродному голоданию и недостаточному энергетическому метаболизму, тем самым подавляя рост *L. edodes*. Кроме того, результаты также показали, что метаболиты, продуцируемые различными штаммами шиитаке при высокотемпературном стрессе, в основном одинаковы. Однако различные штаммы имеют видовую специфичность, поэтому изменения в содержании метаболитов, участвующих в ответе на высокотемпературный стресс, различаются. Данное исследование дает теоретическую основу для дальнейшего понимания механизма реакции *L. edodes* на высокую температуру и может быть использовано для создания системы оценки штаммов, устойчивых к высоким температурам (Zhao *et al.*, 2019).

Был проведен геномный анализ и идентифицированы гены белков теплового шока (HSP) по всему геному базидиомицета *L. edodes*. В соответствии с молекулярной массой и филогенетическим анализом 34 гена LeHSP были классифицированы на шесть подсемейств. Анализ последовательности показал, что белки LeHSP из одного и того же подсемейства имеют консервативные домены и от одного до пяти схожих мотивов. В промоторах LeHSPs было предсказано различное количество элементов теплового шока (HSE). Профили экспрессии белков теплового шока показали, что термоустойчивость разных штамма может быть связана с высокими уровнями транскрипта LeHSPs в ответ на тепловой стресс. Количественный анализ ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) 16 генов LeHSP в штаммах *L. edodes* подтвердил их стресс-индуцируемые паттерны экспрессии при тепловом стрессе. Авторы указывают на то, что предоставленная информация об эволюции и функции LeHSPs, закладывает теоретическую основу для селекции термоустойчивых сортов базидиомицета *L. edodes* (Zhao *et al.*, 2023).

Изучен молекулярный механизм устойчивости к высоким температурам у мутантного штамма *L. edodes*, показавшего исключительную термоустойчивость и продемонстрировавшего ускоренное восстановление мицелия после теплового стресса. С помощью анализа РНК-секвенирования было обнаружено, что большинство дифференциально экспрессирующихся генов связаны с такими функциями, как фолдинг и рефолдинг белка, разворачивание белка и реакция на тепло, которые тесно связаны с белками теплового шока. Кроме того, результаты qRT-PCR показали значительное накопление генов, связанных с тепловым шоком, в мицелии при тепловом стрессе. Анализ ГХ-МС показал повышенные уровни трегалозы, аспартата и глутамата при воздействии теплового стресса. Высоко экспрессирующиеся гены, участвующие в данных метаболических путях, были преимущественно обнаружены в мутантном штамме *L. edodes*, устойчивом к тепловому стрессу. В совокупности данные результаты указывают решающую роль белков теплового шока (HSP) в термоустойчивых механизмах, потенциал накопления трегалозы в мицелии для повышения устойчивости к тепловому стрессу и

индукцию накопления аспартата и глутамата в ответ на тепловой стресс. Полученные результаты, по мнению авторов, проливают свет на молекулярные механизмы, лежащие в основе термоустойчивости мутантного штамма *L. edodes* и указывают на его потенциальное применение при выращивании в условиях высоких температур (Zhang *et al.*, 2023).

Было установлено участие белков теплового шока и процесса метаболизма индолилуксусной кислоты в термоустойчивости базидиомицета *L. edodes*. Используя термоустойчивые и термочувствительные штаммы шиитаке, был проведен комбинированный протеомный и транскриптомный анализ реакции данной культуры на тепловой стресс. Влияние гена теплового шока LeDnaJ на термоустойчивость и биосинтез индолилуксусной кислоты в мицелии *L. edodes* было проанализировано с помощью метода сверхэкспрессии. Результаты протеома показали, что белки теплового шока и ключевые ферменты, участвующие в процессе метаболизма триптофана и индолилуксусной кислоты, были более высоко выражены у термоустойчивых штаммов, и менее у термочувствительных штаммов, что демонстрирует, что белки теплового шока и триптофан, а также путь метаболизма индолилуксусной кислоты должны играть важную роль в термотолерантности. Сверхэкспрессия гена LeDnaJ в термоустойчивых штаммах показала лучшую толерантность грибных культур к тепловому стрессу. Также было отмечено внутриклеточное накопление индолилуксусной кислоты в термоустойчивых штаммах (в 8 раз больше), а экзогенная индолилуксусная кислота, по мнению авторов, повышала устойчивость штаммов *L. edodes* к тепловому стрессу. Таким образом, полученные данные подтверждают ключевую роль белков теплового шока LeDnaJ, триптофана и индолилуксусной кислоты в повышении термотолерантности грибов (Wang *et al.*, 2018a).

В различных живых организмах, включая животных, высшие растения, зеленые водоросли, грибы и бактерии, широко распространены Δ -12 жирнокислотные десатуразы (FAD2), которые активно регулируют реакции на стресс и клеточную дифференцировку. Многие исследования указывают на важную роль в растениях генов FAD2, кодирующих ключевой фермент, участвующий в производстве полиненасыщенных жирных кислот необходимых в устойчивости растений к холоду (Craig *et al.*, 2008; Dar *et al.*, 2017). Однако исследования по регуляции экспрессии данных генов в грибах при высокотемпературном стрессе редки, как и функции белков FAD2 при реакциях грибов на абиотические стрессы. В исследовании Yang с соавторами были идентифицированы шесть гомологичных генов FAD2 на основе последовательности генома *L. edodes*. Результаты показали, что белки FAD2 содержат три консервативных богатых гистидином региона (HXXXH, HXXHH и HXXHH), которые включают восемь остатков гистидина. С помощью ПЦР-РТ была исследована экспрессия шести гомологичных генов FAD2 после теплового воздействия на мицелий *L. edodes*, в результате было показано, что все шесть генов FAD2 участвовали в реакции на тепловой стресс в грибной культуре. Интересно, что во время теплового стресса уровни транскрипции FAD2-2 и FAD2-3 в

мутагенном термоустойчивом штамме были в целом ниже, чем в штамме дикого типа. В связи с большей термостабильностью мутантного штамма, он показал более низкую активность, чем термочувствительный штамм дикого типа, на который высокая температура оказала большее влияние. Также содержание линолевой кислоты и активность фермента FAD2 в мутагенном термоустойчивом штамме были ниже, чем в штамме дикого типа. Исследования показали, что изменения активности FAD тесно связаны с реакцией растений на тепловой стресс, и FAD участвует в регулировании текучести клеточной мембраны и снижении повреждений, вызванных тепловым стрессом, катализируя десатурацию жирных кислот; а именно, в жирнокислотные цепи вводится двойная связь, тем самым увеличивая долю ненасыщенных жирных кислот (Xiao *et al.*, 2022). Активность фермента FAD2 в мицелии *L. edodes* снизилась в штамме дикого типа после теплового стресса, но существенно не изменилась в мутагенном термоустойчивом штамме, что согласуется с изменениями в уровнях транскрипции генов FAD2-2 и FAD2-3. Это может быть связано с тем, что доля ненасыщенных жирных кислот была снижена в диком штамме за счет снижения активности FAD2 после теплового стресса, тем самым уменьшая ущерб, вызванный тепловым стрессом. Адаптация мембраны к температурным сдвигам в значительной степени зависит от регулировки насыщенности жирных кислот в мембранных липидах. Когда мицелий *L. edodes* подвергается тепловому стрессу, FAD2-2 и FAD2-3 могут регулировать уровни экспрессии генов, чтобы снизить содержание линолевой кислоты для улучшения адаптации к тепловому стрессу. Таким образом, результаты исследования показали, что FAD2-2 и FAD2-3 играют важную роль в синтезе линолевой кислоты во время теплового стресса. Также, полученные данные, по мнению авторов, обеспечивают существенную основу для углубленного изучения ненасыщенных жирных кислот, особенно линолевой кислоты, и связанных с ними белков у базидиомицета *L. edodes* при тепловом стрессе и дают теоретические указания для селекции новых сортов шиитаке при высоких температурах (Yang *et al.*, 2024).

1.5 Молекулярные механизмы, лежащие в основе токсического действия и накопления тяжелых металлов

Серьезной проблемой, на которую направлено внимание многих исследователей, является изучение молекулярных механизмов токсического действия тяжелых металлов, которые могут накапливаться в течение жизни организма и даже небольшая передозировка многих из них может быть опасна для здоровья человека. На накопление тяжелых металлов в съедобных грибах могут влиять внешние факторы, например среда культивирования, и внутренние факторы, такие как способность вырабатывать различные органические кислоты, активные ферменты, а также генетические особенности разных культур (Huang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Mleczek *et al.*, 2018). Культура *L. edodes* легко накапливает тяжелые металлы, и высокое содержание кадмия может неблагоприятно влиять на здоровье человека (Mleczek *et*

al., 2017). Например, металлотионеин, который распространен в съедобных грибах, может образовывать комплексы с тяжелыми металлами, что приводит к их накоплению. Кроме того, активные группы на клеточной стенке, такие как сульфгидрильные, карбоксильные и гидроксильные, могут реагировать с ионами тяжелых металлов с образованием нерастворимых веществ (Xu *et al.*, 2001). Молекулярные механизмы лежащие в основе накопления тяжелых металлов в грибах, остаются малоизученными. Между тем знание определенных генов и их экспрессии, связанной с накоплением тяжелых металлов в различных штаммах *L. edodes*, может способствовать разработке улучшенных съедобных штаммов с их меньшим содержанием, а также штаммов, которые легко поглощают тяжелые металлы и могут быть использованы для очистки окружающей среды от загрязнения. Для исследования механизмов реакции базидиомицета *L. edodes* на кадмий были выращены и подвергнуты его воздействию два генотипа шиитакэ с различной способностью к накоплению тяжелых металлов, в частности кадмия Cd, чрезвычайно токсичного для здоровья человека. Концентрации тяжелого металла в мицелии тестируемых генотипов значительно различались, примерно в три раза, после 7 часового воздействия Cd. После чего было проведено РНК-секвенирование для идентификации генов, участвующих в транспорте и метаболизме кадмия (Yu *et al.*, 2020). Было оценено 24592 транскрипта на предмет выявления дифференциально экспрессирующихся генов (DEG) после воздействия кадмия. Изменения транскрипции были связаны с трансмембранным транспортом, переносом глутатиона и цитохромом P450, что указывает на то, что эти гены могут быть вовлечены в устойчивость к Cd у базидиомицета *L. edodes*. Также после воздействия кадмия, были идентифицированы DEG, кодирующие белки, участвующие в нескольких биологических путях, включая мембранные транспортеры, модификацию клеточной стенки, реакцию на окислительный стресс, трансляцию, деградацию и сигнальные пути. Обогащение клеток кадмием активировало сигнализацию MAPK и реакцию на антиоксидантный стресс, что впоследствии может изменить передачу сигнала и внутриклеточный баланс окисления/восстановления (Yu *et al.*, 2020).

Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями, в которых были идентифицированы гены, участвующие в ранней реакции на воздействие кадмия, включая гены суперсемейства основных посредников (MFS), мембранных транспортных белков, обеспечивающих перемещение небольших растворенных веществ через клеточные мембраны, митоген-активируемые протеинкиназы (MAP), цитохромпероксидазы (Zhao *et al.*, 2015). Согласно результатам GO и KEGG, дифференциально экспрессирующиеся гены участвуют во многих биологических путях, включая связывание металлов, трансмембранный транспорт и антиоксидантную активность. Полученные данные указывают на то, что в накоплении кадмия *L. edodes* могут быть задействовано несколько биологических путей, тяжелые металлы перехватываются клеточной стенкой и транспортируются через переносчики, расположенные в

плазматической мембране (Severoglu *et al.*, 2013), или хелатируются биоактивными соединениями в плазматической мембране (Bellion *et al.*, 2007). Кроме того, было идентифицировано несколько возможных генов-кандидатов, участвующих в накоплении Cd, включая основные гены суперсемейства фасилитаторов, белки теплового шока и мультимедную оксидазу. Данное исследование по сравнению транскриптомов двух штаммов *L. edodes* с различной способностью к накоплению кадмия дает ценную информацию о выращивании грибов с меньшей способностью к накоплению тяжелых металлов в мицелии, а также способствует созданию модифицированных штаммов для контроля загрязнения окружающей среды (Yu *et al.*, 2020).

1.6 Заключительные замечания

В какой момент происходит инициация образования морфогенных структур, чем она обусловлена, как меняется транскрипционный профиль и какие метаболические процессы активируются/репрессируются на разных стадиях морфогенеза, что необходимо для формирования правильного транскрипционного профиля, отвечающего за переход в фазу плодоношения? В вопросах, касающихся молекулярно-физиологических аспектов морфогенетического развития базидиальных грибов, остается много неясного. Для понимания регуляции механизмов морфогенеза и факторах, определяющих формирование базидиом макромикетов, представляется важным исследование транскрипционной активности генов, связанных с процессами роста и морфообразования, выявление специфичных генов и белков-маркеров морфогенетических процессов и их участия в особенностях цитодифференцировки и плодообразования грибов.

В последнее время развитие методов высокопроизводительного секвенирования перевело исследования транскриптомов живых организмов на новый уровень, позволяя получать большой массив информации о профиле экспрессии всех генов, что формирует ценную базу данных для масштабной характеристики метаболизма. На момент начала нашей работы по данному направлению, было представлено крайне мало публикаций, в которых отражается молекулярно-генетическая, ультраструктурная, метаболическая характеристика полного процесса развития базидиальных макромикетов. Исследования, касающиеся секвенирования немодельных организмов с аннотацией полученных данных, находились на начальном этапе. Первые попытки полногеномного секвенирования *de novo* вегетативного мицелия *L. edodes*, были представлены практически без аннотации, и для характеристики генома информации, по мнению самих авторов, было недостаточно. Требовалась полномасштабная функциональная аннотации генов грибного метаболизма в процессе полного цикла развития базидиомицета *L. edodes*.

ГЛАВА 2. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

2.1 Базидиальные макромицеты как источник биологически активных и лекарственных соединений

Человечество использует грибы с незапамятных времен в качестве источника питания и в народной медицине. Современные исследования в последние десятилетия стремятся вывести накопленные столетиями знания об уникальных свойствах лекарственных грибов на качественно новый уровень. Потенциал грибов, в плане получения высокоэффективных биологически активных и лекарственных препаратов огромен, и это направление только начинает набирать популярность. В настоящее время оцениваются питательные свойства грибов, а также ценность их фармакологических свойств. Они составляют обширный и все же в значительной степени неосвоенный источник новых мощных фармацевтических продуктов. Многие, если не все, базидиальные макромицеты содержат спектр разнообразных биологически активных высокомолекулярных (в основном полисахариды) и низкомолекулярных соединений (тритерпены, лактоны, алкалоиды, лектины) в плодовых телах, вегетативном мицелии и среде культивирования (Zaidman *et al.*, 2005; Wasser, 2010; Chang and Wasser, 2012; De Silva *et al.*, 2013). Недавно изученные лекарственные свойства базидиальных грибов включают антиоксидантные, антибиотические, противоопухолевые, гепатопротекторные, противовирусные, противодиабетические, иммуностимулирующие, противовоспалительные, противоаллергенные эффекты; способность регулировать работу сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем (Wasser and Weis, 1999; Bender *et al.*, 2001; Ikekawa, 2001; Krasnopolskaya *et al.*, 2005; 2008; 2015; Wasser, 2002; Lobanok *et al.*, 2003; Akamatsu *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004; Lin, 2004; Konska, 2006; Xie *et al.*, 2006; Israilides *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2009; Bisen *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Karwa and Rai, 2012; Wu *et al.*, 2012b; Yukawa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014; Deepalakshmi and Mirunalini, 2016; Ya, 2017; Cheng *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2022). В современной медицинской практике ряда азиатских стран (Япония, Китай, Корея) все больше появляется биологически активных добавок и лекарственных препаратов на основе культивируемых лекарственных макромицетов, которые не являются патогенами и не токсичны для человека. Данные соединения широко применяют для лечения целого ряда заболеваний, таких как артрит, бессонница, бронхиальная астма, гастрит, гепатит, неврастения, лечение различных форм рака (Reshetnikov *et al.*, 2001; Pöder, 2005; Van Griensven, 2009; Wasser, 2010; Hyde *et al.*, 2010; Chang and Wasser, 2012; Lindequist, 2013) (Рисунок 1).

Препараты из базидиомицетов сейчас предлагаются, в основном, виде биологически активных добавок, которые представляют собой грубые экстракты или высушенные плодовые

тела, и применяются для профилактики или облегчения болезней, а также обеспечивают сбалансированное здоровое питание. При таком подходе биохимические и фармакологические свойства огромного количества лекарственных грибов остаются нераскрытыми. Это еще раз показывает, что нынешнее состояние проблемы – применение активных метаболитов высших грибов в практической медицине – представляет огромный потенциал.



Рисунок 1 – Биологически активные грибные метаболиты и их свойства

2.2 Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства грибных метаболитов

Одной из приоритетных и актуальных проблем современной медицины является борьба с онкологическими заболеваниями. Рак – это широкий термин, используемый для обозначения злокачественных новообразований, включающий огромное разнообразие различных видов заболеваний, которые могут развиваться в организме. Рак это проблема современности и хотя, это заболевание, вероятно, всегда сопровождало человечеству, однако последние прогнозы относительно заболеваемости раком в мире неутешительны. Это заболевание является основной причиной смерти во всем мире, количество раковых больных из года в год неизменно растет и эта тенденция, по всем показателям сохранится (Stewart and Wild, 2014). Важной задачей, направленной на решение данной проблемы, является поиск и изучение биологически активных

веществ природного происхождения, обладающих противоопухолевым действием и минимальными побочными эффектами, и внедрение высокоэффективных нетоксичных лекарственных препаратов в терапию онкологических заболеваний. Известно, что лечение онкологических заболеваний строится по трем основным направлениям: прямое цитостатическое воздействие на опухоль; стимуляция антиоксидантной активности и протекция от токсического действия, как самих цитостатиков, так и продуктов распада. Основной проблемой, связанной с лечением рака, являются последствия после лучевой и химиотерапии, в результате чего происходит сильное ослабление естественной иммунной защиты пациента. Поэтому особенно важно изыскивать биологически активные соединения, способные значительно уменьшать побочные эффекты противораковой терапии и помогать в дальнейшем торможению роста опухоли и метастазов, за счет активации естественных иммунных ответов организма. Такие лекарственные препараты могут использоваться в качестве поддерживающего лечения для профилактики рака, дополняя общепринятые методы лечения, а в некоторых случаях, и самостоятельно. В связи с этим наибольшее предпочтение при профилактике и терапии злокачественных новообразований должно быть отдано биологически активной композиции, сочетающей в себе целый комплекс определенных свойств, например, цитостатическое и иммуномодулирующее действие или цитостатическое действие и свойство угнетать ангиогенез опухоли. Поскольку распад опухоли сопровождается обширным некрозом и следующим за ним воспалением, то действие противоопухолевой композиции может быть расширено за счет включения противовоспалительных, иммуностимулирующих, антимикробных и других эффектов. Культивируемые макромицеты являются продуцентами широкого спектра биологически активных и лекарственных соединений, различающихся направленностью и механизмом своего действия. Лекарственные препараты из подобного природного сырья, могут использоваться не только для торможения развития опухолей и предотвращать образование метастазов, но и уменьшать побочные эффекты химио- и радиотерапии.

Большинство грибов с иммуномодулирующей и противораковой активностью относятся к отделу *Basidiomycota*. Наиболее часто для получения высокоактивных метаболитов используют плодовые тела базидиальных макромицетов: *G. lucidum*, *Hericium erinaceus*, *L. edodes*, *Tremella fuciformis*, *Tricholoma matsutakei*, *G. frondosa*, *A. bisporus*, *Coriolus versicolor*, *P. ostreatus* и *Inonotus obliquus*. В последние десятилетия наличие биоактивных соединений грибов было подтверждено многими исследованиями. В последнее время все чаще предлагается использовать высокоэффективные и нетоксичные натуральные метаболиты базидиомицетов, которые, по мнению многих исследователей, обладают противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью, способны ограничить пролиферацию клеток и метастазирование, вызвать апоптоз раковых клеток, регулировать микроокружение опухоли и корректировать различные звенья иммунитета.

2.3 Изучение противоопухолевой и иммуномодулирующей активности полисахаридов лекарственных базидиомицетов

В качестве ценного сырья для получения высокоэффективных противоопухолевых и иммуностимулирующих веществ используют в основном полисахаридные фракции плодовых тел макромицетов. Грибные полисахариды показали себя как эффективные лекарственные средства, обладающие противовоспалительными, противоаллергенными, гепатопротекторными, антибиотическими, антиоксидантными и противовирусными свойствами; немаловажным является отсутствие токсического действия на организм человека (Wasser, 2014; Sharma *et al.*, 2023; Randeni and Xu, 2024). Большинство исследований показывают, что противоопухолевые свойства грибных полисахаридов часто обусловлены не прямой активностью на уничтожение опухолей, а посредством их эффектов иммуностимуляции или иммуномодуляции (Wasser, 2014; Xiao *et al.*, 2020). Лекарственные грибы представляют собой неограниченный источник полисахаридов с противоопухолевыми и иммуностимулирующими свойствами, что важно для современной медицины (Chaturvedi *et al.*, 2018).

Грибные полисахариды классифицируют по разным группам в соответствии с разными параметрами: в зависимости от их структуры (линейные и разветвленные), составом сахара (гомо- и гетерополисахариды), типом связей между мономерами (β -(1,3), β -(1,6) или α -(1,3) и т. д.). Для достижения полной активности некоторым полисахаридам необходимо сформировать более сложную конформацию (Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008b; Xin *et al.*, 2018). Полисахариды из грибов с противоопухолевым действием сильно различаются по своей химической структуре и физическим свойствам, но большинство из них относятся к консервативным β -глюканам с основой из остатков глюкозы, связанных β -(1,3)-гликозидными связями и прикрепленной β -(1,6) ветвью, хотя встречаются и другие боковые ветви, такие как (1,2) и (1,4) ветвления (Devi and Maiti, 2016; Snarr *et al.*, 2017). В основном грибные лекарственные соединения продемонстрировавшие противораковую активность были представлены β -глюканами или β -глюканами, связанными с различными белками. Стоит отметить, что последние показали большую иммуностимулирующую активность, чем свободные глюканы. Базидиальные β -глюканы применимы для восстановления ослабленной иммунной системы, особенно при инфекционных заболеваниях и онкологии, для помощи в восстановлении пациентов после химиотерапии и радиотерапии, полезны для людей с активным и стрессовым образом жизни и спортсменов. Наиболее важным по проявлению противоопухолевых и иммуностимулирующих свойств в лекарственных грибах являются полисахариды, которые принадлежат к семейству 1,3- β -глюканов. Противоопухолевая активность грибных полисахаридов в основном зависит от молекулярной массы, более эффективными кажутся глюканы с высокой молекулярной массой по сравнению с низкомолекулярными, степени разветвленности, конформации и структурной модификации

полисахаридов. Биологически активные полисахариды имеют уникальные структуры, и они имеют различия у разных видов грибов (Devi *et al.*, 2016; El Enshasy and Hatti-Kaul, 2013; Meng *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2012). Сообщалось, что хотя биоактивных водонерастворимых полисахаридов выявлено гораздо больше, чем количество водорастворимых полисахаридов, однако последние обладали очень высокой противоопухолевой активностью, по сравнению с гидрофобными полисахаридами. Было отмечено также, что содержание белкового компонента усиливает их биологическую активность (Paterson, 2006; Siwulski *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2021).

Механизмы действия и эффективность структурно различных β -глюканов, по-видимому, зависят от их способности связываться с конкретными клеточными рецепторами, что приводит к активации множества сигнальных путей, которые, в свою очередь, способствуют различным иммунным реакциям в пораженных клетках (Chen and Seviour, 2007). В настоящее время биологическая активность и механизмы действия полисахаридов активно изучаются, последние исследования показывают, что полисахариды не только стимулируют иммунную систему, но и модулируют специфические клеточные реакции, ингибируя пролиферацию раковых клеток путем воздействия на различные сигнальные пути, индуцируя апоптоз, аутофагию и ингибируя метастазирования раковых клеток. Было также обнаружено, что полисахариды грибов препятствуют онкогенезу и метастазированию опухоли, напрямую подавляя рост опухолевых клеток и косвенно усиливая функции иммунной системы. Эти полисахариды взаимодействуют с многочисленными клеточными сигнальными путями, которые влияют на развитие и прогрессирование рака, контролируют выживание, рост и дифференцировку клеток, а также играют роль в коррективке иммунного микроокружения опухоли (Ruan *et al.*, 2023).

Изучение активности полисахаридов L. edodes

В настоящее время проводятся активные исследования, связанные с противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью полисахаридов грибоного происхождения и их применением при лечении разных видов рака. Был установлен эффективный терапевтический потенциал β -1,6; β -1,3-глюкана (лентинана) из *L. edodes* в отношении воспалительного заболевания кишечника и рака толстой кишки. Лентинан снижал количество опухолей, инфильтрацию воспалительных клеток, атипичную гиперплазию и ядерную атипию, также было отмечено восстановление структуры микробиоты кишечника. Механизм действия лентинана авторы связывают с ингибированием воспалительных реакций, опосредованных сигнализацией Toll-подобного рецептора 4 (TLR4)/NF- κ B (Liu *et al.*, 2018). Полисахарид *L. edodes* значительно повышал активность антиоксидантных ферментов сыворотки крови, дозозависимо увеличивал в сыворотке и слизистой оболочке полости рта уровень провоспалительных цитокинов (интерлейкина IL-1b и фактор некроза опухоли TNF- α) у крыс с язвой полости рта (Yu *et al.*, 2009). Данные белки усиливают воспалительный процесс в

организме с целью защиты от чужеродных антигенов. Считается, что фактор некроза опухоли и интерлейкин-1 являются основными цитокинами острого воспаления, помимо участия в воспалительных реакциях, они также способствуют некрозу опухолевых клеток (Fajgenbaum and June, 2020). Результаты нескольких исследований показывают, что заживление язв полости рта значительно увеличивалось при лечении данным полисахаридом (Yu *et al.*, 2009). Этанольный экстракт из плодовых тел *L. edodes* значительно снижал пролиферацию клеток карциномы кожи (CH72), не оказывая при этом цитотоксического действия на неопухолевые клетки кератиноциты. Было обнаружено, что метаболиты *L. edodes* снижали пролиферацию клеток и индуцировали апоптоз в зависимости от времени и дозы в клетках карциномы (Gu and Belury, 2005).

Было исследовано влияние на иммуномодулирующие и цитопротекторные свойства двух экстрактов полисахарида лентинан – IH-Lentinan (IHL) и Carbosynth-Lentinan (CL), с использованием моделей повреждения легких и фагоцитоза макрофагов *in vitro*. Экстракт CL содержал больше α -глюканов и, меньше β -глюканов. Два экстракта лентинана продемонстрировали различную иммуномодулирующую активность. Оба снижали активацию NF- κ B, индуцированную цитокинами, в клетках A549, при этом экстракт IHL оказался более эффективным при низких дозах. В активированных макрофагах, полученных из клеток THP-1, экстракт CL более эффективно ослаблял продукцию провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-8, IL-2, IL-6, IL-22), а также TGF- β и IL-10. Экстракт CL ослаблял ранний апоптоз, индуцированный окислительным стрессом, экстракт IHL ослаблял поздний апоптоз. Исследование продемонстрировало значительные физико-химические различия между экстрактами лентинана, которые оказывают различное иммуномодулирующее и цитопротекторное действие на легкие *in vitro*, что также может иметь положительное значение для потенциальной терапии против COVID-19, направленной на подавление цитокинов (Murphy *et al.*, 2020).

Изучение активности полисахаридов G. frondosa

Большое количество научных и клинических исследований показало, что полисахариды *G. frondosa*, помимо многих других полезных биологических активностей, обладают противоопухолевыми свойствами и усиливают иммунитет, улучшая способность организма уничтожать опухолевые клетки, без каких-либо побочных эффектов. Подобные биологически активные соединения действуют главным образом через стимуляцию иммунной системы организма. Этот процесс включает в себя активацию дендритных клеток, лимфоцитов (NK-клеток и Т-клеток), макрофагов и производство цитокинов. Полисахариды из плодовых тел и мицелия данного базидиомицета обладают цитотоксичностью к различным раковым клеточным линиям *in vitro* и проявляют противоопухолевую активность *in vivo*, демонстрируя значительное ингибирование солидных опухолей. В диапазоне экспериментальных доз с увеличением концентрации полисахаридов скорость ингибирования увеличивается, а вес

опухоли уменьшается (Jingsong *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2009a, b; Mao *et al.*, 2015; He *et al.*, 2018, 2019; Yu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2023). Противоопухолевые свойства полисахаридов связаны в основном с активацией разных компонентов иммунной системы, приводящей к предотвращению образования метастазов и индукции опухолеспецифического иммунитета (Nanba *et al.*, 1987; Xing *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2002; He *et al.*, 2019). Не так давно было установлено самостоятельное действие полисахаридов на опухолевые клетки, приводящее к ингибированию пролиферации опухолевых клеток (рак печени, молочной железы, толстой кишки и др.), индукции апоптоза и аутофагии (Lin *et al.*, 2016; Masuda *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018b; Yu *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2023).

Полисахариды (*D*-фракция) *G. frondosa* являются основным биологически активным ингредиентом с противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью, который представляет собой связанный с белком глюкан или протеоглюкан, состоящий из β -глюкана (либо β -1,6-связанный глюкан с β -1,3 ответвлениями, либо β -1,3-связанный глюкан разветвленный с β -1,6 глюкозидами) (He *et al.*, 2018). Полисахариды грифолы курчавой с различной молекулярной массой и моносахаридным составом были получены с использованием различных методов экстракции (кислотная, щелочная, экстракция горячей водой) из плодовых тел, мицелия или культуральной жидкости. *D*-фракция вызывает противоопухолевую активность, стимулируя иммунную систему хозяина, активирует макрофаги, дендритные клетки (DC) и естественные киллерные (NK) клетки и способствует иммунным реакциям типа Т-хелперов (Th)1. Препарат на основе полисахарида *G. frondosa*, который можно принимать, как перорально, так и путем инъекции, был разработан как вспомогательный терапевтический препарат для лечения рака (He *et al.*, 2019). Также из *G. frondosa* был выделен и охарактеризован водорастворимый гетерополисахарид (*Z*-фракция), который значительно подавлял рост опухоли у мышей BALB/cA, инокулированных раковыми клетками colon-26 *in vivo* до уровня, аналогичного тому, который вызывал β -глюкан (*D*-фракция) (Masuda *et al.*, 2009a). Более того, данный гетерополисахарид значительно индуцировал пролиферацию спленоцитов и перитонеальных макрофагов, было отмечено значительное увеличение экспрессии мРНК IL-12p40, IL-2 и IFN- γ в селезенке, увеличение клеток, продуцирующих IFN- γ , как в селезеночных CD4(+) и CD8(+) Т-клетках, так и в инфильтрирующих опухоль CD4(+) и CD8(+) Т-клетках, а также усиление цитотоксической активности NK-клеток и CTL. Эти результаты указывают на то, что гетерополисахарид (*Z*-фракция) является эффективным иммуномодулятором, обладающим противоопухолевой активностью, связанной с индуцированным клеточно-опосредованным иммунитетом (Masuda *et al.*, 2009b). Низкомолекулярный полисахарид (α -глюкан состоящий из D-глюкозы) содержащий α -глюкозидные связи (глюкоза связана α -1, 3, α -1, 6, α -1, 4-глюкозидными связями) из мицелия *G. frondosa*, показал противоопухолевую активность по отношению к линии клеток рака мышины саркомы (S180), желудочной аденокарциноме (ЕАС) и

карциномы гортани (HEPS) (Chen *et al.*, 2005). Кислоторастворимый полисахарид выделенный из плодовых тел *G. frondosa* состоящим из (1,3)- β -D-Glcp и (1,3)- α -D-Manp проявлял противоопухолевую активность, подавляя рост солидных опухолей H22 со скоростью ингибирования 37% *in vivo*, было продемонстрировано, что данный полисахарид может эффективно защищать тимусы и селезенки мышей с опухолями. Кроме того, он может значительно улучшать активность NK-клеток, макрофагов, CD19+ В-клеток и CD4+ Т-клеток, что приводило к апоптозу клеток H22 через остановку фазы G0/G1. Авторы отмечают, что полисахарид из *G. frondosa* имеет большие перспективы применения в качестве безопасного и эффективного противоопухолевого адъюванта (Yu *et al.*, 2020). Еще один кислотно-экстрагированный полисахарид из плодовых тел *G. frondosa* с гликозидными связями α -типа, проявлял противоопухолевую активность на мышцах с опухолью саркомы S180, было показано, что полисахарид может эффективно подавлять рост опухолевых клеток, вызывая апоптоз и останавливая пролиферацию в фазе G1, а также защищая иммунные органы (тимус и селезенку), активируя иммунные клетки (NK-клетки, лимфоциты и макрофаги), повышая секрецию сывороточных цитокинов (TNF- α , IL-2 и IFN- γ) *in vivo* (Zhang *et al.*, 2023). Полисахариды *G. frondosa* оказывали значительное до 90% ингибирующее действие на разные раковые клеточные линии человека: хронический миелоидный лейкоз (K562), аденокарциному толстой кишки (SW620), ингибировали пролиферацию клеточной линии острого Т-клеточного лейкоза человека (Jurkat), рака желудка (SGC-7901), клеток гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) и аденокарциномы толстой кишки (LS180). Воздействие разных полисахаридов на различные опухолевые клетки было индивидуальным (Jingsong *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2018b).

Изучение активности полисахаридов Agaricus brasiliensis

Полисахаридные фракции, экстрагированные этанолом и горячей водой из базидиомицета *A. brasiliensis* вызывали морфологические изменения и значительно снижали жизнеспособность клеток рака полости рта человека (CAL-27). Оба экстракта ингибировали пролиферацию клеток, увеличивали высвобождение Ca^{2+} , снижали мембранный потенциал митохондрий и вызывали остановку клеточного цикла, что способствовало апоптозу. Таким образом, авторы продемонстрировали, что 50%-ный этанольный экстракт и экстракты горячей водой были способны вызывать апоптотическую гибель клеток CAL-27 через митохондриально-зависимый путь, посредством высвобождения цитохрома С из митохондрий в цитоплазму и активации каспазы-3 (Fan *et al.*, 2011).

Изучение активности полисахаридов Antrodia cinnatomea

Из базидиомицета *Antrodia cinnatomea* были выделены сульфатированные полисахариды, которые продемонстрировали противораковую активность. Они снижали жизнеспособность

клеток аденокарциномы легких (A549) и карциномы легких Льюиса (LLC1), и это действие было опосредовано подавлением сигнализации рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (Lin *et al.*, 2018). Сульфатированные полисахариды вызывали остановку клеточного цикла путем деградации трансформирующего фактора роста (TGFR), активируя путь протеасомной деградации, индукции расщепления поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) и каспазы-3 (Lu *et al.*, 2017). Была установлена иммуностимулирующая активность полисахарида галактоманнана, эффект достигался путем фосфорилирования протеинкиназы C- α (PKC- α) и митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) (Perera *et al.*, 2018). Влияние β -глюкана, присутствующего в мицелии *A. cinнатомеа*, антродана, было протестировано на доброкачественной гиперплазии предстательной железы и было показано, что антродан облегчает состояние, уменьшая гиперплазию эпителия предстательной железы и отложение коллагена. Лечение антроданом увеличило биосинтез и превращение общего холестерина в липопротеины высокой плотности, а также снижало липопротеины низкой плотности и выработку активных форм кислорода и дальнейшее увеличение экспрессии IL-1, COX-2 и CD68. Антродан ингибировал путь эпителиально-мезенхимального перехода за счет повышения регуляции экспрессии E-кадгерина и снижения экспрессии N-кадгерина и виментина (Peng *et al.*, 2015).

Изучение активности полисахаридов из грибов рода Pleurotus

Многие из изученных полисахаридов содержат от 10% до 30% белка, образуя полисахарид-белковые комплексы, что, по мнению некоторых авторов, усиливает их биологическую активность (Zhuang and Wasser, 2004; Boh Podgornik and Berovic, 2007; Mahajna *et al.*, 2010). Полисахарид-белковый комплекс, выделенный из *P. pulmonarius*, показал противораковое действие в отношении гепатоцеллюлярной карциномы. Результаты исследований показали, что воздействие комплекса на клетки рака печени не только значительно снижало пролиферацию и инвазию раковых клеток *in vitro*, но и повышало чувствительность к химиотерапевтическому препарату цисплатин. Как пероральное, так и внутрибрюшинное введение полисахарид-белкового комплекса значительно ингибировали рост опухоли у ксенотрансплантатов BALB/с голых мышей. В условиях *in vitro* и *in vivo* извлеченный комплекс полисахарида с белком запускал подавление сигнального пути PI3K/АКТ в клетках рака печени и сверхэкспрессировал конститутивно активную форму АКТ, Мут-АКТ, которая отменяет этот эффект и ингибирует пролиферацию гепатоцеллюлярной карциномы. Исследование предполагает потенциальное терапевтическое значение полисахарид-белкового комплекса в лечении рака печени (Xu *et al.*, 2012).

Разные полисахариды по-разному действуют на разные виды опухолевых клеток, так и разные раковые клеточные линии по-разному реагируют на действие одного и того же соединения. Некоторые работы направлены на сравнительные исследования

противоопухолевой активности грибных полисахаридов. Была изучена цитотоксическая активность полисахаридов, выделенных из базидиомицета *P. sajor-caju* в отношении разных клеточных линий карциномы толстой кишки (HCT 116), печени (HEPG2), шейки матки (HELA) и молочной железы (MCF7). Полученные результаты показали, что полисахариды оказывали большее ингибирующее действие на клетки рака печени и толстой кишки, но меньшее на другие клеточные линии карциномы груди и шейки матки. Воздействие грибных полисахаридов на клетки HCT-116 приводило к высокому цитотоксическому эффекту, что указывает на многообещающие противоопухолевые свойства, и демонстрирует их прямое влияние на пролиферацию клеток рака толстой кишки (Moharib *et al.* 2014). Также, антипролиферативная и проапоптотическая активность в отношении рака толстой кишки (HT-29) была установлена у низкомолекулярного α -глюкана, выделенного из глубинного мицелия *P. ostreatus*. Было показано, что ингибирование пролиферации является результатом индукции апоптоза, поскольку проапоптотические молекулы Вах и цитозольный цитохром-с были повышены (Lavia *et al.* 2006). Полисахариды, выделенные из плодовых тел *P. eryngii*, проявляли противоопухолевую активность в отношении рака почки Renca, значительно ингибировали рост опухоли *in vivo*, за счет стимуляции иммунной системы, повышая пролиферацию лимфоцитов тимуса и селезенки. Также было отмечено увеличение уровня концентрации интерлейкина IL-2 и фактор некроза опухоли TNF- α в сыворотке у мышей с раком почки (Yang *et al.*, 2013).

Изучение активности полисахаридов G. lucidum и G. tsugae

Были проведены скрининговые исследования на 29 клеточных раковых линиях: миелоидный лейкоз (HL-60, U937, K562, THP-1, NB4), острый лимфобластный лейкоз (В- и Т-ALL, Blin-1, Nalm-6, Jurkat), множественная миелома (RPMI8226, ARH77, U266, NCI-H929), лимфома Беркитта (Daudi, Ramos), non-Hodgkin's лимфома (NCEB-1, SUDHL6), рак предстательной железы (LNCaP, PC-3, DU145), рак молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231), колоректальный рак (HT-29), рак поджелудочной железы (PANC1, ASPC1, BxPC-3) и рак легкого (NSCLC и NCI-H520). Метанольный экстракт из плодовых тел *G. lucidum* проявлял наибольшую антипролиферативную активность в отношении шести линий раковых клеток человека (HL-60, U937, K562, Blin-1, Nalm-6 и RPMI8226). Отмечено, что апоптоз в раковых клетках варьировал от 21 до 92%, что указывает на высокую цитотоксическую активность экстракта *G. lucidum*, останавливающего пролиферацию и приводящего к гибели путем апоптоза раковых клеток лейкемии, лимфомы и множественной миеломы (Muller *et al.*, 2006).

Было показано, что полисахариды из *G. lucidum* проявляли противоопухолевые эффекты посредством иммуномодулирующих свойств, включая стимулирование мононуклеарных макрофагов и естественных киллеров. Продemonстрировано содействие поляризации макрофагов типа M1 по сравнению с M2-типом, содействие созреванию и дифференцировке

дендритных клеток, повышению их антигенной презентации, активации лимфоцитов и повышению цитотоксичности цитотоксина Т-лимфоцита, стимулирование выработки цитокинов и ингибирование выхода опухоли из-под иммунного надзора (Lin and Yang, 2019).

Метанольные экстракты из плодовых тел *G. tsugae* оказывали противоопухолевое действие как *in vitro*, так и *in vivo* на клетки колоректальной аденокарциномы, подавляя пролиферацию раковых клеток. Было установлено, что это происходит за счет подавления циклин-зависимых киназ 1A и 1B (CDK) и повышения регуляции ингибиторов CDK p21 и p27. Исследование онкогенеза на мышах показало, что экстракты вызывали уменьшение опухоли и не оказывали существенных побочных эффектов на животной модели (Hsua *et al.*, 2008). Полисахариды того же базидиомицета *G. tsugae*, выделенные из плодовых тел путем этанольной экстракции, проявляли противоопухолевую активность на клетки хронического миелоидного лейкоза человека (K562), также изучался молекулярный механизм его действия. Применение экстракта полисахаридов значительно снижало жизнеспособность клеток K562, авторы отмечают, что остановка клеточного цикла лейкемии происходила за счет индукции митохондриального апоптоза и цитопротекторной аутофагии, последняя связана с подавлением сигнального каскада EGFR и PI3K/AKT/mTOR (Hseu *et al.*, 2019).

Сравнительное исследование активности полисахаридов разных базидиомицетов

Было проведено сравнительное исследование, направленное на влияние метанольных экстрактов из плодовых тел базидиомицетов *Flammulina velutipes*, *A. bisporus*, *L. edodes* и *P. ostreatus* на метаболическую активность клеток рака молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231) и толстой кишки (HT-29, HCT-116). Было установлено, что наиболее сильным цитотоксическим действием обладала культура *P. ostreatus*, подавляющая пролиферацию клеток рака молочной железы до 50% и рака толстой кишки до 90% при концентрации 1 мг/мл, не влияя при этом на пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы (MCF-10A) и нормальных клеток толстой кишки (FHC). Также было показано, что метаболиты *P. ostreatus* индуцировали экспрессию супрессора опухолей p53 и ингибитора циклин-зависимой киназы p21 (CIP1/WAF1), и ингибировали фосфорилирование белка ретинобластомы Rb в клетках рака кишечника. Повышение экспрессии p21 и ингибирование фосфорилирования Rb в клетках позволило предположить, что *P. ostreatus* подавляет пролиферацию клеток рака груди и толстой кишки через p53-зависимый, а также p53-независимый путь. Авторы предлагают использовать данные терапевтические/профилактические эффекты экстрактов *P. ostreatus* при лечении рака груди и толстого кишечника (Jedinak and Sliva, 2008).

Интересное исследование недавно было представлено группой китайских ученых Zeng *et al.* Из нескольких базидиальных культур *P. tuber-regium*, *Polyporus rhinoceros*, *Coriolus versicolor* и *G. lucidum* были выделены водорастворимые полисахариды, которые затем

использовались для восстановления ионов селена из селенита натрия с образованием селеновых наночастиц (SeНЧ). Сферические наночастицы Se размером 91–102 нм содержали на своей поверхности полисахариды (полисахарид-декорированные ПСД-SeНЧ). Результаты показали, что полисахариды усиливали противораковые свойства селеновых наночастиц и различное полисахаридное декорирование изменяло селективность SeНЧ к разным видам опухолей. Наибольшая цитотоксическая активность была обнаружена в отношении клеток аденокарциномы желудка (AGS). Кроме того, ПСД-SeНЧ продемонстрировали мощное противоопухолевое действие *in vivo*, вызывая апоптоз, опосредованный каспазами и митохондриями, но не проявляли токсичности для нормальных органов. По результатам исследования авторы показывают, как декорирование поверхности может регулировать селективность SeНЧ в отношении рака, и предлагают использовать данные для разработки частиц с повышенной противораковой эффективностью (Zeng *et al.*, 2019).

Некоторые полисахаридные препараты лекарственных макромицетов уже сейчас используются для профилактики и лечения иммунных расстройств, различных типов рака, в том числе после химио- и лучевой терапии, вирусных инфекций, разных видов анемии, синдрома приобретенного иммунодефицита, вируса герпеса, синдрома хронической усталости, для пациентов с хроническим гастритом и язвой желудка; а также для пациентов с деменцией (особенно при болезни Альцгеймера) (Ohno, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Chen and Seviour, 2007; Dai *et al.*, 2009; Lo and Wasser, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Lachter *et al.*, 2012; Boh Podgornik, 2013; Lee and Kim, 2014). Препараты из полисахаридов разных видов лекарственных грибов показывают положительные результаты в лечении рака *in vitro* и *in vivo* и используются как новый вид лечения рака, наряду с хирургией, химиотерапией и лучевой терапией. Несколько препаратов из базидиальных макромицетов на основе полисахаридов (β -глюканов) были разработаны в клинических и коммерческих целях (Mizuno, 1999; Zhang *et al.*, 2007; 2011; 2013; Wasser, 2010; Chang and Wasser, 2012; Lee and Kim, 2014). Около 30 видов макромицетных грибов были протестированы на противоопухолевую активность и оказались весьма перспективными при лечении рака у животных, повышая иммунную активность организма. Однако лишь немногие из них прошли испытания на противораковый потенциал у человека. Есть несколько клинических исследований, подтверждающих ингибирование раковых эффектов биологически активными препаратами из полисахаридов базидиомицетов *L. edodes* (Hobbs, 2000; Zhang *et al.*, 2011), *Tremella mesenterica* (Lo and Wasser, 2011; Ohno, 2005), *G. frondosa* (Zhuang and Wasser, 2004; Boh Podgornik and Berivic, 2007), *Trametes versicolor* (Hobbs, 2004), *Schizophyllum commune* (Hobbs, 2005; Zhang *et al.*, 2013), *A. brasiliensis* (Eira *et al.*, 2002; Wasser *et al.*, 2005), *Hypsizyguis marmoreus* (Matsuzawa, 2006), *F. velutipes* (Maruyama and Ikekawa, 2007), *Cordyceps sinensis* (Holliday and Cleaver, 2008), *G. lucidum* (Lin, 2009; Mahajna *et al.*, 2010), *Phellinus linteus* (Hsieh *et al.*, 2013) и *Inonotus obliquus* (Mizuno *et al.*, 1999; Balandykin and Zmitrovich, 2015).

2.4 Изучение противоопухолевой и иммуномодулирующей активности вторичных метаболитов лекарственных базидиомицетов

Помимо полисахаридов, грибы производят огромное количество биологически активных соединений, которые могут не только стимулировать иммунную систему, но также модулировать специфические клеточные реакции, и поэтому могут использоваться в качестве молекулярных мишеней в злокачественных клетках. Огромный терапевтический интерес представляют собой вторичные метаболиты лекарственных грибов, представляющие собой биоактивные низкомолекулярные соединения, которые вырабатываются в ответ на стресс, помогая выживанию путем сигнализации и защиты, но, как правило, не требуются грибам для их нормального роста и размножения. Полисахариды с большой молекулярной массой не всасываются в кишечнике, и лечебные действия грибов могут быть опосредованы комбинацией полисахаридов и других компонентов, например низкомолекулярных вторичных метаболитов. Например, было проведено сравнительное исследование влияния внеклеточных и внутриклеточных полисахаридов, а также этанольного экстракта плодовых тел *Tremella mesenterica* на индукцию апоптоза в эпителиальных клетках карциномы легкого человека (A549). Было установлено, что метаболиты этанольного экстракта, (но не полисахариды), почти полностью подавляли рост клеток A549. Также было показано нарушение митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), продукции активных форм кислорода (АФК) и активации белка каспазы-3 в клетках, что свидетельствует о том, что данные метаболиты могут снижать жизнеспособность клеток и индуцировать апоптоз в клеточных линиях A549 путем активации митохондриального пути (Chen *et al.*, 2008).

Наиболее важными вторичными метаболитами в лекарственных грибах являются некоторые низкомолекулярные соединения, такие как лактоны, терпеноиды, алкалоиды, стероиды, эргостерины, жирные кислоты, лектины, антибиотики и хелатирующие агенты с металлами, которые также важны для иммунной системы организма. Проникая через клеточную мембрану, эти вещества способны модулировать различные внутриклеточные пути, и таким образом могут играть важную роль в лечении рака (Yassin *et al.*, 2008; Petrova *et al.*, 2009; Rouhana-Toubi *et al.*, 2009; Ruimi *et al.*, 2010a, b; Dotan *et al.*, 2011; Chang and Wasser, 2012; Wasser, 2014; Xiao *et al.*, 2020). Кроме того, в мицелии и плодовом теле лекарственных макромицетов содержится большое количество ферментов, таких как лакказы, супероксиддисмутазы, глюкозооксидазы, различные пероксидазы. Было показано, что ферментная терапия играет важную роль в лечении рака предотвращая окислительный стресс и подавляя рост клеток (Zaidman *et al.*, 2005; Wasser, 2010). В последнее время наблюдается повышенный интерес к вторичным метаболитам высших грибов для получения новых медицинских соединений, в том числе для лечения рака. Из высших грибов был извлечен широкий спектр низкомолекулярных метаболитов с противораковым потенциалом, которые продемонстрировали заметные цитотоксические эффекты *in vitro* в линиях раковых клеток из

тканей человека, а также некоторые соединения использовались для экспериментов *in vivo*, предполагается, что многие из этих соединений войдут в клинические испытания на людях (Nandi *et al.*, 2019). Современные фармацевтические тенденции в профилактике рака включают разработку новых лекарств, в том числе ингибиторов факторов роста раковых клеток, которые блокируют связь раковой клетки с важнейшими белками, необходимыми для пролиферации. Эти препараты прерывают связь между ферментами, регулирующими рост и развитие, например, авастин был первым лекарством, ингибирующим образование новых кровеносных сосудов вокруг раковых клеток, что вызывало их голодание (Pollack, 2009; Ammerpohl, 2010).

2.4.1 Изучение активности тритерпеноидов ланостанового типа (кислот, альдегидов, спиртов) лекарственных базидиомицетов

Тетрациклические тритерпеноиды ланостановой структуры представляют собой наиболее изученную и многочисленную группу биологически активных низкомолекулярных вторичных метаболитов. Тритерпеноиды являются общим наименованием для природных соединений, содержащих 30 атомов углерода с пентациклическими или гексациклическими структурами. Грибные тритерпеноиды ланостанового типа обладают широким спектром биологического действия: противовирусным, антибактериальным, антиоксидантным, противовоспалительным, антидиабетическим, цитотоксическим, а также иммуномодулирующим и противоопухолевым действием. Разнообразные терпеноиды, содержащих ланостановую тетрациклическую систему и имеющих разную степень окисленности скелета, были выделены и очищены из базидиальных макромицетов, в настоящее время изучается их структура, свойства и биологическая активность. Они были признаны наиболее перспективными противораковыми грибными метаболитами.

Из базидиомицета *G. lucidum*, который является наиболее изученным и богатым в плане наличия вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности, в том числе противоопухолевой и иммуномодулирующей активностями, были выделены различные ганодермовые кислоты. Данные соединения проявляли противоопухолевую активность, ингибируя метастазирование и инвазию широкого спектра опухолей: рака толстой кишки (HCT-116), высоко метастатического рака легких (95-D), гепатокарциномы (SMMC-7721), эпидермального рака (KB-A-1, KB-3-1), карциномы шейки матки (HeLa), рака молочной железы (MDA-MB-231), аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), человеческой гепатомы (HTC, HuH-7), карциномы лимфатических узлов предстательной железы (LNCaP), рака легких (A549) и др., с минимальными последствиями для неопухолевых клеточных линий. Было установлено, что ганодермовые кислоты индуцируют апоптоз метастатических клеток опухоли преимущественно через внутренний путь, связанный с дисфункцией митохондриального мембранного потенциала с последующим высвобождением цитохрома-с из митохондрий, тем

самым инициируя стимуляцию активности каспазы-3 и каспазы-9 с повышением соотношения Bax/Bcl-2 и экспрессии транскрипционного фактора p53 (противоопухолевого белка), регулирующего клеточный цикл (Tang *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008; Nonaka *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010; Liu and Zhong, 2010; Chen and Zhong, 2011; Kinge and Mih 2011; Watanabe *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012a, b, c; Wu *et al.*, 2012a; Li *et al.*, 2013; Ivanova *et al.*, 2014; Baby *et al.*, 2015; Suarez-Arroyo *et al.*, 2017).

Сообщалось, что фракция тритерпеноидов из плодовых тел *G. lucidum* оказывала противоопухолевое и антиметастатическое действие на печень посредством ингибирования индуцированного опухолью ангиогенеза. Активное вещество, ингибирующее ангиогенез, было идентифицировано как ганодермовая кислота (Kimura *et al.*, 2002. Обогащенный тритерпенами экстракт из *G. lucidum* ингибировал рост клеток гепатомы, подавляя протеинкиназу C, активируя c-Jun N-терминальную киназу/стресс-активируемую протеинкиназу (JNK/SAPK) и киназу митоген-активируемого белка (p38 MAP), а также останавливает клеточный цикл G₂-фазы в клетках гепатокарциномы (Huh-7) (Lin *et al.*, 2003).

Тритерпены и ганодермовая кислота, извлеченные из *G. lucidum*, подавляли рост линий клеток рака молочной железы (MDA-MB) за счет ингибирования пролиферации клеток и образования колоний. Тритерпены ингибировали факторы транскрипции AP-1 и NF-κB, что приводило к снижению экспрессии циклин-зависимой киназы 4 (Cdk4) и подавлению секреции активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), которые сопровождают многие типы злокачественных новообразований, способствуют их прогрессии и метастазированию, а также появлению химиорезистентности. Опираясь на результаты проведенных исследований, авторы считают перспективным природным средством для лечения инвазивного рака груди гидроксिलированные тритерпены (Jiang *et al.*, 2008).

Базидиомицет *A. cinнатomea* (камфорный гриб) является активным продуцентом вторичных метаболитов, из него было выделено и идентифицировано более 78 соединений, главным образом терпеноидов, с различной биологической активностью, включая гепатопротекторную, антигипертензивную, антигиперлипидемическую, противовоспалительную, антиоксидантную, противоопухолевую и иммуномодулирующую (Ganesan *et al.*, 2019). Антцин-Н, тритерпен, извлеченный из *A. cinнатomea*, проявлял противораковую активность, нарушая комплекс фокальной адгезии и формирование ламелли-подиума путем ингибирования сигнального пути Src/FAK-paxillin в почечной карциноме. Кроме того, тритерпен снижает экспрессию матриксной металлопротеиназы-7 (MMP-7) путем ингибирования сигнальной оси ERK1/2-AP-1/c-Fos и C/EBP-β (Chiu *et al.*, 2017). Антцин-К, тритерпеноид, извлеченный из плодовых тел *A. cinнатomea*, в клетках Hep3B индуцировал апоптоз путем увеличения генерации активных форм кислорода (ROS) и снижения уровня АТФ, что приводит к стрессу эндоплазматического ретикулума. Кроме того, обработка тритерпеном увеличила стресс

эндоплазматического ретикулума и изменение мембранного потенциала митохондрий, вызывая высвобождение Ca^{2+} , гомологичного белка С/ЕВР (CHOP) и экспрессию Bax/Bak в клетках гепатоцеллюлярной карциномы. Антцин-К вызвал гибель клеток, увеличивая экспрессию белков апоптоза, зависимых от каспазы-9 и каспазы-3, и экспрессию белков апоптоза, независимых от каспазы (AIF, Endo G и HtrA2). Этот результат предполагает возможность использования антцина-К в качестве потенциального агента в терапии рака печени (Lai *et al.*, 2016).

Дегидроэбурикоевая, дегидросульфуреновая, 15 α -ацетилдегидросульфуре-новая, 3- β ,15- α -дигидроксиланоста-7,9 (11), 24-триен-21-овая кислота, а также жанкуевые кислоты, выделенные из «камфорного гриба» *A. camphorata*, проявляли высокую цитотоксичность по отношению к клеткам рака молочной железы MDA-MB-231 и клеточным линиям рака толстой кишки (HCT-116, HT-29 и SW-480). Ни один из этих изолятов не обладал токсичностью по отношению к нормальным клеточным линиям (Yeh *et al.*, 2009). Также было установлено, что тритерпеноиды (камфоратины, антцин-К и антцин-С), ланостановые тритерпеноиды и стеролы проявили цитотоксичность к различным опухолевым клеточным линиям человека, включая клеточные линии лейкемии и карциномы KB-VIN, KB (Wu *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2012).

Из склероций *Inonotus obliquus* (чага) были выделены тритерпеноиды, из которых 3- β -гидроксиланоста-8,24-диен-21-аль и траментеноловая кислота проявили цитотоксическую активность против клеток лимфоцитарного мышинного лейкоза (L1210), бетулин и 3,4-дигидроксibenзальацетон против карциномы легкого (A549) и лейкоза человека (HL-60) (Kim *et al.*, 2011). Также, уникальный тритерпеноид, спироиноноцуксодиол, и два других тритерпеноида, иноноцуксодиол А и иноноцудиол А, проявляли цитотоксический эффект в отношении раковых клеток лимфоцитарного мышинного лейкоза (L1210, P388), рака носоглотки (KB) и лейкоза человека (HL-60) (Handa *et al.*, 2010).

Тритерпены, полученные из склероциев базидиомицета *Poria cocos* (*Polyporaceae*) проявляли цитотоксичность по отношению к различным раковым клеточным линиям, таким как лейкемия (HL60), меланома (CRL1579), легкие (A549), грудь (SK-BR-3), яичники (NIH:OVCAR-3), простата (DU145), желудок (AZ521) и поджелудочная железа (PANC-1). Было обнаружено, что тритерпеноиды индуцируют апоптотическую гибель опухолевых клеток через каспазо-независимый митохондриальный путь, главным образом, путем транслокации апоптоз-индуцирующего фактора (Akihisa *et al.*, 2004; Mizushima *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2011).

Ланостановые тритерпеноиды (астраодоровые кислоты, астраеузины) выделенные из гриба *Astraeus odoratus* обладали цитотоксической активностью в отношении ряда раковых клеточных линий *in vitro*, но не против нераковых клеток Vero, и обладали хорошим или умеренным противораковым потенциалом против тестируемых линий мелкоклеточной карциномы легкого (NCI-H187), аденокарциномы протоков молочной железы (MCF-7) и рака носоглотки (KB) (Arpha *et al.*, 2012; Isaka *et al.*, 2016).

Выделенные из плодовых тел *Fomitella fraxinea* и *F. nigra* тритерпеновые соединения (фомителловые кислоты и фомитозид) вызывали значительные апоптотические эффекты на различных линиях раковых клеток, подавляя пролиферацию клеток рака желудка (NUGC), плоскоклеточной карциномы ротовой полости человека (YD-10B и KB), рака шейки матки (HeLa), рака молочной железы (MCF-7), эпителиальных клеток человеческой остеосаркомы (U2OS) и аденокарциномы толстой кишки (C26), через митохондриально-опосредованный ROS-зависимый сигнальный путь (Mizushima *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012; Bhattacharai *et al.*, 2012).

Было установлено, что выделенный из базидиомицета *L. crinitus* терпеноид панэпоксидон, препятствует опосредованной NF- κ B передаче сигнала, ингибируя фосфорилирование I κ B. А также, подавляет активацию NF- κ B, вызванную фактором некроза опухоли (TNF α) в клетках COS-7, ингибируя фосфорилирование и деградацию I κ B (Erkel *et al.*, 1996). Более того, анализ ДНК-микрочипов обработанных панэпоксидоном клеток MonoMac6 показал снижение экспрессии тридцати трех провоспалительных генов, зависимых от NF- κ B, без значительного влияния на экспрессию генов домашнего хозяйства (Erkel *et al.*, 2007). Установлена противоопухолевая активность терпеноида панэпоксидона в отношении аденокарциномы протоков молочной железы (MCF-7) и клеточных линий тройного негативного рака молочной железы (MDA-MB-453, MDA-MB-468 и MDA-MB-231). Панэпоксидон проявил высокую дифференциальную цитотоксичность, было отмечено подавление инвазии, миграции и усиление апоптоза. Изменения коррелировали с изменениями в экспрессии белков, связанных с апоптозом, включая повышение регуляции Bax и расщепленного PARP и снижение регуляции Bcl-2, сурвивина, циклина D1 и каспазы 3 во всех протестированных клеточных линиях рака молочной железы. Противоопухолевый эффект, по-видимому, был связан с его способностью ингибировать фосфорилирование I κ Ba с накоплением в цитоплазме NF- κ B (Arora *et al.*, 2014).

Из *P. cornucopiae* было выделено несколько низкомолекулярных биоактивных веществ, таких как моно- и сесквитерпеноиды, которые проявляли цитотоксичность по отношению к раковым клеткам HepG2 и HeLa (Wang *et al.*, 2013; Golak *et al.*, 2018).

Из *Tricholoma terreum* были выделены меротерпеноиды (терреумолы) которые оказывали сильное цитотоксическое действие на пять различных линий клеток рака человека, включая рак молочной железы (MCF-7), толстой кишки (SW480), гепатоцеллюлярной карциномы (SMMC-7721), миелоидного лейкоза человека (HL-60) и рака легких (A-549) (Yin *et al.*, 2013).

Из плодовых тел *Macrolepiota procera* были выделены несколько ланостановых тритерпеноида, названных лепиотапроцеридами, которые проявляли сильный цитотоксический эффект в отношении ряда клеточных линий рака человека (A-549, HL-60, SW480, SMMC-7721 и MCF-7) (Chen *et al.*, 2018a).

Из съедобного деликатесного базидиомицета *H. erinaceus* были выделены дитерпеновые соединения (герицериды), которые продемонстрировали цитотоксическую активность,

значительную ингибируя рост клеток лейкемии человека (K562) и рака простаты человека (LANCAP) (Zhang *et al.*, 2015).

Сесквитерпеновые соединения иллудины из плодовых тел ядовитых базидиомицетов *Lampteromyces japonicus* и *Omphalotus illudens*, проявляли противоопухолевую активность против клеток солидных опухолей (McMorris *et al.*, 2001; Poucheret *et al.*, 2006) и других линий клеток рака, включая карциному яичников, поджелудочной железы, колоректальную карциному, злокачественную глиому и немелкоклеточный рак легких (Zaidman *et al.*, 2005).

Также сесквитерпены категории аристоланов (намбиноны и ауризины) полученные из люминесцентного базидиомицета *Neonothopanus nambi*, оказали выраженное цитотоксическое действие на линии раковых клеток мелкоклеточной карциномы легких человека (NCI-H187) и холангиокарциномы (XH7M15) (Kanokmedhakul *et al.*, 2012).

Тритерпеновые альдегиды (люциальдегиды) и гидроксилуциденовая кислота, выделенные из плодовых тел базидиомицета *G. lucidum* показали высокую цитотоксичность по отношению к клеточным линиям саркомы (180, Meth-A, LLC и T-47D) и канцерогенезе кожи мышей (Akihisa *et al.*, 2007). Также люциденовые кислоты продемонстрировали эффективную апоптотическую и антиинвазивную активность на клетки гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) и лейкемии человека (HL-60) (Weng *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008a).

Две тритерпеновые фракции и спирт ганодериол F из плодовых тел *G. lucidum*, значительно, особенно спирт, более чем на 70%, подавляли рост опухоли четырех клеточных линий карциномы легких Льюиса у мышей путем внутрибрюшинного введения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что противоопухолевые эффекты метаболитов *G. lucidum* в основном обусловлены спиртами ганодермы (Gao *et al.*, 2002).

Установлено, что ганодермовые спирты (люцидумол А и В) оказывают цитотоксическое действие на некоторые линии опухолевых клеток (Moradali *et al.*, 2007). Ганодерманонтриол сильно ингибировал пролиферацию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7, минимально воздействуя на рост нераковых эпителиальных клеток молочной железы MCF-10A. Метаболит подавлял экспрессию гена CDC20, кодирующего регуляторный белок клеточного цикла, который обычно остается в высоко экспрессивной форме в предраковых и раковых клетках молочной железы, в отличие от нормальных эпителиальных клеток молочной железы (Jiang *et al.*, 2011). Спирт, полученный из *G. lucidum*, ганадериол F продемонстрировал высокую противоопухолевую активность *in vivo* у мышей с клетками карциномы легких Льюиса (LLC), не оказывая побочных эффектов (Gao *et al.*, 2006).

Ганодерон А, люцидадиол и ганодерманонтриол из *G. hainanense* показали профилактический эффект для клеток рака молочной железы (MCF 7) (Peng *et al.*, 2015). Тритерпеноиды ланостанового типа (апланлактоны А, метил апланиат А и аплановая кислота В), выделенные из плодовых тел *G. applanatum*, продемонстрировали противofiброзную активность

печени, вызывая ингибирующее действие на пролиферацию гепатоцеллюлярных клеток (HSC), индуцированных трансформирующим фактором роста- β -1(TGF- β -1) *in vitro*. Печеночные звездчатые клетки (HSC), активированные TGF- β -1, связанные с фиброзом печени, и ингибирование роста HSC может быть предложено в качестве метода лечения (Peng *et al.*, 2019).

2.4.2 Изучение активности стероидов лекарственных базидиомицетов

Помимо соединений ланостанового типа для базидиальных макромицетов характерно высокое содержание стероидов, предшественников витаминов группы D, наиболее часто представленных эргостеролом, 5,7 диенолом, 22,23-дигидроэргостеролом и эргоста-7-енолом (Phillips *et al.*, 2011). Стероиды также являются основными вторичными метаболитами с противораковыми свойствами, которые были исследованы. Выделенные из склероциев *Polyporus umbellatus* полипорустероны проявляли разное дозозависимое ингибирующее воздействие на клетки лимфоцитарного лейкоза мышей (L1210), гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2), рака гортани (HEp-2), карциномы шейки матки (HeLa) *in vitro* (Ohsawa *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2010). Наибольший цитотоксический эффект оказывало соединение эргон (эргоста-4,6,8(14),22-тетраен-3-он). Было установлено, что пролиферация клеток подавляется из-за инициации апоптоза, вызванного стимуляцией каспазы и остановкой в фазе G2/M (Zhao *et al.*, 2011).

Было показано, что эргостероиды (эргоста-4,6,8,22-тетраен-3-он) из *G. applanatum* действуют как мощный ингибитор циклооксигеназы. Индуктивная изоформа циклооксигеназы (COX-2), обычно наблюдается в высокой степени экспрессии в различных солидных опухолях, поэтому ее ингибирование способно предотвратить образование опухоли (Ferreira *et al.*, 2010).

Плодовые тела *G. frondosa* являются богатым источником вторичных метаболитов, среди которых важными являются эргоста-4,6,8(14),22-тетраен-3-он, 1-олеил-2-линолеил-3-пальмитоилглицерин и эргостерол, демонстрирующие мощную противораковую активность. Эти соединения могут ингибировать циклооксигеназу, ингибирование данного фермента рассматривается как один из основных механизмов противовоспалительной активности (Zhang *et al.*, 2002). В недавних исследованиях эргостерол установлен как сильное средство защиты от развития опухолей мочевого пузыря (Yazawa *et al.*, 2000).

Эргостерол из трутовика *Amauroderma rude* вызывал гибель клеток меланомы (B16) в эксперименте на мышах *in vivo* в зависимости от дозы и времени. Также было установлено подавление жизнеспособности клеток рака молочной железы (MDA-MB-231) через апоптоз посредством повышения регуляции экспрессии супрессора опухолей Foxo3 (Li *et al.*, 2015).

Из базидиомицета *Sarcodon aspratus* был выделен и охарактеризован стерол 9(11)-DHEP с противоопухолевой активностью, который по результатам исследования являлся эффективным ингибитором роста клеток лейкоза HL60 и сильным индуктором апоптоза. Также,

очищенный микостерол селективно подавлял рост клеток аденокарциномы толстой кишки человека HT29, но не нормальных фибробластов WI38 человека. Было показано, что 9,11-дегидроэргостерол пероксид индуцирует экспрессию циклин-зависимого ингибитора киназы (CDKN1A), который вызывает остановку клеточного цикла и апоптоз в клетках аденокарциномы толстой кишки человека (Kobori *et al.*, 2006).

Для идентификации противовоспалительных и противоопухолевых компонентов у базидиомицета *I. obliquus* были изолированы фракции петролейного эфира и этилацетата. Установлено, что они оказывают значительное ингибирующее действие на продукцию NO и активность люциферазы NF- κ B в клетках макрофагов RAW 264.7. Выделенные из этих фракций соединения эргостерол, пероксид эргостерина и траметеноловая кислота, проявили высокую цитотоксичность в отношении клеток карциномы предстательной железы человека PC3 и клеток карциномы молочной железы MDA-MB-231 (Ma *et al.*, 2013). Водный экстракт из *I. obliquus* проявлял значительную противоопухолевую активность в отношении карциномы легкого Льюиса. У животных моделей с опухолями наблюдалось уменьшение опухоли на 60%, у метастатических мышей количество узелков уменьшалось на 25% (Arata *et al.*, 2016).

2.4.3 Другие биологически активные низкомолекулярные соединения лекарственных базидиомицетов

Помимо терпеноидов из базидиомицета *A. cinнатомеа* (камфорный гриб) были выделены производные ароматических кислот. Производное малеиновой кислоты (малеимид), Антродин С, полученный из мицелия *A. cinнатомеа* ингибировал индуцированный TGF- β 1 эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и метастазирование клеток рака молочной железы *in vitro*. Антродин С опосредовал это действие, повышая экспрессию эпителиальных маркеров, таких как Е-кадгерин и окклюдин, и понижая экспрессию N-кадгерина и виметина посредством подавления сигнальных путей Smad2/3. Малеимид также ингибировал экспрессию ММП-2, ММП-9 и uPA через сигнальный путь β -катенина (Kumar *et al.*, 2015).

Было показано, что метанольный экстракт, полученный методом холодной экстракции, из плодовых тел *G. lucidum* и содержащий гидроксibenзойную, кумаровую и коричную кислоты, проявлял цитотоксичность по отношению к четырем линиям опухолевых клеток человека: аденокарцинома желудка (AGS), аденокарцинома молочной железы (MCF-7), немелкоклеточный рак легкого (NCI-H460) и колоректальная аденокарцинома (HCT-15). Было также установлено, что воздействие экстракта *G. lucidum* на клеточную линию аденокарциномы желудка, усиливает клеточную аутофагию и образование аутофагосом (вакуолей, типичных для аутофагии). Более того, клеточные уровни LC3-II также были повышены, а клеточные уровни p62 снизились, что подтверждает, что экстракт влияет на клеточную аутофагию. При обработке клеток экстрактом вместе с ингибиторами лизосомальной протеазы клеточные уровни LC3-II и

p62 увеличивались. Полученные результаты доказали, что в клетках AGS метанольный экстракт *G. lucidum* вызывает индукцию аутофагии (Reis *et al.*, 2015).

Базидиомицет *A. bisporous* являются потенциальным химиопрофилактическим средством при раке молочной железы, так как его метаболиты подавляют активность фермента ароматазы, ответственной за ключевой этап биосинтеза эстрогенов. Была оценена противоопухолевая активность экстрактов из плодовых тел *A. bisporous* в отношении эстроген-рецептор-положительной/ароматазо-положительной клеточной линии рака молочной железы (MCF-7) *in vitro* и *in vivo*. Метанол-водная фракция снижала индуцированную тестостероном пролиферацию клеток в клетках MCF-7, но не оказывала влияния на неопухолевую клеточную линию MCF-10A. Были выделены и очищены физиологически значимые ингибиторы ароматазы – линолевая кислота и ее производные, которые ингибировали тестостерон-зависимую пролиферацию клеток MCF-7. Исследования показали, что экстракт *A. bisporous* снижает пролиферацию клеток и массу опухоли MCF-7 имплантированной мышам *in vivo*. Авторы подтверждают, что шампиньоны и его основные жирные кислоты могут быть важным диетическим компонентом для снижения частоты гормонозависимого рака груди (Chen *et al.*, 2006a).

Генистеин, природный изофлавоноидный фитоэстроген, выделенный из *F. velutipes*, показал сильное цитотоксическое действие на клетки аденокарциномы простаты (LNCaP), карциномы яичников (SKOV-3) и гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2). Было обнаружено, что генистеин повышает уровни активной киназы Cdc2, Wee1 и p21WAF1/CIP1, которые имеют решающее значение для значительного подавления роста и пролиферации раковых клеток (Choi *et al.*, 2000; Li and Mi, 2003; Chang *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2004).

Биологически активное соединение клитоцин (CLT) представляет собой атипичный нитросодержащий пиримидиновый нуклеозид, несущий рибофуранозильный фрагмент, прикрепленный к экзоциклическому 4-амино. Клотоцин был выделен сначала из базидиомицета *Clitocybe inversa*, а затем из плодовых тел *Leucopaxillus giganteus*, и продемонстрировал противоопухолевую активность в отношении рака шейки матки человека (HeLa). Клеточная гибель, индуцированная клитоцином, включала множественные пути, в том числе рецептор смерти и митохондриальные пути, и убедительно свидетельствовали о том, что митохондриальные пути были опосредованы подавлением Bcl-2 и повышением регуляции Bax, высвобождением цитохрома-с и последующей активацией каспазы-3 с последующими нисходящими событиями, приводящими к апоптотическому способу гибели раковых клеток (Rep, 2008). Противоопухолевое действие клитоцина было доказано на мышинных моделях *in vivo*. Способность CLT снижать пролиферацию опухолевых клеток, вызывать апоптоз и ингибировать рост опухоли у мышей была связана с лекарственно-индуцированной модуляцией путей NF-κB и Akt, в частности, с подавлением и протеасом-зависимой деградацией антиапоптотического белка Mcl-1. Кроме того, CLT может способствовать трансляционному чтению стоп-кодонов. Этот

новый механизм еще больше усиливает интерес к натуральному продукту для борьбы с различными типами рака и генетическими нарушениями, связанными с нонсенс-мутациями (Bailly, 2024).

Из трутовика *I. hispidus* было выделено биоактивное соединение катехин 6-(3,4-дигидроксистирил)-4-гидрокси-2-пирон (гиспидин), который оказывал влияние на сигнальный путь различных линий раковых клеток, ингибируя протеинкиназу PKC- β , играющую важную роль в развитии ангиогенеза (Berns *et al.*, 2000; Awadh Ali *et al.*, 2003; Zaidman *et al.*, 2005). Гиспидин демонстрировал выраженное цитотоксическое действие по отношению к линии раковых клеток протоков поджелудочной железы человека (Capan-1) и кератиноцитов человека (SCL-1) (Gonindard *et al.*, 1997).

Из трутовика *Phellinus linteus* было выделено биоактивное полифенольное соединение хисполон с эффективной противоопухолевой активностью в отношении человеческих эпидермоидных клеток рака носоглотки (KB), клеточных линий рака желудка (SGC-7901, MGC-803 и MKN-45) и клеток лейкемии человека (NB4). Хисполон проявлял антипролиферативное свойство в отношении раковых клеток и вызывал их гибель через митохондриальный апоптотический путь (Chen *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013).

Подобное фенольное соединение (хисполон) также было выделено из *P. igniarius*, продемонстрировавшее высокую противораковую активность против клеток гепатоцеллюлярной карциномы (Hep3B), с помощью другого механизма, который включает модуляцию ERK, фосфорилирование и остановку клеточного цикла в S-фазе (Huang *et al.*, 2011).

Хинон (γ -1-глутаминил-4-гидрокси-2,5-бензохинон) *A. bisporus* показал себя как потенциальный противоопухолевый агент, заметно подавляя ДНК-полимеразу мышинового лейкоза L1210 (Ferreira *et al.*, 2010). Эргостерол, извлеченный из липидной фракции *A. blazei*, проявлял эффективное действие на замедление роста опухоли. Предполагается, что активность эргостерола как противоопухолевого агента может быть связана с его прямым ингибирующим действием на ангиогенез, который индуцируется солидными опухолями (Takaku *et al.*, 2001).

Биоактивные фенольные соединения, грифолин и неогрифолин, из плодовых тел базидиомицета *Albatrellus confluens* подавляли рост и пролиферацию раковых клеток в широком диапазоне линий раковых клеток и запускали индукцию апоптоза путем дисфункции сигнального пути Akt в случае линий клеток остеосаркомы (U2OS и MG63) (Jin *et al.*, 2007). Грифолин опосредует митохондриально-зависимый путь апоптоза, а также сигнальный путь рецептора смерти (рецепторы фактора некроза опухолей) для индукции апоптоза в линии клеток носоглоточной карциномы человека (CNE1) (Ye *et al.*, 2005).

Низкомолекулярные соединения *G. frondosa* триацилглицерины (1-олеоил-2-линолеоил-3-пальмитоилглицерин), были зарегистрированы как обладающие противоопухолевым, так и иммуномодулирующим действием (Zhang *et al.*, 2002).

Эпоксидное производное хинонов, панэпоксидон, было выделено из *Panus conchatus*, *P. rudis* и *Lentinus crinitus*. Это хиноновое соединение было связано с регулированием действия транскрипционного фактора NF-κB, который способствует росту опухоли (Zaidman *et al.*, 2005). Также из культуры *P. conchatus* был получен новый сесквитерпеноид кадинана (пануторулон), который проявлял значительную активность в качестве цитотоксического агента на различных линиях клеток рака человека: рак молочной железы (SK-BR-3), гепатоцеллюлярная карцинома (SMMC-7721), клетки миелоидного лейкоза человека (HL-60), рак поджелудочной железы (PANC-1) и рак легких (A-549) (Ding *et al.*, 2018).

2.5 Изучение противоопухолевой и иммуномодулирующей активности гликопротеинов лекарственных базидиомицетов

В ряде исследований было показано, что такие вторичные метаболиты базидиомицетов, как лектины и ферменты (лактазы, пероксидазы), представляют значительный интерес в плане молекулярной терапии рака. Эти соединения важны для иммунной системы, они могут проникать через клеточные мембраны и модулировать внутриклеточные пути, предотвращать окислительный стресс и ингибировать рост раковых клеток (Wasser, 2014).

Было обнаружено, что лектины, полученные из грибов, обладают важными лечебными свойствами для поддержания здоровья, профилактики и лечения рака. Большинство лектинов содержат несколько участков связывания углеводов, которые могут взаимодействовать с гликозилированными рецепторами клеточной поверхности. Например, выделенный из экстракта лекарственного гриба *Clitocybe bularis* лактозо-специфичный лектин, проявлял антипролиферативную активность против человеческих лейкозных Т-клеток, путем связывания с углеводными рецепторами присутствующим в лейкозных Т-клетках, что приводило к активации пути передачи сигнала противолейкозной активности (Pohleven *et al.*, 2009).

Подобные исследования были проведены в отношении гликопротеина (N-ацетилгалактозамин-специфический лектина), выделенного из плодовых тел *G. frondosa*, было установлено, что данный гликопротеин проявляет цитотоксическую активность в отношении клеток HeLa с минимальной концентрацией, приводящей к гибели клеток в 25 мкг/мл (Kawagishi *et al.*, 1990). Также было продемонстрировано цитотоксическое действие химически модифицированных полисахарид-пептидов майтаке в отношении клеток глиомы, молекулы были способны подавлять метаболическую активность клеток C6 на 20–40% при концентрации 100 мкг/мл. Отмечено также, что нормальные клетки головного мозга практически не были подвержены цитотоксическому действию со стороны модифицированных пептидов из плодового тела *G. frondosa* (Chan *et al.*, 2011). Концентрации грибных препаратов, оказывающих цитотоксическое действие на клеточные линии HeLa и C6 в данных исследованиях и нашей работе (Vetchinkina *et al.*, 2022) были сопоставимы. Необходимо

отметить, что в работах Kawagishi *et al.* and Chan *et al.* используются молекулы, полученные из плодовых тел майтаке, в нашей работе (Vetchinkina *et al.*, 2022) белки были выделены из вегетативного мицелия базидиомицета (Kawagishi *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 2011).

Как отмечено выше, многие исследования посвященные полисахаридам макромицетов указывают на корреляционную зависимость противоопухолевой и иммуностимулирующей активностей. Также и в отношении белковых молекул, были представлены данные по взаимосвязи иммуностимулирующей и иммуномодулирующей активностям. Неглюкановый белок, выделенный из плодовых тел *G. frondosa*, был способен индуцировать секрецию интерферона- γ мышинными спленоцитами и естественными клетками-киллерами и активировать созревание дендритных клеток костного мозга посредством TLR4-зависимого механизма. Обработанные белком клетки костного мозга стимулировали ответ Th1 и проявляли значительную противоопухолевую активность при переносе мышам с опухолями рака легких Льюиса LLC1 (Tsao *et al.*, 2013).

В исследовании Cui *et al.* был проведен скрининг противоопухолевой активности фракций гликопротеина из мицелия *G. frondosa*, полученных путем очистки на колонке с анионной смолой DEAE-Sephadex Fast Flow. Противоопухолевую активность фракций оценивали на клеточных линиях саркомы мыши S180 и гепатомы человека Bel-7402. Фракция, элюированная при 0.3 M NaCl, а также очищенный из данной фракции белок молекулярной массой 88 кДа, показали наибольшую антипролиферативную активность в отношении клеток S180 и Bel-7402 (Cui *et al.*, 2013).

Исследования, посвященные противоопухолевой и иммуностимулирующей активности биоактивных молекул из трутовика *G. lucidum*, сосредоточены в основном на полисахаридах и терпеноидах (Cör *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2021). Информация, касающаяся биоактивных белков и гликопротеинов, проявляющих противоопухолевую, иммуномодулирующую, противовирусную и другие активности из данной культуры, весьма ограничена. Был выделен и охарактеризован белок (LZ-8) молекулярной массой 12 кДа с иммуномодулирующей и митогенной активностью (Tanaka *et al.*, 1989; Van der Hem *et al.*, 1995). Мощную митогенную активность в отношении спленоцитов мыши и антипролиферативную активность в отношении клеток лейкемии и клеток гепатомы *in vitro* проявлял лектин, выделенный из *G. capense* (Ngai and Ng, 2004). Белки из плодового тела и спор *G. lucidum* проявляли высокую митогенную и антиоксидантную активности (Sun *et al.*, 2004). Из плодовых тел был выделен белок молекулярной массой 15 кДа, названный ганодермином, который был способен подавлять рост патогенных грибов (Wang and Ng, 2006). Сообщалось также о ряде функциональных белков из семейства FIP (грибные иммуномодулирующие белки), выделенных из грибов рода *Ganoderma* с противоаллергической, противоопухолевой, митогенной и иммуномодулирующей активностями (Bastiaan-Net *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018c; Chiu *et al.*, 2021; Lin *et*

al., 2022). Например, иммуномодулирующий белок из *G. microsporum* индуцировал аутофагию посредством ингибирования пути akt-mTOR-p70S6K в клетках рака легкого (Chiu *et al.*, 2015). Рекомбинантный белок (rFIP-glu) из *G. lucidum* проявлял иммуномодулирующее действие, активируя клетки макрофагов RAW264.7 через PI3K/Akt и MAPK пути, а также обладал противовоспалительными свойствами (Li *et al.*, 2019). Было показано, что рекомбинантный грибной иммуномодулирующий белок (GMI), клонированный из *G. microsporum*, обладает значительным потенциалом для химиопрофилактики рака легких. GMI ингибировал индуцированный эпидермальным фактором роста инвазивный рост клеток A549, включая миграцию и инвазию, путем блокирования пути EGF/фосфоEGFR-PI3K/Akt (Lin *et al.*, 2010).

2.6 Заключительные замечания

Несмотря на достигнутые за последние десятилетия результаты, приоритетным остается направление по поиску видов и штаммов лекарственных базидиомицетов, являющихся активными продуцентами ценных метаболитов, различающихся направленностью и механизмом действия; содержащих биологически активные вещества, как в плодовых телах, так и в биомассе вегетативного мицелия. Выявление таких культур и использование их в биотехнологии приведет к повышению эффективности и конкурентоспособности способов получения и применения биологически активных метаболитов. В России исследованиям лекарственных грибов вообще и изучению противоопухолевой активности грибных метаболитов в частности, уделяется очень мало внимания, что ограничивает их использование в пищевой и фармацевтической промышленности. Совершенствование технологий интенсивного и экстенсивного выращивания макромицетов, выявление и извлечение биологически активных веществ из грибов являются актуальными направлениями.

В качестве ценного сырья для получения высокоэффективных веществ используют в основном плодовые тела базидиомицетов, мало работ проводится по изучению биологически активных соединений вегетативного мицелия грибов. Хотя состав мицелия по всем важнейшим показателям, в том числе и по содержанию биологически активных веществ, не уступает, а зачастую и качественно превосходит состав плодовых тел грибов. Кроме того, это экономически выгодно с точки зрения снижения стоимости и упрощения биотехнологической технологии. Преобладающее большинство препаратов из лекарственных базидиомицетов, созданы на основе высокомолекулярных полисахаридных фракций. В научной литературе содержится информация о биологической активности различных фракций полисахаридов, выделенных из плодовых тел *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*. Полученные из этих культур полисахаридные препараты, показали себя как эффективные средства, обладающие не только противоопухолевой активностью, но и антимикробными, иммуностимулирующими,

гепатопротекторными, противовоспалительными, противоаллергенными, антиоксидантными, противовирусными свойствами, при отсутствии токсического действия на организм человека.

Однако, помимо полисахаридов, существует множество биологически активных соединений, продуцируемых грибами, которые могут не только стимулировать иммунную систему, но и модулировать специфические клеточные реакции. Например, имеется мало информации относительно биоактивных белков и гликопротеинов, проявляющих противоопухолевую и иммуномодулирующую активности. Учитывая это, исследования направленные на изучение цитотоксичности гликопротеиновых фракций лекарственных базидиомицетов на раковые клетки носят приоритетный характер. Кроме того, разработка натуральных иммуномодулирующих и противораковых препаратов из полисахаридов лекарственных макромицетов затрудняется тем, что используются высокомолекулярные соединения, которые невозможно синтезировать и, следовательно, их производство ограничивается извлечением из плодовых тел или вегетативного мицелия грибов. Такой подход создает высокие рыночные цены, а фармацевтические компании больше интересуются производством относительно легко синтезируемых соединений. Поэтому по данному вопросу научная новизна состоит в изучении противоопухолевого и лечебного действия низкомолекулярных белковых соединений и вторичных метаболитов, продуцируемых лекарственными грибами. Следует также отметить, что различные линии раковых клеток животных и человека могут по-разному реагировать на один и тот же агент. Поэтому целесообразно проводить сравнительные исследования противоопухолевой активности белковых и полисахаридных фракций, полученных из вегетативного мицелия и плодовых тел базидиомицетов, на различных опухолевых клетках.

Наши исследования направлены на выявление противоопухолевых и иммуностимулирующих метаболитов базидиальных макромицетов, различающихся направленностью и механизмом действия, и содержащихся, как в плодовых телах, так и в вегетативном мицелии. Выявление грибных культур и использование их в биотехнологии приведет к повышению конкурентоспособности и эффективности способов получения и применения биологически активных грибных метаболитов. В связи с этим, особенно приоритетным является сравнительное изучение противоопухолевой активности и механизмов действия на опухолевые клетки белковых и полисахаридных грибных фракций и отдельных белков из вегетативного мицелия и плодовых тел лекарственных базидиомицетов. Исследование путей и молекулярных механизмов, связанных с деградацией опухолевых клеток нетоксичными природными метаболитами, открывает новые перспективы в предупреждении и лечении онкологических заболеваний. На основе полученных результатов будут предложены рекомендации по разработке на основе конкретных грибных фракций препаратов, перспективных в комплексной терапии онкологических заболеваний.

ГЛАВА 3. «ЗЕЛЕНый» СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ, ОПОСРЕДОВАНный ГРИБАМИ

Нанотехнологии и наноматериалы являются быстро развивающимися областями, которые вносят большой вклад в развитие современных технологий. Наночастицы находят применение в различных областях, таких как здравоохранение, биомедицина, пищевая и химическая промышленность, доставка лекарств и генов, механика, оптика, охрана окружающей среды и многих других (Sharma *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2016). Важнейшей задачей современной нанотехнологии является разработка простых, эффективных, надежных и дешевых методов, позволяющих получать высоко монодисперсные, стабильные и биосовместимые наночастицы с необходимыми параметрами: химическим составом, формой, размером, биологической активностью и другими свойствами.

3.1 Способы получения наночастиц

Методы получения наночастиц можно разделить на физические, химические и биологические (или биоассистированные) (Dhand *et al.*, 2015; Krichevsky, 2018; Krichevsky *et al.*, 2023), а также комбинированные методы, объединяющие биологические материалы и физические воздействия, такие как микроволновое излучение (Joseph and Mathew, 2015; Shakibaie *et al.*, 2021). Традиционно используемые для получения наночастиц химические и физические методы позволяют синтезировать большие количества частиц за короткое время (Dykman and Khlebtsov, 2019). Однако они часто дороги и сложны в исполнении, также большой проблемой является вопрос их вреда для окружающей среды. Повышение внимания к экологической безопасности, истощаемости природных ресурсов и безопасности для здоровья человека привело к росту развития зеленых технологий производства наночастиц методами биологического синтеза (Kharissova *et al.*, 2013; Palomo and Filice, 2016; Ovais *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2020; Grasso *et al.*, 2020; Mughal *et al.*, 2021; Saravanan *et al.*, 2021). Благодаря своей экологической безопасности и меньшей ресурсоемкости, чем другие методы, синтез нетоксичных и биосовместимых наночастиц с использованием живых организмов и различных биологических материалов, полученных из них, является многообещающей альтернативой физическим и химическим методам изготовления. Внедрение методов зеленого синтеза позволяет снизить негативное воздействие нанотехнологий на окружающую среду за счет использования менее токсичных реагентов и снижения рисков вторичного загрязнения. Кроме того, наночастицы, полученные путем биологического синтеза, могут обладать высокой стабильностью и биосовместимостью и более низкой токсичностью благодаря их покрытию биогенными поверхностно-активными веществами или покрывающими агентами (Schröfel *et al.*, 2014; Castro-Longoria, 2016; Das *et al.*, 2017).

Способность образовывать наночастицы обнаружена во всех группах организмов. Многочисленные исследования показали, что растения (Vijayaraghavan and Ashokkumar, 2017; Majeed *et al.*, 2018; Sorbiun *et al.*, 2018; Bao and Lan, 2019), животные (Singh *et al.*, 2015; Jaganathan *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2017), бактерии (Singh *et al.*, 2015; Koul *et al.*, 2021), грибы (Castro-Longoria, 2016; Owaid and Ibraheem, 2017; Adebayo *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022), актиномицеты (Manimaran and Kannabiran, 2017; Kumari *et al.*, 2020), водоросли (Singh *et al.*, 2015; Bao and Lan, 2019; Chaudhary *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021), лишайники (Hamida *et al.*, 2021) и вирусы (Das *et al.*, 2017) могут быть успешно использованы для производства наночастиц. Наряду с живыми культурами, в зеленом наносинтезе могут быть использованы их биомасса, клеточные фракции, экстракты, метаболиты и отработанные среды (Zhang *et al.*, 2011; Durán *et al.*, 2015; Castro-Longoria, 2016; Majeed *et al.*, 2018; Ovais *et al.*, 2018; Bao and Lan, 2019), а также различные растительные и животные пищевые продукты (Khanna and Nair, 2009; Lee *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; González Fá *et al.*, 2017) и органические промышленные отходы (Krishnaswamy *et al.*, 2014; Ibrahim, 2015; Bagherzade *et al.*, 2017).

Грибные культуры являются весьма перспективными биологическими объектами для зеленого синтеза наночастиц (Boroumand Moghaddam *et al.*, 2015; Madden *et al.*, 2015; Castro-Longoria, 2016; Bhardwaj *et al.*, 2020; Adebayo *et al.*, 2021). Биогенный синтез наночастиц с использованием различных микологических культур и полученных из них веществ является перспективным, простым и экологически чистым методом. Преимуществом грибов по сравнению с другими организмами является их способность продуцировать широкий спектр биологически активных соединений. Они обладают набором мощных ферментативных систем, благодаря которым способны образовывать наночастицы различных химических элементов, переводить ионы тяжелых металлов и других микроэлементов в менее токсичные формы и накапливать их в больших количествах как внутри своего мицелия, так и внеклеточно. Поэтому наносинтез с участием грибов все чаще изучается в последние два десятилетия. У разных культур грибов обнаружена способность образовывать широкий спектр наночастиц различного химического состава, включая металлы, металлоиды, оксиды и сульфиды металлов и другие соединения, а также композитные наночастицы (Boroumand Moghaddam *et al.*, 2015; Owaid and Ibraheem, 2017; Bhanja *et al.*, 2020).

Все биологические методы наносинтеза можно разделить на два основных типа. В первом из них живые культуры используются непосредственно в качестве «нанофабрик», образуя наночастицы *in vivo* и накапливая их в своих клетках, на своей клеточной поверхности или в среде. Можно также использовать биомассу грибов, отделенную от культуральной жидкости. Недостатком этого метода является необходимость отделения полученных наночастиц от клеток биообъекта; кроме того, процесс биосинтеза растущими культурами может занять длительное время. Уровень прекурсора также может быть ограничивающим

фактором, поскольку высокие концентрации металлов и других соединений, используемых для биосинтеза наночастиц, подавляют процессы роста.

Другим вариантом синтеза зеленых наночастиц является использование различных веществ, полученных из биообъектов, таких как культуральные жидкости, внутриклеточные экстракты, белковые фракции или отдельные метаболиты грибов. Использование таких методов значительно облегчает процесс наносинтеза, поскольку нет необходимости разрушать клетки продуцирующего организма и отделять от них наночастицы. Краткое представление о вариантах микосинтеза наночастиц представлено на рисунке (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Микосинтез наночастиц
(Loshchinina, Vetchinkina, Kupryashina // Biomimetics, 2023b
<https://doi.org/10.3390/biomimetics8020224>)

Физико-химические свойства наночастиц тесно связаны не только с их химическим составом и кристаллической структурой, но также с их размером и морфологией, включая физическую форму частиц, топографию поверхности и наличие пор и полостей (Albanese *et al.*, 2012; Guisbiers *et al.*, 2012). Важно чтобы синтезированные наночастицы были однородными по размеру и форме и устойчивыми к агрегации в суспензиях. Свойства биогенных наночастиц зависят от вида и штамма микроорганизма, используемых экстрактов и метаболитов, исходного соединения и его концентрации, состава среды, скорости перемешивания, времени инкубации, температуры, pH и других условий, варьирование которых может контролировать образование частиц (Khandel and Shahi, 2018; Qu *et al.*, 2021).

3.2 Микосинтез наночастиц серебра

3.2.1 Грибы, восстанавливающие ионы серебра с образованием наночастиц

На сегодняшний день биологический синтез наночастиц серебра посредством грибных культур является наиболее изученным из всех элементов. Способность производить наносеребро была обнаружена у более чем 120 видов грибов из разных таксонов, включая **Ascomycota** (*Alternaria* (Win *et al.*, 2020), *Aspergillus* (Elegbede *et al.*, 2018; Nanda *et al.*, 2018), *Beauveria* (Tyagi *et al.*, 2019), *Bionectria* (Rodrigues *et al.*, 2012), *Bipolaris* (Fatima *et al.*, 2015), *Botryodiplodia* (Janakiraman *et al.*, 2019), *Chrysosporium* (Soni and Prakash, 2011), *Cladosporium* (Haulikere and Joshi, 2019), *Colletotrichum* (Azmath *et al.*, 2016), *Epicoccum* (Qian *et al.*, 2013), *Fusarium* (Ingle *et al.*, 2009; Ishida *et al.*, 2013), *Geotricum* (Jebali *et al.*, 2011), *Guignardia* (Balakumaran *et al.*, 2015), *Helvella* (Talie *et al.*, 2020), *Hormoconis* (Varshney *et al.*, 2009), *Humicola* (Syed *et al.*, 2013), *Macrophomina* (Chowdhury *et al.*, 2014), *Neurospora* (Quester *et al.*, 2016), *Paecilomyces* (Devi and Joshi, 2012), *Penicillium* (Danagoudar *et al.*, 2020; Wanarska and Maliszewska, 2019; Pareek *et al.*, 2020; Feroze *et al.*, 2019; Seetharaman *et al.*, 2021; Neethu *et al.*, 2018), *Pestalotia* (Raheman *et al.*, 2011), *Phoma* (Gade *et al.*, 2014; Rai *et al.*, 2015), *Picoa* (Owaid *et al.*, 2022), *Saccharomyces* (Korbekandi *et al.*, 2016), *Sclerotinia* (Saxena *et al.*, 2016), *Scopulariopsis* (Moustafa, 2017), *Talaromyces* (Hu *et al.*, 2019), *Tirmania* (Owaid, 2022), *Trichoderma* (Elegbede *et al.*, 2018; Murillo-Rábago *et al.*, 2022; Qu *et al.*, 2021; Raja *et al.*, 2021; Saravanakumar and Wang, 2018), *Verticillium* (Mukherjee *et al.*, 2001), *Yarrowia* (Apte *et al.*, 2013)), **Mucoromycota** (*Rhizopus* (Ottoni *et al.*, 2017)) и **Basidiomycota** (*Agaricus* (Klaus *et al.*, 2020; Owaid *et al.*, 2020; Jameel *et al.*, 2022; Krishnamoorthi *et al.*, 2022), *Auricularia* (Abikoye *et al.*, 2019), *Bjerkandera* (Osorio-Echavarría *et al.*, 2021), *Boletus* (Kaplan *et al.*, 2021), *Calocybe* (Mirunalini *et al.*, 2012), *Coriolus* (Kaplan *et al.*, 2021), *Cryptococcus* (Fernández *et al.*, 2016), *Flammulina* (Faisal *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), *Fomes* (Rehman *et al.*, 2020a), *Fomitopsis* (Rehman *et al.*, 2020b), *Ganoderma* (Dandapat *et al.*, 2022; Mohanta *et al.*, 2018; Murillo-Rábago *et al.*, 2022), *Hypsizygus* (Shivashankar *et al.*, 2013), *Inonotus* (Jaloot *et al.*, 2020), *Lactarius* (Vamanu *et al.*, 2018), *Laxitextum* (Javier *et al.*, 2022), *Lentinus* (Lateef and Adeeyo, 2015; Debnath *et al.*, 2019), *Microporus* (Balashanmugam *et al.*, 2013), *Phaenerochaete* (Saravanan *et al.*, 2018), *Phellinus* (Klaus *et al.*, 2020), *Piriformospora* (Aziz *et al.*, 2019), *Pleurotus* (Kaur *et al.*, 2020; Acay and Baran, 2020; Chaturvedi *et al.*, 2020; Martínez-Flores *et al.*, 2021), *Pycnoporus* (Chan and Don, 2013), *Rhodotorula* (Cunha *et al.*, 2018), *Schizophyllum* (Arun *et al.*, 2014), *Trametes* (Kobashigawa *et al.*, 2019), *Tricholoma* (Anthony *et al.*, 2014), *Volvariella* (Philip, 2009)).

Базидиомицеты представляют особый интерес как перспективные биообъекты для изготовления наночастиц. Большинство базидиомицетов, изученных для микосинтеза, относятся к съедобным и лекарственным грибам, многие из которых выращиваются в искусственной культуре. Эти грибы продуцируют широкий спектр биологически активных молекул, которые не только могут действовать как биоконтейнеры и стабилизирующие агенты, но и сами обладают

противораковой, противовоспалительной, антиоксидантной и антимикробной активностью, что позволяет производить наночастицы со сложными биомедицинскими свойствами. В последние годы постоянно растет число исследований по микосинтезу наносеребра, что говорит о неослабевающем интересе и востребованности данных научных изысканий. Насчитываются десятки научных работ, в которых описывается получение биогенных наночастиц этого элемента с использованием культур грибов (Khan *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Guilger-Casagrande *et al.*, 2019). В таблице приведены наиболее полные и значимые публикации по микосинтезу наночастиц серебра за последние пять лет (Таблица 1). Как видно из таблицы, наночастицы серебра обычно имеют сферическую форму; неправильная, овальная, кубическая, треугольная, многоугольная и другие формы встречаются реже. Экстракты из плодовых тел и мицелия являются наиболее часто используемым биологическим материалом для микосинтеза наночастиц серебра, в то время как культуральные жидкости, биомасса, живые культуры и грибные метаболиты различной чистоты (включая ферменты, полисахариды и фенольные соединения) используются исследователями гораздо реже.

Таблица 1 – Микосинтез наночастиц серебра

Вид (грибная культура)	Источник	Соединение	Свойства наночастиц	Ссылка
<i>Agaricus arvensis</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (10–20 нм) Нерегулярные сферы (10–100 нм) Сферы (1–10 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Agaricus bisporus</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (10–20 нм) Нерегулярные сферы (10–100 нм) Сферы (1–10 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Agaricus bisporus</i>	Общая полисахаридная фракция	AgNO ₃	Нерегулярные квази-сферы (20–40 нм)	Klaus <i>et al.</i> , 2020
<i>Agaricus bisporus</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Гранецентрированная кубическая форма (средний размер 43.9 нм)	Owaid <i>et al.</i> , 2020
<i>Agaricus bisporus</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Кубики (средний размер 50.44 нм)	Jameel <i>et al.</i> , 2022
<i>Agaricus bisporus</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 16 нм)	Krishnamoorthi <i>et al.</i> , 2022
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Общая фракция полисахаридов	AgNO ₃	Нерегулярные квази-сферы (20–40 нм)	Klaus <i>et al.</i> , 2020

<i>Alternaria sp.</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (3–10 нм)	Win <i>et al.</i> , 2020
<i>Aspergillus niger</i>	Ксиланаза (грубая фракция)	AgNO ₃	Сферы, цилиндры, овалы (15.21–77.49 нм)	Elegbede <i>et al.</i> , 2018
<i>Auricularia polytricha</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (5–50 нм)	Abikoye <i>et al.</i> , 2019
<i>Beauveria bassiana</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Треугольники, шестиугольники, круги (10–50 нм)	Tyagi <i>et al.</i> , 2019
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Неопределенная форма (66.75–111.23 нм)	Janakiraman <i>et al.</i> , 2019
	Мицелиальная биомасса	AgNO ₃	Неопределенная форма (62.77–103 нм)	
<i>Flammulina velutipes</i>	Грибной экстракт	AgNO ₃	Сферы (средний размер 21.4 нм)	Faisal <i>et al.</i> , 2020
<i>Flammulina velutipes</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 22 нм)	Zhang <i>et al.</i> , 2020
<i>Fomes fomentarius</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (10–20 нм)	Rehman <i>et al.</i> , 2020a
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (10–30 нм)	Rehman <i>et al.</i> , 2020b
<i>Ganoderma applanatum</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 58.77 нм)	Dandapat <i>et al.</i> , 2022
<i>Ganoderma lucidum</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (10–20 нм) Нерегулярные сферы (10–100 нм) Сферы (1–10 нм) Кубики (20–200 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Ganoderma lucidum</i>	Грибной экстракт	AgNO ₃	Сферы (23–58 нм)	Al-Ansari <i>et al.</i> , 2020
<i>Ganoderma lucidum</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (15–22 нм)	Aygün <i>et al.</i> , 2020
<i>Ganoderma lucidum</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 11.38 нм)	Dat <i>et al.</i> , 2021
<i>Ganoderma sessile</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Квази-сферы (средний размер 5.4 или 8.9 нм в зависимости от метода экстракции)	Murillo-Rábago <i>et al.</i> , 2022
<i>Ganoderma sessiliforme</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 45 нм)	Mohanta <i>et al.</i> , 2018

<i>Grifola frondosa</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (10–20 нм) Нерегулярные сферы (10–100 нм) Сферы (1–10 нм) Сферы (80–100 нм), агрегаты	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Helvella leucopus</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (80–100 нм), агрегаты	Talie <i>et al.</i> , 2020
<i>Lactarius piperatus</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 49 нм)	Vamanu <i>et al.</i> , 2018
<i>Lentinula edodes</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (10–20 нм) Нерегулярные сферы (10–100 нм), сферические конгломераты (50–250 нм) Сферы (1–10 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Lentinus tuber-regium</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (5–35 нм)	Debnath <i>et al.</i> , 2019
<i>Penicillium citrinum</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (2–5 нм)	Danagoudar <i>et al.</i> , 2020
<i>Penicillium cyclopium</i>	Мицелиальная биомасса	AgNO ₃	В основном неправильная форма (12–25 нм)	Wanarska and Maliszewska, 2019
<i>Penicillium janthinellum</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (1–30 нм)	Pareek <i>et al.</i> , 2020
<i>Penicillium oxalicum</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (60–80 нм)	Feroze <i>et al.</i> , 2019
<i>Penicillium oxalicum</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (средний размер 52.26 нм)	Seetharaman <i>et al.</i> , 2021
<i>Penicillium polonicum</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Преимущественно сферы (10–15 нм), шестиугольники, многогранники (более 30 нм)	Neethu <i>et al.</i> , 2018
<i>Phaenerochaete chrysosporium</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы, овалы (34–90 нм)	Saravanan <i>et al.</i> , 2018
<i>Phellinus linteus</i>	Общая полисахаридная фракция	AgNO ₃	Нерегулярные квази-сферы (20–40 нм)	Klaus <i>et al.</i> , 2020
<i>Picoa</i> sp.	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Неправильная форма (средний размер 19.5 нм)	Owaid <i>et al.</i> , 2022
<i>Pleurotus djamor</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 55.76 нм)	Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2021

<i>Pleurotus eryngii</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 18.45 нм)	Açay and Baran, 2020
<i>Pleurotus florida</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 10 нм)	Kaur <i>et al.</i> , 2019
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (10–20 нм) Нерегулярные сферы (10–100 нм) Сферы (1–10 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы, шестиугольники (18–82 нм)	Iruoma <i>et al.</i> , 2021
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 28.44 нм)	Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2021
<i>Pleurotus sajor caju</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (11–44 нм)	Bhardwaj and Naraian, 2020
<i>Pleurotus sajor caju</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Сферы (средний размер 15–20 нм)	Chaturvedi <i>et al.</i> , 2020
<i>Tirmania sp.</i>	Экстракт из плодовых тел	AgNO ₃	Неправильная форма, сферы (средний размер 72 нм)	Owaid, 2022
<i>Trametes trogii</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Преимущественно сферы (5–65 нм)	Kobashigawa <i>et al.</i> , 2019
<i>Trichoderma atroviride</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Неопределенная форма (15–25 нм)	Saravanakumar and Wang, 2018
<i>Trichoderma atroviride</i>	Культуральная жидкость	AgNO ₃	Сферы (20–30 нм)	Qu <i>et al.</i> , 2021
	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (15–35 нм)	
<i>Trichoderma harzianum</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (10–25 нм)	Raja <i>et al.</i> , 2021
<i>Trichoderma harzianum</i>	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Квази-сферы (средний размер 9.6 или 19.1 нм в зависимости от метода экстракции)	Murillo-Rábago <i>et al.</i> , 2022
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ксиланаза (грубая фракция)	AgNO ₃	Сферы, цилиндры, овалы (15.21–77.49 нм)	Elegbede <i>et al.</i> , 2018
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Культуральная жидкость	AgNO ₃	Сферы (5–15 нм)	Qu <i>et al.</i> , 2021
	Мицелиальный экстракт	AgNO ₃	Сферы (10–25 нм)	

3.2.2 Условия получения и параметры микогенных наночастиц серебра

Форма, размер, однородность и стабильность наночастиц зависят от условий процесса, оптимизация которых может улучшить качество полученных частиц. Например, Mohanta *et al.* использовали различные соотношения экстракта гриба *G. sessiliforme* к AgNO_3 для синтеза наночастиц серебра (Mohanta *et al.*, 2018). При соотношении 0.5:10 наночастицы образовывались очень медленно; при соотношении 1.5:10 реакция была очень быстрой, но наночастицы образовывали большие агрегаты. Соотношение 1:10 было оптимальным и позволило авторам получить наночастицы со средним размером 45 нм с антимикробной и антиоксидантной активностью. В другом исследовании использование экстракта плодового тела *G. lucidum* было тщательно изучено при различных рабочих условиях, включая соотношение AgNO_3 : экстракт, время реакции и температуру, чтобы установить эффективный метод миконаносинтеза с высокой производительностью и стабилизацией наночастиц (Dat *et al.*, 2021). Параметрическая оптимизация, включая концентрацию AgNO_3 , биомассу гриба, соотношение клеточного фильтрата к AgNO_3 , pH, время реакции и присутствие света, была выполнена для быстрого синтеза наночастиц серебра *P. polonicum* (Neethu *et al.*, 2018). Для *T. harzianum* и *G. sessile* сравнивали различные методы мицелиальной экстракции для микосинтеза серебра. Экстракт, содержащий внутриклеточные компоненты штаммов грибов, получали из механически разрушенного мицелия, в то время как для экстракта, содержащего внеклеточные компоненты штаммов грибов, биомассу извлекали без разрушения. Второй метод производил более мелкие частицы (Murillo-Rábago *et al.*, 2022).

Ряд исследователей провели скрининг грибных культур, чтобы найти наиболее перспективные для биопроизводства наночастиц серебра. Например, были изучены 10 видов *Trichoderma* и обнаружено, что наночастицы серебра, полученные с использованием разных видов, различались по степени антимикробной активности (Qu *et al.*, 2021). Другие исследователи обнаружили, что среди девяти различных грибов, выделенных из богатых металлами участков, штамм *P. janthinellum* продемонстрировал максимальную толерантность к металлам и способность к синтезу серебряных наночастиц (Pareek *et al.*, 2020).

Также, изучалось влияние различных дополнительных внешних физических воздействий на образование наночастиц, опосредованное грибами, и были разработаны комбинированные методы миконаносинтеза для улучшения характеристик серебряных наночастиц. Например, УФ-излучение улучшило характеристики наночастиц, полученных с использованием экстракта *A. bisporus* (Owaid *et al.*, 2020). Микроволновое облучение улучшило свойства наночастиц серебра, синтезированных с использованием экстракта плодового тела *P. sajor-caju* (Chaturvedi *et al.*, 2020). Наночастицы серебра были синтезированы из экстрактов плодового тела *P. florida* с использованием различных электромагнитных излучений, микроволн, видимого света и УФ-лучей (Kaur *et al.*, 2020). Микроволновое облучение привело к синтезу монодисперсных

наночастиц размером 10 нм в течение 150 секундного воздействия, тогда как видимый свет и УФ-излучение привели к синтезу полидисперсных наночастиц с непоследовательными размерами.

3.2.3 Свойства и применение микогенных наночастиц серебра

Благодаря своим уникальным особенностям наночастицы серебра имеют множество применений в различных областях медицины и техники. Область их применения включает электронные компоненты, биомедицинские устройства, текстильную и сельскохозяйственную инженерию, они эффективны в катализе химических реакций, в качестве биомаркеров, для производства антистатических, биосенсорных, криогенных и сверхпроводящих материалов, косметических средств, и многое другое (Gade *et al.*, 2010; Abbasi *et al.*, 2016; Austin *et al.*, 2014; Rafique *et al.*, 2017; Razak *et al.*, 2021).

Многочисленные исследования показали, что микосинтезированные наночастицы серебра обладают широким спектром биологической активности, включая антибактериальные, противогрибковые, противовирусные, противоопухолевые, антиоксидантные, гепатопротекторные и гипотензивные свойства, поэтому они активно используются в терапевтических целях (Khan *et al.*, 2018; Ratan *et al.*, 2020). Например, серебряные наносферы, полученные с использованием *F. velutipes*, обладали бактерицидной, фунгицидной, противоальцгеймеровской, противораковой, антиоксидантной и противодиабетической активностью, а также хорошей биосовместимостью с эритроцитами человека (Faisal *et al.*, 2021). Серебряные наносферы, полученные с использованием ксиланаз *A. niger* и *T. longibrachiatum*, проявляли антибактериальную, противогрибковую, антиоксидантную, антикоагулянтную, тромболитическую и деградирующую красители активность (Elegbede *et al.*, 2018). Наночастицы серебра обладают выраженным антимикробным действием против грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая штаммы с высокой лекарственной устойчивостью (Panáček *et al.*, 2006; Birla *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009). Все эти свойства открывают большие перспективы, в том числе, и для биомедицинского применения микогенных наночастиц серебра.

3.3 Микосинтез наночастиц золота

3.3.1 Грибы, восстанавливающие ионы золота с образованием наночастиц

За последние два десятилетия биологический синтез золотых наночастиц грибами изучался почти так же широко, как и серебра. Информацию, посвященную биосинтезу наночастиц золота с использованием грибов, механизмам образования наночастиц и их биомедицинским применениям можно найти в обзорах (Kitching *et al.*, 2015; Nadeem *et al.*, 2017; SI *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020).

Способность образовывать наночастицы золота была обнаружена у десятков видов микро- и макромицетов. В таблице приведены данные по микосинтезу наночастиц золота, опубликованные за последние пять лет (Таблица 2). Как и в случае с серебром, способность к биосинтезу наночастиц золота изучалась в основном у аскомицетов и базидиомицетов. Микогенные наночастицы золота чаще всего имеют сферическую форму, но были обнаружены также треугольные, гексагональные, кубические, неправильные и другие формы.

Таблица 2 – Микосинтез золотых наночастиц

Вид (грибная культура)	Источник	Соединение	Свойства наночастиц	Ссылка
<i>Agaricus arvensis</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	HAuCl ₄	Сферы (5–50 нм) Сферы (2–10 нм) Нерегулярные сферы (20–25 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Agaricus bisporus</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Сферы (средний размер 25 нм)	Eskandari-Noje dehi <i>et al.</i> , 2018
<i>Agaricus bisporus</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	HAuCl ₄	Сферы (5–50 нм) Сферы (2–10 нм) Сферы (10–50 нм), шести-, четырех-, треугольники (30–100 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Agaricus bisporus</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Овалы, сферы, шести-, треугольники средний размер 53 нм	Dheyab <i>et al.</i> , 2020
<i>Agaricus bisporus</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Сферы (10–50 нм)	Krishnamoorthi <i>et al.</i> , 2021
<i>Alternaria spp.</i>	Грибной экстракт	HAuCl ₄	Треугольники, круги (средний размер 28 нм)	Hemashekhar <i>et al.</i> , 2019
<i>Cantharellus sp.</i>	Грибной экстракт	HAuCl ₄	Сферы (средний размер 60.6 нм)	Jha <i>et al.</i> , 2021
<i>Coprinus comatus</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Гранецентрированная кубическая форма средний размер 17 нм	Naeem <i>et al.</i> , 2021
<i>Flammulina velutipes</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Треугольники, сферы, неправильная форма (средний размер 74.32 нм)	Rabeea <i>et al.</i> , 2020
<i>Fusarium oxysporum</i>	Культуральная жидкость	HAuCl ₄	Сферы, шестиугольники (22–30 нм)	Naimi-Shamel <i>et al.</i> , 2019
<i>Fusarium solani</i>	Экстракт из грибной	HAuCl ₄	Цветкообразные и игольчатые структуры	Clarance <i>et al.</i> , 2020

	биомассы		веретеновидной формы (40–45 нм)	
<i>Ganoderma applanatum</i>	Фракция фенольных соединений	HAuCl ₄	Гранецентрированная кубическая форма средний размер 19 нм	Abdul-Hadi <i>et al.</i> , 2020
<i>Ganoderma lucidum</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	HAuCl ₄	Сферы (5–50 нм) Сферы (5–60 нм) Сферы (10–50 нм), шести-, четырех-, треугольники (30–100 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Ganoderma lucidum</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Сферы, овалы, неправильная форма (1–100 нм) Нерегулярные формы (5–30 нм)	Elumalai <i>et al.</i> , 2021; Nohwal <i>et al.</i> , 2020
<i>Grifola frondosa</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	HAuCl ₄	Сферы (5–50 нм) Сферы (2–10 нм) Сферы (10–50 нм), шести-, четырех-, треугольники (30–100 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Inonotus obliquus</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Преимущественно сферы (менее 20 нм)	Shukurov <i>et al.</i> , 2022
<i>Laetiporus versisporus</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Сферы (средний размер 10 нм)	Farzana <i>et al.</i> , 2022
<i>Lentinula edodes</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Треугольники, сферы, шестиугольники, неправильная форма (средний размер 72 нм)	Owaid <i>et al.</i> , 2019
<i>Lentinula edodes</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт Mn-пероксидаза лактаза и тирозиназа	HAuCl ₄	Сферы (5–50 нм) Сферы (2–20 нм) Сферы (10–50 нм), шести-, четырех-, треугольники (30–200 нм) Сферы (2–20 нм) Сферы, треугольники тетраэдры (5–120 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2017; Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Morchella esculenta</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Гранецентрированная кубическая форма средний размер 17 нм	Acay, 2020
<i>Penicillium janthinellum</i>	Мицелиальный экстракт	HAuCl ₄	Сферы (1–40 нм)	Pareek <i>et al.</i> , 2020
<i>Phoma</i> sp.	Мицелиальная биомасса	HAuCl ₄	Сферы (10–100 нм)	Soltani Nejad <i>et al.</i> , 2022
<i>Pleurotus ferulae</i>	Полисахарид	HAuCl ₄	Сферы (15.5–68.7)	Yuan <i>et al.</i> , 2023
<i>Pleurotus</i>	Живая культура	HAuCl ₄	Сферы (5–50 нм)	Vetchinkina <i>et</i>

<i>ostreatus</i>	Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт Внеклеточный экстракт		Сферы (2–20 нм) Сферы (10–50 нм), шести-, четырех-, треугольники (30–200 нм) Сферы (10–100 нм)	<i>al.</i> , 2019; El Domany <i>et al.</i> , 2018
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Экстракт из плодовых тел	HAuCl ₄	Сферы (средний размер 16–18 нм)	Chaturvedi <i>et al.</i> , 2020
<i>Trichoderma hamatum</i>	Мицелиальный экстракт	HAuCl ₄	Сферы, пяти-, шестиугольники (5–30 нм)	Abdel-Kareem and Zohri, 2018
<i>Trichoderma harzianum</i>	Мицелиальная биомасса	HAuCl ₄	Сферы (менее 30 нм)	Nascimento <i>et al.</i> , 2021
<i>Tricholoma crassum</i>	Мицелиальный экстракт	HAuCl ₄	Круглая, ромбовидная (≤ 5 нм), кубическая, шести-, треугольная формы (4.36–22.94 нм)	Basu <i>et al.</i> , 2018

(Loshchinina, Vetchinkina, Kupryashina // Biomimetics, 2023a
<https://doi.org/10.3390/biomimetics8010001>)

3.3.2 Условия получения и параметры микогенных наночастиц золота

Игольчатые и цветкообразные наноструктуры с веретенообразной формой были получены с использованием экстракта биомассы *Fusarium solani* (Clarance *et al.*, 2020). Сферические и гексагональные частицы размером 22–30 нм были микосинтезированы с использованием культуральной жидкости *F. oxysporum* (Naimi-Shamel *et al.*, 2019). Сферические, пентагональные и гексагональные наночастицы (5–30 нм) были получены с использованием экстракта мицелия *T. hamatum* (Abdel-Kareem and Zohri, 2018). Авторы оптимизировали условия для синтеза наночастиц золота с наименьшим размером с использованием *T. hamatum*. Наночастицы, биосинтезированные с использованием мицелиальной биомассы *T. harzianum*, имели нанометрическое распределение размеров менее 30 нанометров и сферическую форму (Nascimento *et al.*, 2021).

Molnár *et al.* изучали микосинтез наночастиц золота с 29 видами термофильных грибов и сравнили результаты трех различных подходов к синтезу золотых наночастиц с использованием внеклеточной фракции, автолизата или внутриклеточной фракции грибов (Molnár *et al.*, 2018). Наблюдали образование наночастиц с размерами в диапазоне от 6 до 40 нм и распределением размеров в зависимости от штамма и условий эксперимента.

Экстракт из плодовых тел *A. bisporus* был приготовлен и использован в качестве восстанавливающего и стабилизирующего агента для зеленого синтеза золотых наночастиц (Krishnamoorthi *et al.*, 2021). Различные параметры, такие как концентрация предшественника, соотношение предшественника и экстракта, pH, температура, режим реакции и время реакции,

были оптимизированы для микосинтеза золотых наночастиц. Наночастицы полученные Dheyab *et al.* с использованием экстракта плодового тела *A. bisporus*, были овальными, сферическими, барабанообразными, гексагональными и треугольными (средний размер 53 нм) (Dheyab *et al.*, 2020). Экстракт гриба *A. bisporus* также использовался для синтеза золотых наносфер с помощью гидротермального процесса (при давлении 15 фунтов на квадратный дюйм и температуре 121°C в течение 15 минут) (Eskandari-Nojehdehi *et al.*, 2018). Были выбраны оптимальные условия для максимальной концентрации и стабильности наночастиц. Chaturvedi *et al.* объединили синтез золотых наночастиц с использованием экстракта плодового тела *P. sajor-caju* с последующим микроволновым раздражением для дальнейшего усиления эффектов изготовленных золотых наносфер (Chaturvedi *et al.*, 2020). Были получены золотые наночастицы различной формы с использованием экстракта мицелия *T. crassum* (Basu *et al.*, 2018). Они показали, что размер частиц можно изменять, изменяя параметры синтеза, такие как температура и концентрации субстрата и предшественника. При использовании экстракта плодового тела *L. edodes* были получены наночастицы золота различных форм (Owaïd *et al.*, 2019). Смесь треугольных, сферических и неправильных форм со средним размером 74 нм была изготовлена с использованием экстракта плодового тела *F. velutipes* (Rabeea *et al.*, 2020).

Было исследовано производство золотых наночастиц экстрактом плодового тела *S. comatus* и влияние УФ-облучения в разное время на размер наночастиц (Naeem *et al.*, 2021). Золотые наносферы, со средним размером 61 нм, были также получены с использованием экстрактов плодовых тел *Cantharellus sp.* (Jha *et al.*, 2021) и *L. versisporus* (средний размер частиц 10 нм) (Farzana Fathima *et al.*, 2022).

При синтезе наночастиц золота с использованием экстракта *Talaromyces flavus* наблюдалась прямая корреляция между образованием наночастиц и концентрацией восстановителя, присутствующего в экстракте. Кинетическое исследование показало, что процесс биовосстановления представляет собой автокаталитическую реакцию (Priyadarshini *et al.*, 2013).

В исследовании (Owaïd *et al.*, 2017) два экстракта *Pleurotus cornucopiae* (из свежих и сушеных грибов) были исследованы как факторы восстановления для биосинтеза золотых наночастиц. Экстракт из свежих грибов показал лучшие параметры восстановления.

3.3.3 Свойства и применение микогенных наночастиц золота

Золотые наночастицы привлекли внимание благодаря своим уникальным оптическим, электронным, термическим, химическим и биологическим свойствам. Они использовались в химическом и биологическом зондировании, биовизуализации, нелинейной оптике, катализе, целевой доставке лекарств, доставке генов и в качестве антимикробных и антиоксидантных агентов, а также в терапии рака, болезни Альцгеймера, сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний (Ahmed *et al.*, 2016; Elahi *et al.*, 2018; Kalimuthu *et al.*, 2020).

Наночастицы золота различной формы со значительной антибактериальной, антиоксидантной и антимицетической активностью были получены с использованием экстракта *Alternaria spp.* (Hemashekhar *et al.*, 2019). Золотые наносферы (10–100 нм) с антибактериальными и противогрибковыми свойствами были получены с использованием мицелиальной биомассы *Phoma sp.* (Soltani Nejad *et al.*, 2022).

Кубические наночастицы золота с сильной антимикробной, цитотоксической и антиоксидантной активностью были синтезированы с использованием экстракта плодового тела *M. esculenta* (Acaу, 2020). Синтезированные золотые наносферы (10–50 нм) значительно ингибировали рост клинически важных патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий и патогенных грибов (Krishnamoorthi *et al.*, 2021).

Гранецентрированные кубические нанокристаллы со свойствами восстановления синтетических красителей были синтезированы с использованием фенольных соединений, выделенных из *G. applanatum* (Abdul-Hadi *et al.*, 2020). Наночастицы золота сферической и овальной формы размером от 1 до 100 нм, полученные с использованием экстракта плодового тела *G. lucidum*, демонстрировали противораковые свойства (Elumalai *et al.*, 2021).

Экстракт лекарственного гриба чаги *I. obliquus* индуцировал образование в основном сферических наночастиц золота с размером менее 20 нм (Shukurov *et al.*, 2022). Эти золотые наночастицы являются перспективными двухмодальными (хемофототермическими) терапевтическими кандидатами для противораковых применений.

Полученные с использованием экстракта *Pleurotus florida* биофункционализированные золотые наночастицы продемонстрировали эффективные противораковые свойства в отношении четырех различных линий раковых клеток A-549 (карцинома легких человека), K-562 (хронический миелоидный лейкоз человека, костный мозг), HeLa (шейка матки человека) и MDA-MB (аденокарцинома молочной железы человека), а в клеточных линиях Vero (нормальные клетки почек африканской зеленой мартышки) летального эффекта не наблюдалось (Bhat *et al.*, 2013).

Золотые наночастицы были успешно получены путем биосинтеза с использованием лакказы *P. ostreatus* в качестве восстановителя. Затем биосинтезированные наночастицы были применены для модификации электрода с трафаретной печатью. Электрохимический датчик, сконструированный с данным электродом, продемонстрировал замечательную производительность при определении карбендазима в овощах (Wang *et al.*, 2017).

3.4 Микосинтез наночастиц селена

3.4.1 Грибы, восстанавливающие ионы селена с образованием наночастиц

Помимо металлов, было обнаружено, что грибы также способны к синтезу наночастиц металлоидов, в первую очередь селена. Культуры грибов способны преобразовывать селен из

селенитов, селенатов и других соединений в элементарную форму для снижения их токсического воздействия. Биологический синтез наночастиц селена был обнаружен у довольно большого числа видов грибов, лучше всего эта способность изучена у микроскопических аскомицетов (Таблица 3). Однако микосинтез наночастиц селена привлек значительное внимание только в последние годы. На момент начала наших исследований способность преобразовывать ионы селена, в том числе до элементарного состояния с образованием наночастиц у базидиомицетов была практически не изучена. Как видно из таблицы, микогенные наночастицы селена в основном имеют сферическую форму, а их диаметр может широко варьироваться. В некоторых культурах, таких как *A. alternata*, *Fusarium equiseti* и *Rhodotorula mucilaginosa*, также наблюдалось образование наностержней селена (Таблица 3).

Таблица 3 – Микосинтез наночастиц селена

Вид (грибная культура)	Источник	Соединение	Свойства наночастиц	Ссылка
<i>Agaricus arvensis</i>	Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	Na_2SeO_3	Сферы (150–550 нм) Сферы (100–250 нм)	Loshchinina, Vetchinkina <i>et al.</i> , 2018; Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Agaricus bisporus</i>	Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	Na_2SeO_3	Сферы (100–250 нм) Сферы (40–140 нм)	Loshchinina, Vetchinkina <i>et al.</i> , 2018; Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Alternaria alternata</i>	Культуральная жидкость	Na_2SeO_4	Сферы (30–150 нм)	Sarkar <i>et al.</i> , 2011
<i>Alternaria alternata</i>	Культуральная жидкость	Na_2SeO_4	Наностержни (длина 200–800 нм, ширина 50–70 нм)	Sarkar <i>et al.</i> , 2012
<i>Aspergillus flavus</i>	Культуральная жидкость	Na_2SeO_4	Сферы (средний размер 51.5 нм)	Bafghi <i>et al.</i> , 2021
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Живая культура	Na_2SeO_3	Сферы (средний размер 45.22 нм)	Hussein <i>et al.</i> , 2022
<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	Живая культура	Na_2SeO_3	Сферы (средний размер 55.37 нм)	Hussein <i>et al.</i> , 2022
<i>Aspergillus terreus</i>	Культуральная жидкость	Раствор ионов Se^{4+}	Сферы (средний размер 47 нм)	Zare <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus terreus</i>	Живая культура	Na_2SeO_3	Сферы (средний размер 30.98 нм)	Hussein <i>et al.</i> , 2022
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Живая культура	Na_2SeO_3	Сферы (средний размер 60 нм)	Liang <i>et al.</i> , 2019

<i>Aureobasidium pullulans</i>	Культуральная жидкость	Na_2SeO_3	Сферы (20–120 нм)	Liang <i>et al.</i> , 2022
<i>Candida albicans</i>	Культуральная жидкость	Na_2SeO_4	Сферы (средний размер 64 нм)	Bafghi <i>et al.</i> , 2021
<i>Fusarium equiseti</i>	Живая культура	Na_2SeO_3	Сферы и стержнеобразная форма (средний размер 30.11 нм)	Hussein <i>et al.</i> , 2022
<i>Fusarium oxysporum</i>	Грибная биомасса	H_2SeO_3	Сферы (34.32–231.98 нм)	Asghari-Paskiabi <i>et al.</i> , 2018
<i>Ganoderma lucidum</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	Na_2SeO_3	Сферы (20–50 нм) Сферы (20–50 нм) Сферы (100–300 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2016; Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Grifola frondosa</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	Na_2SeO_3	Сферы (50–320 нм) Сферы (20–50 нм) Сферы (100–300 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2016; Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Lentinula edodes</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	Na_2SeO_3	Сферы (50–320 нм) Сферы (50–150 нм) Неправильные сферы (50–150 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2016; Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Magnusiomyces ingens</i>	Экстракт из грибной биомассы	SeO_2	Сферы, квази-сферы (70–90 нм)	Lian <i>et al.</i> , 2019
<i>Mariannaea sp.</i>	Живая культура	SeO_2	Сферы (средний размер 45.19–212.65 нм в зависимости от расположения частиц)	Zhang <i>et al.</i> , 2019
<i>Mortierella humilis</i>	Живая культура	Na_2SeO_3	Сферы (средний размер 48 нм)	Liang <i>et al.</i> , 2019
<i>Nematospora coryli</i>	Грибная биомасса	Na_2SeO_3	Сферы (50–250 нм)	Rasouli <i>et al.</i> , 2019
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Культуральная жидкость	Na_2SeO_3	Сферы (средний размер 24.65 нм)	Vahidi <i>et al.</i> , 2020
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Культуральная жидкость	Na_2SeO_3	Сферы (44–78 нм)	Morad <i>et al.</i> , 2022
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Культуральная жидкость	Na_2SeO_4	Сферы (средний размер 33.84 нм)	El-Sayyad <i>et al.</i> , 2020

<i>Penicillium citrinum</i>	Грибная биомасса	HNaO ₃ Se	Сферы (различные размеры в зависимости от условий)	Amin <i>et al.</i> , 2021
<i>Penicillium corylophilum</i>	Культуральная жидкость	Na ₂ SeO ₃	Сферы (29.1–48.9 нм)	Salem <i>et al.</i> , 2021
<i>Penicillium crustosum</i>	Культуральная жидкость	Na ₂ SeO ₃	Сферы (3–22 нм)	Fouda <i>et al.</i> , 2022
<i>Penicillium expansum</i>	Культуральная жидкость	SeO ₂	Сферы (4–12.7 нм)	Hashem <i>et al.</i> , 2021
<i>Phoma glomerata</i>	Живая культура	Na ₂ SeO ₃	Сферы (100–200 нм)	Liang <i>et al.</i> , 2020
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Живая культура Культуральная жидкость Мицелиальный экстракт	Na ₂ SeO ₃	Сферы (50–320 нм) Сферы (50–150 нм) Неправильные сферы (50–150 нм)	Vetchinkina <i>et al.</i> , 2016; Vetchinkina <i>et al.</i> , 2019
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Грибная биомасса	Na ₂ SeO ₃	Сферы, стержни (83–478 нм в зависимости от концентрации прекурсора)	Ashengroph and Tozandehjani, 2022
<i>Trichoderma atroviride</i>	Мицелиальный экстракт	Na ₂ SeO ₃	Сферы (60.48–123.16 нм)	Joshi <i>et al.</i> , 2019
<i>Trichoderma harzianum</i>	Мицелиальный экстракт	Na ₂ SeO ₃	Неправильная форма (средний размер 60 нм)	Hu <i>et al.</i> , 2019
<i>Trichoderma</i> sp.	Живая культура	SeO ₂	Сферы, псевдо-сферы (20–220 нм)	Diko <i>et al.</i> , 2020
<i>Trichoderma</i> sp.	Мицелиальный экстракт	Раствор ионов Se ⁴⁺	Сферы (40–100 нм)	Arunthirumeni <i>et al.</i> , 2021

(Loshchinina, Vetchinkina, Kupryashina // Biomimetics, 2023a
<https://doi.org/10.3390/biomimetics8010001>)

3.4.2 Условия получения и параметры микогенных наночастиц селена

Способность к микосинтезу наночастиц селена была лучше всего изучена у нескольких видов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Trichoderma*. Было показано, что ряд микроскопических грибных культур восстанавливают селенит до элементарного селена. *A. funiculosus* и *Fusarium* sp., инкубированные с селенитом натрия, производили игольчатые кристаллы элементарного селена на поверхности гиф и конидий. *A. funiculosus* также откладывал электронно-плотные гранулы в вакуолях обработанных селенитом грибных культур (Gharieb *et al.*, 1995). Монодисперсные селеновые наносферы со средним размером 25 нм, были получены с

использованием культуральной жидкости *P. chrysogenum* и Na_2SeO_3 в качестве предшественника (Vahidi *et al.*, 2020). Другие исследователи получили селеновые наночастицы размером 44–78 нм, используя культуральную жидкость *P. chrysogenum* (Morad *et al.*, 2022).

Грибы аскомицеты *T. harzianum*, *A. pullulans*, *P. glomerata* и мукоморицет *M. humilis* могли расти на средах, содержащих селен, что приводило к обширному осаждению элементарных наночастиц селена на поверхности грибов (Liang *et al.*, 2019). Средний размер наносфер, синтезированных *A. pullulans*, составлял 60 нм, а наночастиц, синтезированных *M. humilis*, составлял около 48 нм. Наносферы размером 20–120 нм образовывались при инкубации культуральной жидкости *A. pullulans* с селенитом (Liang *et al.*, 2022). Сферические наночастицы размером 100–200 нм образовывались на поверхностях грибов и в среде во время роста *P. glomerata* с селенитом (Liang *et al.*, 2020).

Был разработан метод получения наночастиц со средним диаметром 34 нм, включающий инкубацию фильтрата *P. chrysogenum* с Na_2SeO_4 после применения гамма-облучения (El-Sayyad *et al.*, 2020). Был предложен еще один метод включающий использование гамма-излучения для получения наночастиц селена (Amin *et al.*, 2021). Суспензия спор *P. citrinum* подвергалась воздействию различных доз гамма-излучения, а затем наночастицы продуцировались облученной культурой *P. citrinum*. Облучение гамма-лучами усиливало микосинтез селеновых наночастиц, а их размер зависел от дозы облучения.

Hussein *et al.* выделили несколько видов микроскопических грибов со способностью синтезировать наночастицы селена (Hussein *et al.*, 2022). *A. quadrilineatus*, *A. ochraceus* и *A. terreus* производили наносферы разных размеров в зависимости от вида, а *F. equiseti* синтезировал сферические и стержнеобразные частицы. При использовании культуральной жидкости *A. terreus* были получены селеновые наносферы со средним размером 47 нм (Zare *et al.*, 2013). Сферические и псевдосферические селеновые наночастицы были синтезированы культурой *Trichoderma sp.* на среде с SeO_2 (Diko *et al.*, 2020). Авторы определили оптимальные значения pH, концентрацию предшественника и время нанесения для синтеза наночастиц. Hu *et al.* получили нерегулярные сферические наночастицы селена с использованием *T. harzianum* (Hu *et al.*, 2019). Sarkar *et al.* сообщили о синтезе наночастиц селена сферической или стержневидной формы с использованием фильтрата культуры *A. alternata* (Sarkar *et al.*, 2011; 2012).

При использовании биомассы *F. oxysporum*, которая инкубировалась с селенистой кислотой в качестве предшественника, образовывались сферические наночастицы селена и сульфида селена размером от 34 до 232 нм (Asghari-Paskiabi *et al.*, 2018). При выращивании культуры *Mariannaea sp.* в присутствии SeO_2 , образовывались внутриклеточные и внеклеточные наносферы селена, отложенные на клеточной стенке и в цитоплазме (Zhang *et al.*, 2019). Средний размер наносфер составлял 45 нм для внутриклеточных и 213 нм для внеклеточных наночастиц.

С использованием бесклеточных экстрактов новых дрожжей *M. ingens* была изучена продукция наночастиц селена и установлено, что pH, концентрация селенсодержащего соединения SeO_2 и содержание белка в дрожжевом экстракте могут существенно влиять на образование и стабилизацию наночастиц данного элемента (Lian *et al.*, 2019). Наночастицы были почти квазисферическими и сферическими с небольшим количеством частиц неправильной формы. Диаметр в основном составлял от 70 до 90 нм. Также, водные дрожжи *R. mucilaginosa* синтезировали селеновые наночастицы внеклеточно и внутриклеточно (Ashengroph and Tozandehjani, 2022). Использование низких концентраций предшественника селенита (1–4 мМ) привело к образованию сферических наночастиц, и они образовали стержнеобразные структуры при более высокой концентрации предшественника (5 мМ).

По сравнению с вышеописанными культурами, возможность получения наночастиц селена с использованием базидиальных макромицетов изучена значительно меньше, первые работы по данной теме начали появляться 10 – 12 лет назад, однако исследованные на данный момент культуры показали себя хорошими биообъектами для синтеза наноселена.

3.4.3 Свойства и применение микогенных наночастиц селена

Селен является необходимым элементом для людей, животных и микроорганизмов, но многие из его соединений высокотоксичны. Наночастицы селена представляют большой интерес из-за их более низкой токсичности, чем неорганические и органические формы селена, а также их биосовместимости и биодоступности. Наночастицы селена могут использоваться для адресной доставки лекарств, биоремедиации, нанобиосенсоров, в качестве пищевой добавки и во многих других областях (Shoeibi *et al.*, 2017; Kumar and Prasad, 2021). Кроме того наноселен проявляет превосходную антимикробную, противораковую, противодиабетическую, противопаразитарную и антиоксидантную активность (Bisht *et al.*, 2022; Zambonino *et al.*, 2023).

Например, полученные с использованием культуральной жидкости *P. chrysogenum* монодисперсные селеновые наносферы со средним размером 25 нм проявляли антибактериальную активность (Vahidi *et al.*, 2020), наночастицы размером 44–78 нм обладали моллюскоцидными и ларвицидными свойствами (Morad *et al.*, 2022). После применения гамма-облучения к фильтрату *P. chrysogenum* с Na_2SeO_4 , селеновые наносферы диаметром 34 нм проявляли антимикробную и антибиопленочную активность (El-Sayyad *et al.*, 2020). Сферические наночастицы селена, полученные с использованием культуральной жидкости *P. corylophilum*, обладали антимикробной, цитотоксической и ларвицидной активностью против комаров-переносчиков малярии (Salem *et al.*, 2021). Наносферы диаметром 3–22 нм, проявляющие антимикробную, противораковую и каталитическую активность, были получены с использованием культуральной жидкости *P. crustosum* (Fouda *et al.*, 2022). Было обнаружено, что присутствие света является одним из влиятельных параметров для стимулирования этих

видов активности у селеновых наночастиц. Небольшие селеновые наносферы с широким спектром биомедицинской активности, включая антимикробную активность против грибов, грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также антиоксидантную и противораковую активность, были получены с использованием культуральной жидкости *P. expansum* (Hashem *et al.*, 2021).

Наносферы селена, микосинтезированные с помощью культуральной жидкости *A. flavus* и *C. albicans*, проявили высокую противогрибковую активность, показав ингибирование роста грибов в присутствии более низких концентраций наночастиц, чем противогрибковые препараты (Bafghi *et al.*, 2021). Используя биомассу дрожжей *Nematospora coryli*, были получены наносферы селена с противокандидозной и антиоксидантной активностью (Rasouli *et al.*, 2019).

Элементарные наносферы селена (40–100 нм) с ларвицидной активностью были получены с использованием экстракта *Trichoderma sp.* (Arunthirumeni *et al.*, 2021). Микогенные наносферы селена, синтезированные из экстракта *T. atroviride*, обладали противогрибковой активностью, а также обладали уникальным свойством агрегации и связывания с зооспорами фитопатогенных оомицетных грибов *P. infestans* (Joshi *et al.*, 2019). Многие органические кислоты, сахара и их производные, такие как гептоновая кислота, ферулат, фумаровая кислота и треоновая кислота, а также глюкоза и маннит, покрывали наночастицы селена и играли роль стабилизирующих агентов. Исследователи отмечают, что микогенные наночастицы подавляли рост патогенных грибов лучше, чем наночастицы селена, полученные традиционными физико-химическими методами.

3.4.4 Микосинтез наночастиц оксида селена (SeO_2)

Грибные культуры могут образовывать наночастицы различного химического состава. Микосинтез элементарных наночастиц является наиболее изученным, в меньшей степени изучены наночастицы более сложного химического состава, например, такие как оксиды. Оксидные наночастицы также представляют большой интерес для многопрофильной нанотехнологии. Благодаря своим особым физическим, химическим и биологическим свойствам, которые отличают их от объемных материалов того же химического состава, они могут найти широкий спектр применения (Chouke *et al.*, 2022). Оксидные наночастицы перспективны для использования в нанокатализе, биосенсорике, медицине, очистке сточных вод и удалении тяжелых металлов, красителей и микробных загрязнителей. Одной из важнейших областей применения этих наночастиц является биомедицина, во многих оксидных наночастицах, полученных с помощью грибов, были обнаружены различные биомедицинские активности. Антибактериальные, противогрибковые, антиоксидантные, противораковые, противодиабетические и противоклещевые свойства открывают большие перспективы для их

использования в лечении и профилактике различных заболеваний (Gebre and Sendeku, 2019; Marouzi *et al.*, 2021).

В связи с широким спросом на наночастицы и наноматериалы оксидов изучение их синтеза грибами в последние годы стало бурно развиваться. Однако до сих пор мало внимания уделялось сравнению свойств наночастиц одного и того же соединения, полученных с использованием разных видов грибов и в разных условиях, и, следовательно, оптимизации процесса получения наночастиц с заданными свойствами. Грибные культуры могут образовывать оксиды многих элементов, в том числе к ним относится селен. Однако этот процесс остается едва изученными с точки зрения микосинтеза наночастиц, и их образование грибными культурами до сих пор было описано только в нескольких отчетах. Liang *et al.* изучали образование Se-содержащих наночастиц несколькими видами грибов во время роста на Se-содержащих средах (Liang *et al.*, 2019). Помимо образования элементарного селена, оксид селена был также обнаружен после выращивания *T. harzianum* с селенитом. Биосинтез наночастиц оксида селена с участием грибов открывает возможности для экологически безопасного их производства для применения во многих областях исследований.

3.5 Механизмы биологического «зеленого» синтеза наночастиц

В последние годы все больше внимания уделяется изучению механизмов восстановления различных соединений грибами, однако недостаточно известно о конкретных соединениях грибного секрета, участвующих в образовании наночастиц. Было обнаружено, что в биосинтезе наночастиц золота грибами участвуют ферменты лигнинолитического комплекса, такие как лакказа (Faramarzi and Forootanfar, 2011; Sanghi *et al.*, 2011; El-Batal *et al.*, 2015) и лигнин пероксидаза (Sanghi *et al.*, 2011). Нитратредуктаза (Gholami-Shabani, 2014), лакказа (Durán *et al.*, 2014; Alharbi *et al.*, 2023) и ксиланаза (Elegbede *et al.*, 2018) участвуют в микосинтезе наночастиц серебра. Одна и та же культура может продуцировать несколько ферментов, катализирующих производство наночастиц; например, для *P. chrysosporium* было показано, что во внеклеточном образовании наночастиц золота принимает участие лакказа, а во внутриклеточном – лигнин пероксидаза (Sanghi *et al.*, 2011). В дополнение к ферментативному миконаносинтезу было обнаружено, что грибные пептиды (Chen *et al.*, 2016), полисахариды (Chen *et al.*, 2016; Wanarska and Maliszewska, 2019; Klaus *et al.*, 2020) и фенольные соединения участвуют в восстановлении различных соединений и образовании наночастиц (Apte *et al.*, 2013; Nair *et al.*, 2013; Abdul-Hadi *et al.*, 2020).

Процесс образования наночастиц грибами может происходить внутри клетки и внеклеточно под действием ферментов и других биологически активных молекул (Рисунок 3).

Таким образом, многие исследователи подтверждают, что биологические молекулы, такие как полисахариды, ферменты, белки или пептиды, могут быть использованы для синтеза и сборки

материалов с наномасштабными размерами. Подобные методы рационального использования биологических процессов могут открыть новый путь развития нанотехнологий.

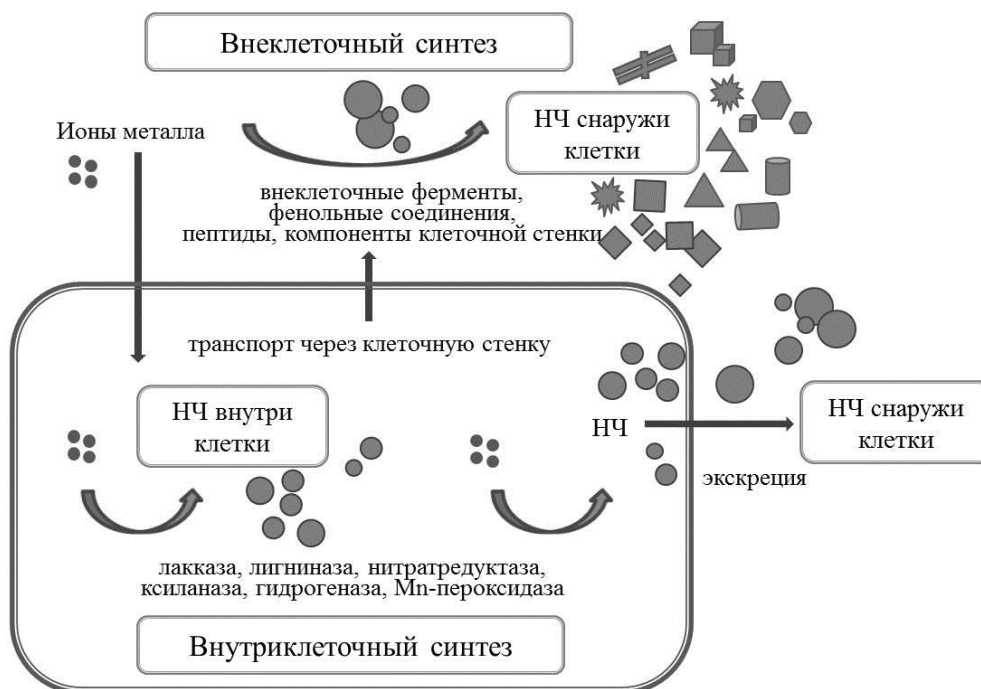


Рисунок 3 – Схематическое изображение биологического «зеленого» синтеза наночастиц, опосредованного грибами
(Loshchinina, Vetchinkina, Kupryashina // Biomimetics, 2023a
<https://doi.org/10.3390/biomimetics8010001>)

3.6 Преимущества синтеза наночастиц с помощью грибов и перспективы применения микогенных наночастиц

Среди многообразия организмов, способных образовывать наночастицы, грибы привлекают особое внимание исследователей. Микосинтез наночастиц с грибными культурами, их метаболитами, культуральными жидкостями, а также экстрактами мицелия и плодовых тел прост, дешев и экологичен. Характеристики наночастиц, включая их размер, форму, однородность, стабильность, физические свойства и биологическую активность, можно настраивать, изменяя условия микосинтеза. Благодаря уникальным свойствам грибных культур, зеленый синтез наночастиц с использованием грибов обладает рядом важных преимуществ по сравнению с использованием бактерий, растений и других организмов (Dhillon *et al.*, 2012; Siddiqi and Husen, 2016; Khandel and Shahi, 2018; Prasad *et al.*, 2018). К их числу относятся:

- активная продукция восстанавливающих и стабилизирующих соединений;
- высокая активность и разнообразие ферментов, принимающих участие в биоредукции различных соединений с образованием наночастиц;
- устойчивость к высоким концентрациям металлов и металлоидов;
- способность к биообразованию большого количества наночастиц преимущественно внеклеточно;

- высокая скорость образования наночастиц;
- простота выращивания, проведения процесса наносинтеза и его масштабирования;
- безопасность для человека (в случае использования съедобных и лекарственных видов);
- возможность получать наночастицы с комплексными медицинскими свойствами (в случае использования лекарственных видов грибов).

Микогенные наночастицы обладают широчайшим спектром биологических активностей, позволяющих использовать их во множестве областей медицины, сельского хозяйства и промышленности. Бактерицидные, антибиопленочные, фунгицидные, противовирусные, противораковые, противовоспалительные, антиоксидантные, антикоагулянтные и тромболитические свойства микогенных наночастиц золота, серебра, платины, палладия, меди, селена и других элементов позволяют использовать их в терапии различных заболеваний, включая рак, болезнь Альцгеймера, диабет, сердечно-сосудистые и инфекционные заболевания, а также при заживлении ран (Prasad *et al.*, 2018; Rai and Yadav, 2019; Simões *et al.*, 2020). Установлено, что наночастицы, полученные из грибов, могут эффективно подавлять рост различных патогенных микроорганизмов (Bafghi *et al.*, 2021) включая патогены, устойчивые к лекарственным препаратам (Chowdhury *et al.*, 2014; Al-Ansari *et al.*, 2020).

Схематическое представление о вариантах применения микосинтезированных наночастиц серебра, золота и селена, представлено на рисунке (Рисунок 4).

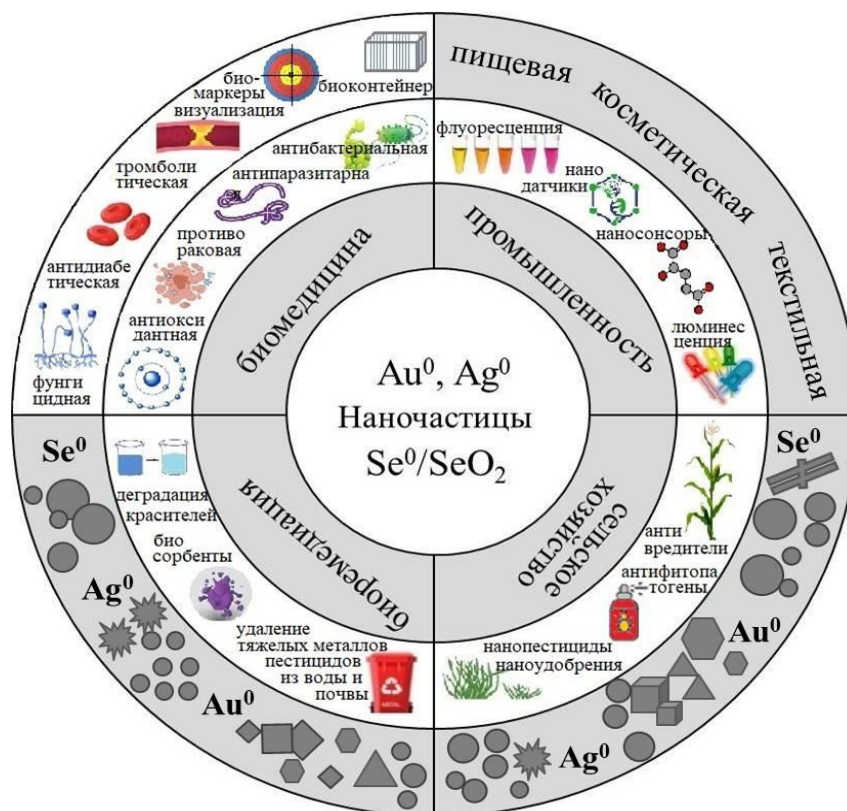


Рисунок 4 – Применение микосинтезированных наночастиц (Loshchinina, Vetchinkina, Kupryashina // Biomimetics, 2023b <https://doi.org/10.3390/biomimetics8020224>)

Использование наночастиц в сочетании с другими антимикробными средствами повышает их терапевтический эффект и позволяет снизить риск развития резистентности у патогенов, а также восстанавливать активность антибиотиков, утративших свою эффективность (Yadav *et al.*, 2018). Большой интерес представляет использование лекарственных грибов для получения наночастиц с комплексной медицинской активностью, что достигается за счет комбинирования свойств грибных метаболитов и самих наночастиц, выступающих в качестве контейнеров для доставки лекарственных соединений (Gil *et al.*, 2018).

Активность наночастиц против личинок и куколок насекомых, распространяющих заболевания человека (Soni and Prakash, 2013; Cunha *et al.*, 2018; Salem *et al.*, 2021; Sundaravadivelan and Padmanabhan, 2013; Soni and Prakash, 2014; Salunkhe *et al.*, 2022), а также против моллюсков-переносчиков патогенов (Morad *et al.*, 2022; Zayed *et al.*, 2022), представляет интерес с точки зрения использования микогенных наночастиц золота, серебра и селена в качестве экологически чистого и экономически эффективного инструмента биологической борьбы с болезнями. Микосинтезированные наночастицы имеют большой потенциал в качестве носителей для адресной доставки лекарств, для биовизуализации и биомаркировки, в качестве датчиков для оптических и электронных устройств, а также в косметической, текстильной и пищевой промышленности (Gade *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2018; Sudheer *et al.*, 2022).

В сельском хозяйстве наночастицы, полученные из грибов, находят применение в качестве нанопестицидов и наноудобрений, что позволяет сократить использование более токсичных агрохимикатов (Yadav *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2021; Alghuthaymi *et al.*, 2022; Sonawane *et al.*, 2022). Фунгицидная, бактерицидная, ларвицидная и нематоцидная активность, обнаруженная во многих микогенных наночастицах (Ammar *et al.*, 2021; Natesan *et al.*, 2021; Joshi *et al.*, 2019; Akther and Hemalatha, 2019; Barbosa *et al.*, 2019; Shukla *et al.*, 2020; Joshi *et al.*, 2021), открывает большие перспективы для их использования в борьбе с вредителями и фитопатогенами, в том числе устойчивыми к пестицидам. Еще одной важной областью применения микогенных наночастиц является микоремедиация (He *et al.*, 2017). Способность грибов использовать соединения металлов и металлоидов, превращая их в менее токсичные формы и накапливая в мицелии в виде наночастиц, хорошо известна (Shakya *et al.*, 2018). Благодаря этому грибы могут успешно использоваться для их удаления из почвы и воды и для дальнейшей переработки (Salvadori *et al.*, 2014; Sabuda *et al.*, 2020). Иммобилизация грибной биомассы с наночастицами позволяет получать гибридные биосорбенты для утилизации токсичных элементов (Espinosa-Ortiz *et al.*, 2016). Большой интерес представляет способность микогенных наночастиц деградировать промышленные и сельскохозяйственные загрязнители. Различные азо-, диазо- и металлокомплексные красители широко используются во многих отраслях промышленности, они в больших количествах попадают в воду и почву и представляют серьезную угрозу для окружающей среды и здоровья человека, поэтому в

последнее время активно изучается способность грибов продуцировать наночастицы с краскоразрушающими свойствами (Kalia and Singh, 2020). Данная активность, обнаружена у микогенных наночастиц золота (Dheyab *et al.*, 2020; Abdul-Hadi *et al.*, 2020) и серебра (Elegbede *et al.*, 2018), что делает их перспективными инструментами для устранения загрязнения промышленных и муниципальных сточных вод токсичными красителями. Кроме того, наночастицы, полученные из грибов, показали свою эффективность для удаления пестицидов (Deka and Sinha, 2015) и очистки сточных вод с микробными загрязнителями (Moustafa, 2017).

3.7 Заключительные замечания

Способность образовывать наночастицы обнаружена у многих видов грибов, преимущественно принадлежащих к отделу *Ascomycota*, подобные исследования относительно представителей *Basidiomycota*, изучены хуже. Исследования по скринингу культур грибов для выявления лучших продуцентов наночастиц показывают, что разные виды и штаммы одного и того же вида могут сильно отличаться по наносинтетической активности в одних и тех же условиях. Способ, которым грибы используются для получения наночастиц, также очень важен – будь то в форме живых культур, выращенных на средах с предшественниками, как фильтрованная мицелиальная биомасса, бесклеточная культуральная жидкость, очищенные метаболиты, экстракты из погруженного мицелия, плодовых тел или других морфоструктур.

Характеристики микогенных наночастиц, включая их форму, размер, топографию поверхности, однородность, устойчивость к агрегации и скорость образования, могут сильно различаться для одного и того же элемента. Они зависят от физико-химических параметров процесса биоредукции (химический состав и концентрация предшественника, состав среды культивирования, pH, температура, время реакции, наличие перемешивания и освещения, дополнительных воздействий, таких как микроволновое излучение и гамма-излучение), а также от способа использования грибов (в качестве живой культуры, вид и штамм, возраст культуры, мицелиальной биомассы, спор, экстрактов из вегетативного мицелия или плодовых тел, бесклеточных культуральных жидкостей, очищенных метаболитов). Изучение влияния всех этих условий на форму и размер наночастиц, их топографию поверхности, дисперсность, стабильность, устойчивость к агрегации, скорость образования, биодоступность, фотолюминесцентные и магнитные свойства, биологическую активность имеет большое значение для выбора наиболее эффективных продуцентов наночастиц и оптимизации методов бионаносинтеза. Изменяя все эти условия, можно контролировать химический состав, форму, размер, однородность, стабильность и биологическую активность образующихся наночастиц.

Все эти методы имеют свои преимущества и недостатки. Живые культуры, растущие на средах с ионами металлов и металлоидами, могут активно продуцировать наночастицы и накапливать их в среде и внутри своих клеток в очень больших количествах, но эти частицы

требуют отделения от грибных клеток для их дальнейшего использования. Поэтому фильтраты культуральных жидкостей, экстракты из неразрушенного или разрушенного мицелия и экстракты из коммерчески приобретенных плодовых тел могут быть проще в использовании. Исследования микосинтеза наночастиц с использованием ферментов и других соединений, выделенных из грибов, могут расширить знания о механизмах образования наночастиц и поэтому имеют большое значение для развития не только прикладной, но и фундаментальной науки.

С другой стороны, грибные культуры продуцируют широкий спектр белков с высокой ферментативной активностью, и благодаря этому они могут преобразовывать металлы и другие элементы в менее токсичные формы. Это включает образование наночастиц, которые затем накапливаются в больших количествах внутри мицелия и/или внеклеточно. В результате микро- и макромицеты из разных таксономических групп могут успешно использоваться для получения наночастиц и наноматериалов в промышленных масштабах.

Характеристики полученных наночастиц определяют их будущее применение. В связи с этим важной задачей в нанобиотехнологии является разработка методов, позволяющих получать наночастицы с лучшим контролем над их размером, формой и другими свойствами. Варьируя условия синтеза, можно из одной и той же культуры получать наночастицы с различными размерами, формой, устойчивостью в коллоидах и, следовательно, различной биологической активностью. Однако изучению влияния условий синтеза на свойства биогенных наночастиц уделено недостаточно внимания. В частности, до сих пор мало сравнительных исследований по микосинтезу наночастиц с различными характеристиками с использованием одних и тех же видов грибов, но в разных условиях.

На основании выше сказанного, актуальные задачи, стоящие перед нанобиотехнологами, включают: скрининг культур грибов для выявления продуцентов наночастиц новых, ранее не исследованных соединений, дальнейшее расширение знаний о свойствах уже известных микогенных наночастиц, оптимизация методов производства и процессов биосинтеза наночастиц с требуемыми свойствами в промышленных масштабах, изучение возможностей применения наночастиц и их внедрение в практику.

Таким образом, существует необходимость углубления и расширения наших знаний о грибах, способных биосинтезировать наночастицы различных химических элементов, поиска новых производителей и оптимизации процессов наносинтеза для эффективного и контролируемого изготовления частиц с желаемыми свойствами. На момент начала проведения наших исследований не было никакой информации о получении наночастиц с использованием культур базидиомицетов, съедобных и лекарственных грибов *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum*. «Зеленый синтез» наночастиц с участием грибов, особенно представителей отдела *Basidiomycota* является экологически чистым и эффективным методом, который требует дальнейших обширных исследований.

ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Объекты исследований и методы культивирования

Хранение базидиальных макромицетов и получение инокулята

В работе были использованы культуры ксилотрофных базидиомицетов *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 1976 [*Lentinus edodes* (Berk.) Singer 1941] (шиитакэ) штаммы F-249, 2-T, 363, Ner, Poot, 58 siit, 0779, 4080, M-370, 19, 25, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. 1871 (вешенка устричная) штамм НК-35, *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray 1821 (маитакэ или грифола курчавая) штамм 0917, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1881 (рейши или трутовик лакированный) штамм 1315, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. 1871 (опенок осенний) штамм 0738 и почвенных (гумусовых) сапротрофов *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach 1946 (шампиньон двуспоровый) штаммы A15 и 512 и *A. arvensis* Schaeff. 1774 (шампиньон полевой) sp., из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова и коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Также, в работе использовали 25 штаммов *L. edodes* из коллекции высших базидиальных грибов ГНУ Института микробиологии НАН Беларуси. Культуры поддерживали в коллекции высших грибов лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН на косяках с агаризованным (2%) пивным суслом (4° по Баллингу) при 4°C (Ball, 2006). В качестве инокулята использовали 14 суточный мицелий, выращенный на агаризованном пивном сусле на чашках Петри при 26°C, как оптимальной температуре роста мицелия для большинства базидиальных грибов (Przybylowicz and Donoghue, 1991).

Погруженное культивирование грибов

Культуры грибов выращивали в условиях глубинного культивирования на 4° пивном сусле или на синтетической среде (модифицированной среде Кирка (Kirk *et al.*, 1986)) следующего состава (г/л): D-глюкоза – 5; L-аспарагин – 0.5; KH_2PO_4 – 2; K_2HPO_4 – 3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2.5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, pH 5.8; в колбах объемом 100 и 500 мл с 50 или 200 мл среды при температуре 26°C, при стационарных условиях или периодическом перемешивании.

Для получения всех стадий морфогенеза в колбах при погруженном культивировании, грибные культуры выращивали в колбах на пивном 4° сусле при стационарных условиях без перемешивания (Vetchinkina and Nikitina, 2017). В качестве исследуемого материала использовали непигментированный вегетативный мицелий (НМ), для опенка осеннего ризоморфы (РМ), мицелиальную (коричневую) пленку (МП, КМП), примордии (ПР) и плодовые тела (ПТ) базидиомицетов (Vetchinkina *et al.*, 2017a; 2017b).

Твердофазное культивирование грибов

Твердофазное культивирование грибов проводили на чашках Петри на 4° пивном сусле или на синтетической среде вышеописанного состава с добавлением 2% агар-агара при 26°C.

Интенсивным способом ксилотрофные макромицеты выращивали в лабораторных условиях на древесном субстрате. Субстрат готовили следующим способом: четыре части дубовых опилок смешивали с одной частью зерна пшеницы, запаривали на несколько часов горячей водой и слегка подсушивали (влажность 70–80%). Затем субстратом наполняли полипропиленовые пакеты («ГЕМ», Россия), закрывали, оставляя отверстие, в которое помещали ватно-марлевую пробку, и автоклавировали 30 минут при 1 атмосфере, повторное автоклавирование при тех же условиях осуществляли через 24 часа. В стерильных условиях в пакеты вносили мицелий. В качестве инокулята использовали по 50 мл 21-суточных культур грибов, выращенных на пивном сусле в условиях глубинного культивирования при 26°C. Инкубацию проводили в термостате при температуре 26°C до полной колонизации субстрата мицелием. После полного зарастания блока и начала образования примордиев, пакет удаляли и блок помещали в светлое вентилируемое помещение, с температурой воздуха 26°C для получения зрелых плодовых тел базидиомицетов (Ветчинкина и Никитина, 2007).

Определение ростовых характеристик культур грибов

При исследовании влияния соединений, содержащих ионы золота, серебра и селена на линейный рост и накопление биомассы культурами ксилотрофных базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa* и почвенных сапротрофов *A. bisporus* и *A. arvensis*, а также изучение способности базидиомицетов к их восстановлению, в среду культивирования в стерильных условиях вносили золотохлористоводородную кислоту HAuCl_4 , нитрат серебра AgNO_3 или селенит натрия Na_2SeO_3 («Sigma-Aldrich», США) в пределах концентраций от 0.5×10^{-3} до 5 мМ. Рост культур характеризовали по линейному диаметру колоний грибных культур на чашках Петри (при твердофазном культивировании) или накоплению биомассы (при глубинном культивировании). Для определения биомассы мицелий фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах бумажные фильтры, высушивали до постоянной массы и снова взвешивали. Сравнивали прирост биомассы с образцами культур в контрольных и опытных вариантах.

4.2 Методы микроскопии

4.2.1 Приготовление проб для световой и электронной микроскопии

Приготовление проб для электронной и световой микроскопии осуществлялось с помощью фиксации грибных гиф, для последующего получения полутонких и ультратонких срезов. Мицелиальные гифы и морфоструктуры базидиомицетов собирали

центрифугированием при 13000 g в течение 20 минут при 26°C. Материал переносили в полипропиленовые пробирки объемом 2 мл и фиксировали в 0.5% глутаровом альдегиде в фосфатном буфере (0.1 М, pH 7.2) в течение 3 часов. Дальнейшую фиксацию проводили в 2.5% растворе глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (0.1 М, pH 7.2), в течение 12 часов. Трехкратно по 15 минут промывали фосфатным буфером. Затем материал выдерживали в 1% растворе OsO₄ 4 часа, приготовленного на том же буфере, с добавлением 34 мг/мл сахарозы 4 часа при 26°C (постфиксация). Дегидратацию образцов проводили в серии спиртов возрастающей концентрации (30–100%) дважды по 15 минут и абсолютном ацетоне троекратно по 20 минут. Затем препараты выдерживали в окиси пропилена 45 минут, после чего пропитывали эпоксидной смолой ЭПОН и окисью пропилена по 24 часа в следующих соотношениях: 1:2; 1:1; 2:1; после чего материал помещали в чистую смолу. Полимеризовали при температурах 37, 45 и 57°C по 24 часа.

4.2.2 Анализ образцов методом световой микроскопии

Полутонкие срезы получали на микротоме («LKB-III», Швеция), монтировали на предметные стекла и окрашивали метиленовым-синим. Анализ полутонких срезов проводили на световом микроскопе Leica DM6000B («Leica Microsystems», Германия).

4.2.3 Анализ ультраструктуры грибных клеток методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)

Ультратонкие срезы получали на микротоме («LKB-III», Швеция), монтировали на никелевые сеточки и окрашивали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца (Reynolds, 1963). Анализ ультраструктуры грибных клеток на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов проводили с помощью сканирующего микроскопа JEM-1200 EX («JEOL», Япония) при 80 кэВ (на базе лаборатории микроскопии КИББ КазНЦ РАН, Казань), а также на электронном просвечивающем микроскопе Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) при 120 кэВ (на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН, Саратов).

4.2.4 ПЭМ и дифракции электронов в выбранной области (SAED)

Мицелий и культуральные жидкости, содержащие биообразованные наночастицы, исследовали при помощи просвечивающей электронной микроскопии используя метод негативного контрастирования. Образцы ресуспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и наносили на никелевые сеточки с подложкой (1%-ный раствор формвара в дихлорэтаноле). После высыхания образцов клетки контрастировали 1% водным раствором уранилацетата (Tandler, 1990). Микрофотографии получали на электронном микроскопе Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) при 80 кэВ.

Дифрактограммы наночастиц были получены при помощи метода дифракции электронов в выбранной области (SAED – Selected Area Electron Diffraction). Образцы для анализа дифракции электронов с выбранным участком были установлены на никелевых сеточках, покрытых 1%-ным раствором формвара в дихлорэтано. SAED проводили с использованием электронного микроскопа Libra 120, работающего при ускоряющем напряжении 120 кэВ, длина камеры составляла – 360 мм.

4.2.5 Характеристика наночастиц

Оценку размера, формы и относительного количества электронно-плотных нанообразований проводили с помощью трансмиссионных электронно-микроскопических изображений (ПЭМ), полученных на электронном микроскопе Libra 120. С использованием электронного микроскопа в режиме электронно-спектроскопического изображения (Electron spectroscopic imaging – ESI analysis) и спектроскопии энергетических потерь электронов (EELS – Electron Energy Loss Spectroscopy), заложенных в базу программного обеспечения прибора, были получены карты распределения и спектры элементов, подтверждающих природу и локализацию образованных наночастиц.

Экспериментальные работы с применением электронного микроскопа Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) выполнялись на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ ФИЦ СарНЦ РАН.

4.3 Рентгеновская флуоресценция и рентгенофазовый анализ

Для определения химического состава полученных нанообразований было проведено исследование высушенных суспензий наночастиц золота, серебра и селена методом рентгеновской флуоресценции. Измерения проводили на энергодисперсионном спектрометре модели ED 2000 («Oxford Instruments», Великобритания) при следующих условиях: диапазон определяемых элементов от Na до U, рентгеновская трубка с серебряным анодом, напряжение на трубке 35 кВ, фильтр первичного рентгеновского излучения – тонкий серебряный (Thin Ag), экспозиция 600 сек, среда – воздух. Содержание определяемого элемента оценивали при помощи «фундаментальных параметров», заложенных в программном обеспечении прибора. Для электронно-плотных нанообразований были получены спектры, в которых отмечено появление интенсивных эмиссионных линий, характерных для вышеперечисленных элементов.

Для определения степеней окисления биологически восстановленных элементов, содержащихся в суспензиях наночастиц, применяли метод рентгенофазового анализа на дифрактометре ДРОН-3.0 с CuK α -излучением (длина волны 1.54173 Å). Степени окисления

определяли по наличию сигналов, относящихся к основным рефлексам соответствующих веществ, с помощью дифракционной базы данных соединений (JCPDS, США).

4.4 Ультрафиолетовая (UV-vis) спектроскопия

Оптические свойства и процесс формирования наночастиц исследовали с помощью ультрафиолетовой спектроскопии. Для измерения спектров поглощения использовали спектрофотометр Specord 250 («Jena Analytik», Германия, спектральный диапазон 190–1100 нм).

4.5 Динамическое светорассеяние (фотонная корреляционная спектроскопия)

Для измерения среднего размера и распределения синтезированных частиц по размеру, а также дзета-потенциала, использовали лазерный анализатор размеров частиц Zetasizer Nano ZS («Malvern», Великобритания).

4.6 Определение общего содержания белков, углеводов и пигментов

Определение общего содержания белка

Исследования по определению общего содержания белков проводили при 25°C спектрофотометрически на планшетном фотометре BioTek («BioTek Instruments, Inc», США), в 96-луночных полистироловых плоскодонных планшетах («МиниМед», Россия). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд при 595 нм (Bradford, 1976) и Лоури (Lowry, 1951).

Определение общего содержания углеводов

Определение общего содержания углеводов проводили при 25°C на спектрофотометре Specord M-40 («Jena Analytik», Германия) в кварцевых кюветах. Концентрацию углеводов в водных экстрактах оценивали с использованием фенол-сернокислотной реакции по методу Дюбуа при 490 нм (Dubois *et al.*, 1956).

Определение содержания и характеристика пигментов

Определение общего содержания пигментов проводили при 25°C на спектрофотометре Specord 250 («Jena Analytik», Германия) в кварцевых кюветах. Поглощение пигментов (меланинов) определяли в широком диапазоне при длине волны от 220 до 1100 нм. Качественные реакции водных растворов пигментов из ксилотрофных базидиомицетов проводили по общепринятым методикам (Fogarty and Tobin, 1996; Harki *et al.*, 1997). Водные растворы пигментов из базидиомицетов обесцвечивались добавлением H_2O_2 , а в присутствии KMnO_4 изменяли окраску с коричневой на зеленую с последующим выпадением осадка. Добавление FeCl_3 приводило к выпадению осадка, который растворялся в присутствии избытка

FeCl_3 . Такое поведение исследуемых пигментов характерно для меланинов и свидетельствует о присутствии в их структуре хиноидных и фенольных компонентов.

4.7 Выделение, очистка и характеристика полисахаридов и гликопротеинов

4.7.1 Получение суммарной фракции водорастворимых полисахаридов

Глубинный вегетативный мицелий и плодовые тела отделяли от среды культивирования, промывали в дистиллированной воде и сушили до постоянной массы. Далее грибной материал механически измельчали при помощи фарфоровой ступки и пестика, обезжиривали обработкой 85% этанолом 1 час и снова высушивали. Экстракцию проводили кипящей дистиллированной водой в автоклаве 1 час при 1.2 атм. Охлажденную фракцию водорастворимых полисахаридов диализовали против воды и осаждали 96% этанолом в течение 24 часов (Evsenko *et al.*, 2009). Осадок отделяли от супернатанта, перерастворяли в воде и подвергали лиофилизации.

4.7.2 Получение суммарной фракции экзо-и эндогликопротеинов

Фракцию эндогликопротеинов получали следующим способом: 100 мг гомогенизированного сухого мицелия экстрагировали в 5 мл 1М NaOH при 60°C в течение 1 часа (Tang and Zhong, 2002), осадок отделяли центрифугированием (20 минут при 8000 об/мин.). В супернатанте определяли содержание гликопротеинов фенол-сернокислотным методом (Грушенко, 1978). Измерения вели на фотоэлектроколориметре при 490 нм.

Фракцию экзогликопротеинов получали в результате последующих операций: культуральную жидкость упаривали в 2–3 раза, гликопротеины осаждали этиловым спиртом (1:1) при температуре 4°C, осажденную фракцию отделяли центрифугированием и диализовали против воды, затем гликопротеины переосаждали спиртом и сушили при температуре 4°C (Babitskaya *et al.*, 2000). ИК-спектры поглощения снимали на спектрофотометре Specord M-80 («Jena Analytik», Германия), УФ-спектры – на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC («Shimadzu Corporation», Япония).

4.7.3 Определение кинематической вязкости растворов гликополимеров

Кинематическую вязкость (ν) 0.1% растворов гликополимеров определяли с помощью вискозиметра ВПЖ-4 с диаметром капилляра 0.82 мм при 25°C и рассчитывали по формуле $\nu = g \times t \times k / 9.807$, где t – время истечения; k – коэффициент вискозиметра – 0.0303; g – ускорение свободного падения – 9.807 м/с².

4.7.4 Определение состава углеводов экзо- и эндополисахаридов

Состав углеводов экзо- и эндополисахаридов (после предварительного гидролиза их 7%-ной серной кислотой на кипящей водяной бане в течение 5 часов) определяли методом ГЖХ в

виде триметилсилильных (ТМС) производных сахаров. ТМС производные углеводов и метчиков, которыми служили ксилоза, манноза, галактоза, глюкоза, трегалоза, арабит и маннит («Sigma», США), получали по методу (Бробст, 1975). Хроматографию проводили на приборе Chrom 5 (Чехия) с плазменно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 2.8 м, заполненную хроматоном N-AW-HMDS с 5% жидкой фазы SE-30, при программировании температуры в пределах от 140 до 280°C со скоростью 5°C в минуту. Содержание каждого моносахарида рассчитывали как процент от суммы площадей пиков.

4.7.5 Определение химической структуры фракций полисахаридов

Химическую структуру фракций полисахаридов устанавливали с помощью метода периодатного окисления с последующим боргидридным восстановлением окисленных продуктов. Окисление полисахаридов проводили в 0.015 М растворе периодата натрия при температуре 5–6°C в течение 7 суток. Через определенные промежутки времени отбирали аликвотные пробы растворов и измеряли расход периодата и количество выделившейся муравьиной кислоты. В этих же условиях проводили контрольный опыт. За расходом периодата следили по уменьшению поглощения иона периодата при 223 нм (Gutierrez *et al.*, 1996). Количественное определение муравьиной кислоты проводили на хроматографе «Chrom 5» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 2.8 м, заполненную носителем «Separon SCN» в изотермическом режиме при температуре термостата 170°C, испарителя 200°C. В качестве внутреннего стандарта использовали 0.4% раствор пропанола.

Окисленные периодатом натрия растворы полисахаридов восстанавливали боргидридом натрия по (Gutierrez *et al.*, 1996; Mizuno, 1999), затем гидролизовали в 1N HCl в течение 6 часов при 100°C (мягкий гидролиз) и 0.5N H₂SO₄ в течение 6 часов при 100°C (жесткий гидролиз). Гидролизаты нейтрализовали, выпаривали досуха при 45°C, продукты гидролиза определяли методом ГЖХ в виде ТМС производных сахаров.

4.7.6 Получение белковых экстрактов

Для получения белковых экстрактов глубинный вегетативный мицелий или отдельные морфоструктуры базидиомицетов отделяли от среды культивирования, промывали водой, механически измельчали до получения гомогенной массы при 18°C с помощью фарфоровой ступки, пестика и кварцевого песка, разрушая клеточную оболочку. Экстракцию проводили при температуре 18°C в течение 30 минут фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (г/л): NaCl – 8.5; Na₂HPO₄×2H₂O – 1.34; NaH₂PO₄×2H₂O – 0.39; pH 7.4) из расчета 10 г сырых грибных клеток на 100 мл буфера или 20 mM Na-K-фосфатным буфером (pH 6,0) из расчета 20 мг сырого мицелия на 2 мл буфера. Далее осаждали центрифугированием при 12000g 15 минут и фильтровали,

отделяя от осадка. Растворы обессоливали на колонке Sephadex G-25 («Sigma-Aldrich», США) и использовали в дальнейших экспериментах. Либо супернатант высаливали сульфатом аммония до конечной концентрации 85% от полного насыщения на ледяной бане, центрифугировали. Осадок ресуспендировали в минимальном объеме буфера. Либо гликопротеины диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

4.7.7 Фракционирование гликопротеинов методом гель-хроматографии

Для разделения и очистки гликопротеинов концентрированные белковые растворы обессоливали на колонке Sephadex G-25, а затем фракционировали по молекулярной массе методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sephadex G-75 («Sigma-Aldrich», США), уравновешенной 20 мМ Трис-НСl буфером (рН 7.5). Белки элюировали при скорости потока 0.5 мл/мин тем же буфером. Выход белковых фракций регистрировали на приборе Uvicord S-II («ЛКВ», Швеция) при $\lambda=280$ нм. Высокомолекулярные белковые фракции (>80 кДа), и низкомолекулярные фракции (от <80 кДа до 5 кДа) грибов диализовали против воды и использовали в экспериментах, либо предварительно лиофильно высушивали.

4.7.8 Очистка белков методом ионообменной хроматографии

Дальнейшее разделение белковых фракций проводили методом ВЭЖХ анионообменной хроматографии на колонке TSK Bioassist Q, уравновешенной 20мМ Трис-НСl буфером (рН 7.5), либо на NGC Chromatography System («Bio-Rad», США) с использованием колонки с носителем Toyopearl DEAE-650M («Tosoh Corporation», Япония) уравновешенной 50мМ трис-НСl буфером (рН 7.5). Элюцию белков осуществляли непрерывным градиентом от 0.01 до 2М NaCl. Выход белковых фракций регистрировали на приборе Uvicord S-II («ЛКВ», Швеция) при $\lambda=280$ нм. Полученные гликопротеиновые фракции диализовали против воды и использовали в эксперименте, либо предварительно лиофильно высушивали и уравнивали по массе.

4.7.9 Исследование белкового состава и визуализация гликопротеинов

Исследование белкового состава проводили с помощью электрофореза в денатурирующих (с СДС-Na) неденатурирующих условиях в 15% и 7.5% полиакриламидном геле с использованием камеры для вертикального электрофореза VE-4М («Хеликон», Россия) (Laemmli, 1970). Для визуализации белковых фракций использовали нитрат серебра AgNO_3 и Coomassie Brilliant Blue R-250 («Хеликон», Россия) (Sammons *et al.*, 1981).

4.7.10 Специфическое окрашивание гелей для визуализации ферментов

Специфическое окрашивание гелей для визуализации белков с лакказной активностью проводили в реакционной смеси следующего состава: 1% уксусная кислота, 0.2% о-дианизидин

(«Sigma», США), 50мМ Na-тарtratный буфер (pH 4.5) (Гааль и др., 1992). Мп-пероксидазы визуализировали при тех же условиях, но с добавлением к реакционной смеси 0.1мМ H_2O_2 и 0.2мМ Mn^{2+} или по способности деградировать диметоксифенол (Paszczynski *et al.*, 1988). Для окрашивания ПААГ на активность тирозиназы использовали 2мМ *L*-дигидроксифенилаланин (*L*-ДОФА; «Serva», Германия) и 50мМ Трис-НCl буфер (pH 7.5) (Pomerantz and Murthy, 1974).

4.8 Определение активности ферментов на разных стадиях онтогенеза базидиомицетов

Активность внутриклеточных ферментов определяли при 18°C спектрофотометрически на планшетном фотометре Spark-10M («Тесан», Швейцария), источник света – ксеноновая импульсная лампа. Измеряемый спектральный диапазон: 200–1000 нм. Диапазон измерения оптической плотности 0–4 отн. ед. Скорость сканирования: менее 5 секунд. Измерение проводили в 96-луночных полистироловых плоскодонных планшетах для иммуноферментного анализа («МиниМед», Россия). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 минуту. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка.

4.8.1 Определение активности хитиназ, амилаз, инвертаз, ксиланаз и целлюлаз по реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой

Активности внутриклеточных ферментов хитиназы, амилазы, инвертазы, ксиланазы и целлюлазы (эндоглюканазы) определяли путем измерения редуцирующих сахаров, высвобождаемых после ферментативного гидролиза соответствующих субстратов. При измерении активности ферментов, к 0.5 мл реакционной смеси (где не более 4 мг редуцирующих сахаров) прибавляли 1.5 мл реагента DNS, нагревали в течение 5 минут в кипящей водяной бане, охлаждали до комнатной температуры. Содержание восстанавливающих сахаров определяли с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты (DNS; «Sigma», США) измеряя оптическую плотность при длине волны 540 нм (Miller, 1959).

Приготовление динитросалицилового реагента (DNS)

В химическом стакане на 500 мл растворяли 5 г 3,5-динитросалициловой кислоты (DNS; «Sigma», США) в 100 мл дистиллированной воды. Непрерывно перемешивая, медленно добавляли 8 г NaOH, растворенного в 80 мл дистиллированной воды. Инкубировали смесь при 50°C при постоянном перемешивании до получения прозрачного раствора. Небольшими порциями перемешивая добавляли 201 г тетрагидрата тартрата калия-натрия (сегнетовая соль, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$; «Хеликон», Россия). Фильтровали смесь через бумажный фильтр и доводили дистиллированной водой до объема 500 мл. Хранили в бутылке из оранжевого стекла в темноте при температуре ниже 20°C (Miller, 1959).

Построение калибровочной кривой с реагентом DNS

К 100 мкл стандартного раствора редуцирующих сахаров (глюкозы, ксилозы) в диапазоне разведений от 0.3–20мМ в 50мМ ацетатном буфере (рН 4.8), добавляли 100 мкл 50мМ ацетатного буфера и перемешивали. Контрольные пробирки содержали 200 мкл 50мМ ацетатного буфера (рН 4.8). Во все пробирки добавляли по 0.6 мл реагента DNS, хорошо перемешивали и помещали в кипящую воду на 5 минут. Охлаждали пробирки до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при 540 нм (Miller, 1959). При взаимодействии сахаров с 3,5-динитросалициловой кислотой она восстанавливается в 3-амино-5-нитросалициловую кислоту.

Получение коллоидного хитина

Стадия деминерализации. К 20 мг сухого измельченного панциря дальневосточного краба добавляли 200 мл 7% HCl. Тщательно перемешивали и помещали на водяную баню, предварительно нагретую до 70–80°C на 1 час, перемешивая. Далее охлаждали колбу с реакционной средой до комнатной температуры, многократно промывали деминерализованное сырье дистиллированной водой до нейтральной рН и фильтровали через фильтр Шотта.

Стадия депротеирования. Деминерализованное хитинсодержащее сырье с фильтра Шота количественно переносили в колбу и заливали 200 мл 7% раствора NaOH. Тщательно перемешивали и выдерживали на водяной бане при 70–80°C в течение 1 часа, периодически перемешивая. Промывали дистиллированной водой до нейтральной рН и фильтровали.

Стадия депигментирования и делипофилизации. Деминерализованное и депротеированное хитинсодержащее сырье переносили в колбу и заливали 200 мл 90% этилового спирта, помещали на водяную баню при 70–80°C, выдерживали 1 час, перемешивая, до светло бежевого цвета. Охлаждали, многократно промывали дистиллированной водой и фильтровали. Полученный (очищенный от минеральных и белковых примесей, пигментов и липидов) хитин переносили в чашку Петри, высушивали и взвешивали (Строкова и Подкорытова, 2018).

Определение активности хитиназы

Активность хитиназы определяли путем измерения разложения коллоидного хитина и хитозана («Sigma», США) (Zhou *et al.*, 2016). К 50 мкл грибного экстракта добавляли 450 мкл буфера Макилвейна (рН 6.0), содержащего 0.5% хитин или хитозан. Реакционную смесь инкубировали на водяной бане при 40°C в течение 30 минут.

Определение активности амилазы

Активность амилазы определяли путем измерения разложения растворимого крахмала («Sigma», США) (Sakthi *et al.*, 2012). Крахмал растворяли нагреванием при 45°C в 50 мМ

цитратном буфере (pH 5.5). Затем 125 мкл грибного экстракта смешивали с 125 мкл 1% раствора крахмала и инкубировали 30 минут при 37°C.

Определение активности инвертазы

Активность инвертазы определяли путем инкубации 600 мкл грибного экстракта с 150 мкл 150 мМ сахарозы в 20 мМ фосфатном буфере (pH 6.2) при 37°C в течение 30 минут (Cairns *et al.*, 1995).

Определение активности ксиланазы

Для определения активности ксиланазы использовали ксилан бука («Sigma», США). К 10 мкл грибного экстракта добавляли 490 мкл 1% ксилана в 50мМ фосфатном буфере (pH 6.0) и инкубировали 30 минут при 55°C (Nagar *et al.*, 2012). Или к 50 мкл грибного экстракта добавляли 450 мкл буфера Макилвейна (pH 6.0), содержащего 0.5% ксилан бука, реакционную смесь инкубировали на водяной бане при 40°C в течение 30 минут (Zhou *et al.*, 2016).

Определение активности целлюлаз (эндоглюканазы, экзоглюканазы (целлобиогидролазы) и β -глюкозидазы (целлобиазы))

Активность эндоглюканазы определяли с использованием карбоксиметилцеллюлозы в качестве субстрата («Sigma», США) (De Paula *et al.*, 2019). К 250 мкл грибного экстракта добавляли 250 мкл 2% карбоксиметилцеллюлозы в 100 мМ цитратном буфере (pH 5.5) и инкубировали 30 минут при 50°C.

Активность целлюлаз определяли по скорости превращения субстратов метилцеллюлоза низкой вязкости, метилцеллюлоза средней вязкости, гидроксиэтилцеллюлоза средней вязкости («Fluka», Швейцария). К 50 мкл грибного экстракта добавляли 450 мкл буфера Макилвейна (pH 6.0), содержащего 0.5% субстрат. Реакционную смесь инкубировали на водяной бане при 40°C в течение 30 минут (Zhou *et al.*, 2016).

Вышеописанные реакции останавливали нагреванием при 100°C за 5 минут до анализа продуктов реагентом DNS при длине волны 540 нм (Miller, 1959). За единицу активности принимали количество фермента, высвобождающего 1 мкмоль редуцирующих сахаров, эквивалентных глюкозе или ксилозе в минуту на мг белка.

4.8.2 Определение активности α -, β -галактозидаз и α -, β -глюкозидаз

Активность α -, β -галактозидаз и α -, β -глюкозидаз определяли по скорости превращения соответствующих субстратов в 4-нитрофенол, содержание которого определяли по оптической плотности при длине волны 405 нм. За единицу активности принимали количество фермента,

высвобождающего 1 мкмоль 4-нитрофенола в минуту на мг белка (Tsujibo *et al.*, 1998; Kozlova *et al.*, 2016).

Построение калибровочной кривой с 4-нитрофенолом

Калибровку строили по стандартному раствору 4-нитрофенола («Sigma-Aldrich», США) в диапазоне разведений от 0.02 до 20 мМ в 50 мМ ацетатном буфере (pH 7.0). Контрольные пробирки содержали 50 мМ ацетатный буфер. В пробирки, содержащие по 200 мкл 4-нитрофенола, добавляли по 1.4 мл 0.2 М Na₂CO₃. Оптическую плотность измеряли при 405 нм (Tsujibo *et al.*, 1998; Kozlova *et al.*, 2016).

Определение активности α -, β -галактозидаз

Активность α -, β -галактозидаз определяли по скорости превращения субстратов 4-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозид и 2-нитрофенил- α -D-галактопиранозид («Fluka», Швейцария) в 4-нитрофенол. К 70 мкл грибного экстракта добавляли 140 мкл 2.5 мМ субстрата в 50 мМ ацетатном буфере (pH 6.0) и инкубировали при 50°C в течение 10 минут. Реакцию останавливали добавлением 1.4 мл 0.2 М Na₂CO₃. Образцы центрифугировали в течение 10 минут при 10000×g и поглощение измеряли при 405 нм (Kozlova *et al.*, 2016).

Определение активности α -, β -глюкозидаз

Активность α -, β -глюкозидаз определяли по скорости превращения субстратов 4-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид, 2-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид и 2-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид («Fluka», Швейцария) в 4-нитрофенол. К 70 мкл грибного экстракта добавляли 140 мкл 2.5 мМ субстрата в 50 мМ ацетатном буфере (pH 6.0) и инкубировали при 50°C в течение 10 минут. Реакцию останавливали добавлением 1.4 мл 0.2 М Na₂CO₃. Образцы центрифугировали в течение 10 минут при 10000×g и поглощение измеряли при 405 нм (Tsujibo *et al.*, 1998).

4.8.3 Определение активности протеазы

Для определения протеазной активности 200 мкл 2% казеина («Sigma», США) в деионизированной воде смешивали со 100 мкл грибного экстракта и инкубировали 30 минут при 37°C. Затем реакцию останавливали добавлением 500 мкл 5%-ной трихлоруксусной кислоты («Sigma», США). Осадок удаляли центрифугированием в течение 10 минут при 5000×g и 25°C. Затем 100 мкл экстракта, 400 мкл 6% Na₂CO₃ и 100 мкл фенольного реагента Фолина-Чокальтеу («Sigma», США) смешивали и инкубировали 30 минут при 25°C. Высвобождение триптофана из казеина измеряли при длине волны 600 нм (Cupp-Enyard, 2008). За единицу активности протеазы принимали количество фермента, высвобождающего 1 мкмоль триптофана в минуту на мг белка.

4.8.4 Определение активности пектатлиазы

Активность пектатлиазы определяли путем измерения разложения полигалактуроновой кислоты (PGA; «Sigma», США) до ненасыщенных продуктов. Смешивали 435 мкл 0.25% PGA в 50мМ трис-HCl буфере (pH 8.5) с 50 мкл 10мМ CaCl₂ и 50 мкл грибного экстракта при 37°C. Накопление ненасыщенных продуктов измеряли при 234 нм (Shevchik *et al.*, 1997). Одну единицу активности пектатлиазы определяли как количество фермента, высвобождающего 1 мкмоль ненасыщенных продуктов в минуту на мг белка.

4.8.5 Определение активности ферментов лигнинолитического комплекса (Mn-пероксидаз, лигнин пероксидаз и лакказ) ксилотрофных базидиомицетов

Определение активности Mn-пероксидазы

Активность Mn-пероксидазы определяли по скорости окисления 1мМ 2,6-диметоксифенола («Acros-Organics», США) в 50 мМ Na-тарtratном буфере (pH 4.5), при длине волны 468 нм ($\epsilon=30.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Paszczynski and Crawford, 1988). В состав реакционной смеси входил 1мМ MnSO₄·5H₂O, реакцию начинали добавлением 1мМ H₂O₂.

Определение активности лигнин пероксидазы

Активность лигнин пероксидазы определяли по скорости окисления 2мМ вератрилового спирта («Acros-Organics», США) в 100 мМ Na-тарtratном буфере (pH 3.0) с 0.4мМ H₂O₂ до вератральдегида (Orth *et al.*, 1993). Накопление вератральдегида ($\epsilon=9.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) измеряли при 310 нм.

Определение активности лакказы

Активность лакказы определяли по скорости окисления 0.2мМ 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) (АБТС; («Sigma-Aldrich», США) в 50мМ Na-тарtratном буфере (pH 4.5) до устойчивого катион-радикала и измеряли по увеличению поглощения при длине волны 436 нм ($\epsilon=29300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Slomczynski *et al.*, 1995).

4.8.6 Определение активности тирозиназы

Активность тирозиназы определяли по скорости окисления 2мМ L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА; («Sigma-Aldrich», США) в 50мМ Трис-HCl буфере (pH 7.5) до ДОФА-хинона и измеряли по увеличению поглощения при 475 нм ($\epsilon=3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Pomerantz and Murthy, 1974).

За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта в минуту и выражали как мкмоль/мин/мг белка.

4.9 Определение активности и углеводной специфичности лектинов

Гемагглютинирующую активность лектинов определяли реакцией гемагглютинации с самопроизвольным оседанием эритроцитов, используя 2%-ную суспензию трипсинизированных эритроцитов кролика в серии последовательных 2-кратных разведений в планшетах для иммунологических исследований. Титр гемагглютинации выражали как максимальное разведение лектина, при которой еще отмечается агглютинация эритроцитов. Специфичность лектинов определяли методом ингибирования реакции гемагглютинации, с использованием стандартного набора углеводов (Lutsik *et al.*, 1981).

4.10 Транскриптомное профилирование немодельных организмов (на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*), алгоритм для физиологической интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования (Illumina HiSeq 2500)

4.10.1 Выделение РНК, подготовка библиотек и их секвенирование

Выделение РНК из *L. edodes* проводили на четырех разных стадиях морфогенеза – непигментированного (белого) мицелия, коричневой мицелиальной пленки, примордиев и плодовых тел, в двух биологических повторностях. Образцы растирали в жидком азоте до состояния пудры и выделяли РНК с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Дополнительную очистку РНК от пигментов проводили с помощью Agencourt RNAClean XP («Beckman coulter», США). Четыре мкг тотальной РНК после обработки ДНКазой Turbo («ThermoFisher Scientific», США) использовали для синтеза кДНК-библиотек с помощью набора TruSeq RNA v2 («Illumina», США). Определение нуклеотидных последовательностей библиотек кДНК проводили на платформе Illumina HiSeq 2500 на базе лаборатории экстремальной биологии (КФУ).

4.10.2 Оценка качества и сортировка прочтений

Для селекции прочтений по качеству и длине с помощью программы Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) были удалены риды, имеющие длину меньше 30 нуклеотидов и/или соответствующие адаптерным последовательностям. Эта же программа была использована для удаления концевых нуклеотидов прочтений с качеством ниже, чем Q30 (что соответствует 99.9-процентной вероятности нахождения прочтенного нуклеотида в данной позиции) (Ewing *et al.*, 1998). С помощью программы SortMeRNA (Kopylova *et al.*, 2012) из пула отфильтрованных ридов удаляли риды, которые соответствовали последовательностям 5S-, 18S- и 28S рРНК из базы данных rfam (Quast *et al.*, 2013) и silva (Nawrocki *et al.*, 2015). Для визуализации отфильтрованных последовательностей и подсчета количества прочтений использовали программу FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>).

4.10.3 Сборка и сортировка транскриптов, проверка качества сборки, аннотация и классификация транскриптов

Для сборки транскриптов использовали программу Trinity (Grabherr *et al.*, 2011); при этом проводили оптимизацию следующих параметров сборки: минимальная длина транскрипта, длина k-мера (количество нуклеотидов, на которые «разбиваются» прочтения для сборки транскриптов), алгоритм сборки. Избыточные транскрипты, которые, в том числе, представлены разными сплайс-формами, а также транскрипты, не содержащие открытых рамок считывания (OPC), удаляли с использованием программы EvidentialGene (<https://sourceforge.net/projects/evidentialgene/>). Для проверки качества сборки транскрипты сопоставляли с ортологичными генами базидиомицетов (<http://www.orthodb.org/>) с помощью программы BUSCO (Simão *et al.*, 2015). Аннотацию собранных транскриптов осуществляли с помощью программы BLAST+ (Camacho *et al.*, 2009) при следующих параметрах: максимальное количество аминокислотных последовательностей, соответствующих транскрипту – 1, величина ожидания (E-value) – 10^{-7} . Присвоение собранным транскриптам идентификационных номеров белков и соответствующих им описаний осуществляли с помощью скрипта, а также информации об аминокислотных последовательностях: всех организмов (<ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/uniref/uniref90/uniref90/>), всех грибов (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/fungi/>), *A. bisporus* (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/300/575/GCF_000300575.1_Agabi_varbisH97_2/), *Penicillium rubens* (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/226/395/GCF000226395.1PenChr_Nov2007/). Для классификации транскриптов по всем известным метаболическим путям, описанным в базе данных KEGG, собранным транскриптам *L. edodes* с помощью программы KAAS (<http://www.genome.jp/tools/kaas/>) присваивали идентификационные номера (k-номера) ортологичных генов, включенных в эту базу данных. Классификацию транскриптов *L. edodes* по метаболическим путям *A. bisporus*, (<http://rest.kegg.jp/link/pathway/abv>, <http://rest.kegg.jp/list/pathway/abv>), а также по всем известным метаболическим путям KEGG (<http://rest.kegg.jp/link/pathway/ko>, <http://rest.kegg.jp/list/pathway>) осуществляли с помощью авторского скрипта. Использованный в работе авторский скрипт, написанный на языке программирования R и содержащий подробное описание, находится в свободном доступе (<https://github.com/RimGubaev/pathannotation>). Для распределения собранных транскриптов по функциональным категориям базы Gene Ontology (GO) использовали программу Blast2Go (<https://www.blast2go.com>).

4.10.4 Выравнивание прочтений на транскрипты *L. edodes*, поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ)

Для выравнивания ридов на собранные транскрипты *L. edodes* была использована программа Bowtie2, которая не осуществляет поиск сплайс-форм транскриптов. Для подсчета

уровня экспрессии, измеряемого в RPKM (reads per kilobase per million reads), для каждого гена в образце была использована программа Cufflinks. Проверку самосогласованности (схожести) реплик по подсчитанному содержанию транскриптов (RPKM) проводили с помощью функции hclust в RStudio. Поиск экспрессирующихся и дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) осуществляли с помощью программ Cuffmerge и Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2012). ДЭГ считали те гены, для которых q-уровень достоверности был ниже 0.05, а количество ридов, выравнившихся на транскрипт, для каждой из двух повторностей, по крайней мере, для одного из сравниваемых состояний было больше 10.

4.10.5 Классификация ДЭГ по метаболическим путям, визуализация результатов

Для классификации по метаболическим путям ДЭГ *L. edodes* присваивали идентификационные номера метаболических путей *A. bisporus*, а также всех метаболических путей, описанных в базе данных KEGG. Затем подсчитывали количество либо активируемых, либо репрессируемых генов, входящих в тот или иной метаболический путь/функциональную группу. С помощью теста Фишера определяли достоверность (p-уровень значимости <0.05) представленности каждого пути активируемыми или репрессируемыми генами (Fisher, 1922). Для каждого пути было подсчитано отношение шансов (odds ratio), которое отображает степень его насыщенности активируемыми или репрессируемыми генами.

Для визуализации активируемых/репрессируемых метаболических путей, а также поиска метаболических путей (описанных для *P. rubens*), представленных активируемыми и репрессируемыми генами *L. edodes*, с помощью ресурса BioCyc (Caspi *et al.*, 2016) идентификационным номерам генов *P. rubens*, были присвоены уровни экспрессии соответствующих ДЭГ *L. edodes*; в дальнейшем эта информация была использована в качестве входных данных этого информационного ресурса. Классификацию ДЭГ, поиск перепредставленных метаболических путей KEGG, подготовку входных данных для BioCyc проводили с помощью авторского скрипта (https://github.com/RimGubaev/deg_to_path). Для поиска категорий GO, представленных активируемыми и репрессируемыми генами, использовали программу Blast2Go.

4.11 Выделение РНК и синтез кДНК при помощи реакции обратной транскрипции в реальном времени (ПЦР-РВ)

С использованием ПЦР-анализа обратных транскриптов в реальном времени была проведена верификация данных транскриптомного анализа. Ткани непигментированного мицелия, коричневой мицелиальной пленки, примордиев и плодовых тел *L. edodes* отдельно собирали, мгновенно замораживали и гомогенизировали, растирая в фарфоровой ступке в жидком азоте. Выделение тотальной РНК из клеток, проводили при помощи набора RNeasy

Plant Mini Kit («Qiagen», США), согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop ND-1000 («NanoDrop Technologies», США). Качество выделенной РНК оценивали по спектрам электрофоретического разделения в 1% агарозном геле после окрашивания бромистым этидием (Остерман, 1981). Для получения кДНК использовали 1,5 мкг тотальной РНК, предварительно обработанной 0.1 ед/мкл ДНКазой («Fermentas», Литва) при 37°C в течение 30 минут. Реакцию обратной транскрипции проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 100 мкМ праймеров олиго-dT18, 300 мкМ дезоксирибонуклеотидфосфатов, 100 ед. ревертазы M-MuLV («Fermentas», Литва) с соответствующим буфером. На первой стадии РНК в присутствии олигонуклеотидных затравок (олиго-dT18) прогревали при 70°C в течение 5 минут, а затем помещали на лед. На второй стадии добавляли остальные компоненты и инкубировали при 37°C в амплификаторе DNA Engine thermocycler («Bio-Rad», США) в течение 1 часа. Реакцию терминировали прогреванием смеси до 70°C в течение 10 минут; 2 мкл полученной кДНК использовали для проведения ПЦР.

4.12 Амплификация участков ДНК базидиомицетов с помощью ПЦР-PV

Для амплификации участков ДНК (кДНК) *L. edodes* нами были сконструированы праймеры, комплементарные фрагментам генов *lcc*, *tir*, *chi*, *exg*, *exp* и *gpd*, кодирующих лакказы, тирозиназу, хитиназу, глюканазу, специфический фактор транскрипции и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу. Последний ген был использован в качестве референсного.

Конструирование праймеров и олигонуклеотидных флуоресцентных зондов TaqMan проводили при помощи пакета программ Vector NTI версия 9 на основе нуклетидных последовательностей *L. edodes* (Sakamoto *et al.*, 2009). Поскольку информация о последовательности генома шиитакэ в базах данных крайне ограничена, в ряде случаев ее недостаток удавалось восполнить построением консенсусных последовательностей кодирующих областей генов с использованием базы данных по другим видам базидиомицетов. Праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в НПО «Синтол», (Россия) (Таблица 4).

ПЦР проводили в реакционной смеси (объемом 25 мкл), содержащей буфер (67мМ Трис-HCl pH 8.8, 17мМ (NH₄)₂SO₄, 2.5мМ MgCl₂ и 0.1% Tween 20), 100мкМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 2 мкл кДНК, 0.1 мкМ каждого праймера и зонда TaqMan 0.04 ед. Температурно-временной режим реакции (10 секунд при 94°C и 1 минута при 60°C) и изменение флуоресценции контролировали с помощью термоциклера с оптическим модулем CFX96 («Bio-Rad», США). Продолжительность реакций составляла 40 циклов. Содержание кДНК, соответствующей транскриптам каждого из исследованных генов, оценивали относительно калибровочных кривых, построенных по результатам реакций с четырьмя десятикратными разведениями кДНК. Оценку эффективности реакций и построение калибровочных кривых осуществляли с помощью программного обеспечения CFX Manager

Software («Bio-Rad», США). Отсутствие значимых количеств геномной ДНК подтверждали, проводя реакцию ПЦР с образцами, в которых при пробоподготовке был исключен этап обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии определяли сопоставлением количества кДНК, соответствующей целевому гену (*lcc*, *tir*, *chi*, *exg*, *exp*) и референсному гену (*gpd*).

Таблица 4 – Список использованных праймеров и флуоресцентных зондов TaqMan

Праймеры и зонды	Последовательность 5'-3'
<i>gpd1 (gpd) F</i>	GACGCACTGACAATCTGACTG
<i>gpd1 (gpd) R</i>	GATGCGAGAGTTCAGGTTTAC
<i>gpd1 (gpd) Z</i>	(FAM-C)CCTGTCCGAG(T-BHQ-1)CCTTTCCGTGATAC
<i>gpd2 F</i>	GAAGGGTGGTGCCAAGAAGGTG
<i>gpd2 R</i>	GCAGACGAACATGGGAGCATC
<i>tyr1 (tir) F</i>	GCCCAGGTGATCGTCTGCTTTC
<i>tyr1 (tir) R</i>	CTGCCAATGTGACCGATACGTCC
<i>tyr1 (tir) Z</i>	(FAM-C)ATGGACTA(T-BHQ-1)CCCTCCCGACACTGTAGTTGGAAAG
<i>tyr2 F</i>	CAACCCTTCTGGGACTGGGC
<i>tyr2 R</i>	CGGTAGCGACGGAGTGGATT
<i>lcc1 (lcc4) F</i>	CAGGCACCCCAGCAAATGACC
<i>lcc1 (lcc4) R</i>	CGGCACGCTGGGAGACACAAAG
<i>lcc1 (lcc4) Z</i>	(FAM-C)GTAACCA(T-BHQ-1)CGCACCATCATCATCGGGG
<i>lcc2 F</i>	CCGTGCCGCCGTTGTG
<i>lcc2 R</i>	GGTGGTCTTCAGCATTGTGTGG
<i>lcc3 F</i>	CCGTGCCGCCGTTGTG
<i>lcc3 R</i>	CGCCCAGTTCGTGCCCT
<i>chi1 (chi) F</i>	CTTCGGGAGCCTATGTAAGTGTG
<i>chi1 (chi) R</i>	CCAGGCTTTCCAATGATTACTGC
<i>chi1 (chi) Z</i>	(FAM-C)ACTACC(T-BHQ-1)GCGACGGGCTCC
<i>chi2 F</i>	GACGTGAACAAGCTGGTCATCG
<i>chi2 R</i>	GGGAAGTGAACGCCATGAC
<i>exg1 F</i>	CGGGGTAAGTTCTCCTCCAAG
<i>exg1 R</i>	GAACGAGTAGGACGAACCATG
<i>exg1 Z</i>	(FAM-C)TGGGCG(T-BHQ-1)TTGAAGTTGGTCCG
<i>exg2 F</i>	GTCAACCAAAACAAGTTCTTCCGC
<i>exg2 R</i>	GAGACCTGCCAGTGGATACCG
<i>exg3 F</i>	CCAGCAGTTCACGGTCCG
<i>exg3 R</i>	GAAGGTCCAGCCCCAGTTCC
<i>exp1 F</i>	GACTTCCATTTCTCCCGCTG
<i>exp1 R</i>	GAGATGGCTATGAGATGGCG

4.13 Определение цитотоксичности гликопротеинов и полисахаридов базидиомицетов

L. edodes, G. frondosa и G. lucidum

Работы по цитотоксичности грибных препаратов и цитоморфометрии опухолевых клеток выполнялась на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ФГБУН ИБФРМ РАН.

4.13.1 Культуры клеток млекопитающих

Клеточные линии выращивали в полной среде ДМЕМ с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 мг/л стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина. Клетки выращивали в тканевых культуральных плашках площадью 25 см² в инкубаторе с водяной баней при 37°C и атмосфере, увлажненной 5% CO₂. Анализы цитотоксичности проводились с использованием следующих линий раковых клеток: A549 (легочная аденокарцинома) (Giard *et al.*, 1973), Hep-2 (эпидермоидная карцинома гортани) (Moore *et al.*, 1955), HeLa (карцинома шейки матки человека) (Scherer *et al.*, 1953), SPEV-2 (клетки почки эмбриона свиньи, зараженные онковирусом) (Mamaeva, 2002) и С6 (глиома крысы) (Mamaeva, 2002). Контрольными были не раковые клеточной линии CHO-K1 (клетки яичников китайского хомячка) (Mamaeva, 2002; Puck *et al.*, 1958) и Vero (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки) (Macfarlane and Sommerville, 1969). Клетки были получены из Института цитологии РАН (Россия).

Было оценено время удвоения клеток каждой клеточной линии, которая использовалась в экспериментах. Учитывая экспериментальные условия, начальную плотность клеток, время культивирования и конечную плотность клеток, было рассчитано 8-кратное удвоение клеток для каждой линии в фазе экспоненциального роста (<https://www.doublingtime.com/compute.php>). Время клеточного удвоения для Vero, A549, Hep-2, HeLa, SPEV-2, С6 и CHO-K1 составило 24.7 ± 0.9 ч, 27.2 ± 1.3 ч, 27.1 ± 1.1 ч, 26.1 ± 1.0 ч, 29.4 ± 1.3 ч, 22.9 ± 0.7 ч и 24.6 ± 1.8 ч, соответственно. Все последующие эксперименты проводились с учетом данных параметров.

4.13.2 Оценка цитотоксичности *in vitro* фракций гликопротеинов и полисахаридов на клеточных линиях млекопитающих

Клетки помещали в 96-луночный микропланшет (инокуляционная доза – 2000 клеток на лунку) в 200 мкл среды ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков пенициллина – 10⁵ед/л и стрептомицина – 100 мг/л. По достижении клеточного монослоя 70%, когда клетки находились в фазе экспоненциального роста, старую культуральную среду удаляли и добавляли свежую среду ДМЕМ, содержащую исследуемый грибной препарат. Лиофильно высушенные гликопротеиновые и полисахаридные фракции грибов, разводили культуральной средой ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков пенициллин 10⁵ед/л, стрептомицин 100 мг/л. Далее планшеты инкубировали в

течение 24 часов. Определение дыхательной активности проводили по способности клеток восстанавливать нитротетразоловый синий ([3-(4,5-диметилтиазол-2ил)]-2,5-дифенилтетразолийбромид) до формазана метаболически активными клетками по общепринятому методу (МТТ-тест) (Niks and Otto, 1990; Bernas and Dobrucki, 2000). Удаляли старую среду, добавляли 0.5 мг нитротетразолового синего на 100 мл ФСБ и инкубировали 1 час. Лунки опустошали и вносили 200 мкл диметилсульфоксида (CH₃)₂SO (ДМСО), инкубировали 10 минут, а затем измеряли оптические плотности. Данные получали на планшетном спектрофотометре спектрофотометре Spark 10M (Tecan Group Ltd., Швейцария) при длине волны $\lambda=540$ нм, с бланком на $\lambda=690$ нм. Значения при λ 690 нм (которые находятся за пределами максимума поглощения формазана), были вычтены из результатов, полученных при λ 540 нм (Jiao *et al.*, 1992; Scarcello *et al.*, 2020). Дыхательную активность контроля принимали за 100%.

4.13.3 Цитоморфометрические исследования раковых клеток

Исследование жизнеспособности клеток с помощью пропидий йодида

Клеточные линии культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10% ФСБ, в 24 луночном планшете. По достижении 70% монослоя, старая питательная среда удалялась и вносилась новая, содержащая исследуемые препараты. Через 24 часа содержимое лунок удалялось и вносился 30 мкМ раствор пропидий йодида в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10% ФСБ. После 15 минут инкубации, питательная среда удалялась и в лунки добавляли 1 мкМ раствор CellTracker™ CM-DiI Dye («Thermo Fisher Scientific», США) в ДМЕМ с добавлением 10% ФСБ. Инкубировали 15 минут, после чего 3 раза промывали сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) (Hezel *et al.*, 2012 Loken, 1980). Исследования по жизнеспособности и морфометрии опухолевых клеток проводили при увеличении 100× и 200× на микроскопе Leica DM6000B («Leica Microsystems», Германия).

Дифференциальное окрашивание ядер, нуклеиновых кислот и лизосом

Для визуализации ядер клеток проводили окраску реактивом Hoechst 33342, а для дифференциального окрашивания нуклеиновых кислот и лизосом использовали краситель акридиновый оранжевый, с целью определения апоптотических клеток. Процедуру проводили по стандартным протоколам (Hoechst-33342-imaging-протокол «Thermo Fisher Scientific», США) и (Mirrett, 1982). Использовали микроскоп Leica DM6000B («Leica Microsystems», Германия) с увеличением ×100, ×200 и ×400, включая использование иммерсионных масляных линз.

Конфокальная микроскопия

Для конфокальной микроскопии использовали конфокальный лазерный микроскоп TCS SP5 («Leica Microsystems», Германия). Для регистрации сигналов использовался диодный лазер

λ 405 нм и аргонный полилинейный лазер с полосой возбуждения λ 488 нм и λ 514 нм. Регистрация излучения осуществлялась по каналам λ 460–480 нм, λ 496–506 нм и λ 525–560 нм. Изображения были получены с использованием масляно-иммерсионных линз ($\times 100$). Сканирование проводилось с разрешением 1024×1024 и 2048×2048 и цифровым увеличением $\times 1000$ и $\times 3000$. Полученные изображения обрабатывались на рабочей платформе конфокального микроскопа Leica TCS SP5 («Leica Microsystems», Германия).

4.14 Противоопухолевая активность гликопротеинов *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*

4.14.1 *Определение in vivo противоопухолевой активности фракций водорастворимых гликопротеинов в отношении рака почки РА*

Противоопухолевую активность выявляли на свободных от патогенов белых беспородных крысах самцах линии Wistar, которые были получены из Центра Национального ресурса лабораторных животных (Пушино, Москва, Россия). Животные содержались в стандартных лабораторных условиях, со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Протоколы экспериментов были одобрены «Комиссией по биоэтике Саратовского государственного медицинского университета» (протокол №6 от 06.02.2018). Животные массой 160 ± 20 г, были случайным образом разделены на четыре опытные группы и группу сравнения (по 4 особи в каждой). Крысам имплантировали рак почки (РА) (0.5 мл 25%-ной суспензии опухолевых клеток в растворе Хэнка) путем подкожного введения суспензии опухолевых клеток в лопаточную область. Штамм опухоли был получен из банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России. Через 72 часа после перевивки крысам опытных групп ежедневно в течение 10 дней перорально вводили по 1 мл исследуемой фракции водорастворимых гликопротеинов, животным из группы сравнения (контроль) по 1 мл раствора ФСБ. Ежедневно, начиная со второго дня приема животными грибных гликопротеинов, проводили измерение объема опухоли. Объем опухоли высчитывали по формуле: $V = A \times B \times V$, где А – ширина, Б – толщина, В – высота опухоли. Измерения проводили электронным штангенциркулем ежедневно от начала эксперимента, в конце эксперимента высчитывали индекс торможения роста опухоли (ИТРО) согласно рекомендациям (Хабриев, 2005). Через сутки после последнего введения грибных препаратов животных выводили из исследования путем декапитации. Для дальнейшего исследования производили забор образцов тканей органов и опухоли. Эксперименты на животных выполняли в соответствии с международными этическими нормами и правилами работы с лабораторными животными (<http://conventions.coe.int/treaty/Commun/QueVoulezVous.asp?CL=RUS&NT=123>).

Данная работа выполнялась на базе Центра коллективного пользования НИИ Фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им. В.И. Разумовского.

4.14.2 Цитоморфометрические исследования опухолевых тканей и структурных изменений в органах лабораторных животных

Для изучения патологических изменений опухолевых тканей и структурных изменений в органах (слизистая оболочка желудка, мезентериальный лимфатический узел) применяли морфологические и морфометрические методы с использованием стандартных гистологических методик окраски гематоксилином и эозином. Учитывали наличие дистрофических и некробиотических изменений, цитоморфометрические показатели (диаметр опухолевой клетки, соотношение диаметров опухолевой клетки и ее ядра, ядерно-цитоплазматический индекс). Морфометрическое исследование проводили с помощью Микровизора μ Vizo-103 с увеличением $\times 774$ (Автандилов, 1990).

4.14.3 Исследование морфометрии опухолевых клеток с помощью автоматизированной микроскопической системы «Ariol»

Кроме того, исследования по морфометрии опухолевых клеток проводили с помощью автоматизированной микроскопической системы Ariol SL50 («Genetix», Великобритания). Сканирование стекол осуществляли при увеличении $200\times$. Подсчет площади ядер и цитоплазмы выполняли с применением программного модуля MultiStain системы Ariol. Данная работа выполнялась на базе ЦКП «Симбиоз» ФГБУН ИБФРМ РАН.

4.15 Изучение цитотоксичности биогенных наночастиц Au^0 и Ag^0

Исследование цитотоксичности наночастиц золота и серебра проводили с использованием МТТ-теста на дыхательную активность животных клеток (Niks and Otto, 1990). Для анализа были использованы наночастицы, полученные восстановлением HAuCl_4 или AgNO_3 бесклеточным фильтром 14-суточной культуры *L. edodes* путем 30 минут инкубирования при 25°C .

Полученные наночастицы центрифугировали 15 минут при 15000 g и ресуспендировали в питательной среде до финальной концентрации 100 мкг/мл . В качестве тестируемых культур животных клеток были выбраны клеточные линии почки африканской зеленой мартышки (Vero) и клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), любезно предоставленные криобанком коллекции клеточных культур Института Цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН). Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C и $5\%\text{ CO}_2$ в пластиковых флаконах на среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки St-Biol («Биолот», Россия) и 1% смеси антибиотиков пенициллин-стрептомицин-неомицин («Sigma», США). Для проведения МТТ-теста клетки выращивали в 96-ти луночной планшете до 70% конфлюэнтного монослоя, питательную среду в каждой лунке заменяли на свежую с добавлением суспензии наночастиц варьирующих концентраций (от 1 до 100 мкг/мл) в соотношении 1:10 (20 мкл суспензии наночастиц на 200 мкл питательной среды),

инкубировали в течение 24 и 48 часов. Контролем служили клетки без добавления наночастиц. Опыт воспроизводили в трехкратной повторности. МТТ-реагент (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1 мг/мл готовили *ex tempore*, в 10 mM фосфатно-солевом буфере («Биолот», Россия). Среду сливали, не снимая клетки с планшета, в каждую лунку добавляли 100 мкл МТТ-реагента. Инкубировали 1 час при 37°C и 5% CO₂. После инкубирования МТТ-реагент сливали и в каждую лунку добавляли 200 мкл ДМСО («Реахим», Россия). Инкубировали 15 минут при 37°C на термостатируемом шейкере для равномерного растворения кристаллов формазана. Показания оптической плотности считывали на микропланшетном спектрофотометре Spark 10M («Tecan», Швейцария) при длине волны 540 нм, референс снимали при длине волны 690 нм. Подсчет дыхательной активности производили, вычитая из значений оптической плотности D₅₄₀ значения оптической плотности D₆₉₀, определяя среднее значение и стандартное отклонение. Оптическую плотность контрольных лунок принимали за 100% дыхательной активности и рассчитывали снижение дыхательной активности клеток в экспериментальных лунках в процентах по отношению к контролю.

Оценку состояния монослоя клеток до и после добавления наночастиц проводили путем прямой микроскопии с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI3000B, оборудованного камерой Leica 420 D CCD («Leica Microsystems», Германия) в режиме фазового контраста. Микроскопические исследования проводились в ЦКП «Симбиоз» (ИБФРМ РАН).

4.16 Реактивы и материалы

В работе использовали полистироловые плоскодонные планшеты для иммунологических исследований и иммуноферментного анализа, чашки Петри («МиниМед», Россия), полипропиленовые пакеты («ГЕМ», Россия), пластиковые флаконы («Биолот», Россия), никелевые сеточки («Sigma», США); носители «Separon SCN», Sephadex G-25, Sephadex G-75 («Sigma-Aldrich», США), TSKgel BioAssist Q («Merck», Германия), Toyopearl DEAE-650M («Tosoh Corporation», Япония); золотохлористоводородная кислота HAuCl₄, нитрат серебра AgNO₃, селенит натрия Na₂SeO₃, глутаровый альдегид, оксид осмия (VIII) OsO₄, окись пропилена, эпоксидная смола ЭПОН, метиленовый-синий, уранилацет, цитрат свинца, формвар, дихлорэтан, 4-нитрофенол, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, АБТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат), L-дигидроксифенил-аланин («Sigma-Aldrich», США); ксилоза, манноза, галактоза, глюкоза, трегалоза, арабит, маннит, периодат натрия, боргидрид натрия, о-дианизидин, 3,5-динитросалициловая кислота, пенициллин-стрептомицин-неомицин, нитротетразолевый синий ([3-(4,5-диметилтиазол-2ил)]-2,5-дифенилтетразолийбромид), хитин и хитозан, крахмал, ксилан бука, карбоксиметилцеллюлоза, казеин, трихлоруксусная кислота, фенольный реагент Фолина–Чокальтеу, полигалактуроновая кислота («Sigma», США); Coomassie Brilliant Blue R-250, сиригальдазин (4-гидрокис-3,5-

диметоксибензальдегид азин), акриламид, метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия, ТЕМЕД, персульфат аммония, трис, β -меркаптоэтанол, о-дианизидин, метилцеллюлоза низкой вязкости, метилцеллюлоза средней вязкости, гидроксиэтилцеллюлоза средней вязкости, 4-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозид и 2-нитрофенил- α -D-галактопиранозид, 4-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид, 2-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид и 2-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид («Fluka», Швейцария); L-дигидроксифенилаланин («Serva», Германия); 2,6-диметоксифенол, вератриловый спирт («Acros-Organics», США); тетрагидрата тартрат калия-натрия (сегнетовая соль, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$) («Хеликон», Россия); ДНКазы Turbo, раствор CellTracker™ CM-Dil Dye, Hoechst 33342 («ThermoFisher Scientific», США); реагент ExtractRNA («Евроген», Россия); Agencourt RNAClean XP («Beckman coulter», США); набор TruSeq RNA v2 («Illumina», США); набор RNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», США); ДНКазы, дезоксирибонуклеотидфосфаты, ревертаза M-MuLV («Fermentas», Литва); праймеры и олигонуклеотидные флуоресцентные зонды TaqMan («Синтол», Россия); среда DMEM, бычья эмбриональная сыворотка St-Biol («Биолот», Россия); ДМСО («Реахим», Россия).

Линии раковых клеток: A549 (легочная аденокарцинома), Hep-2 (эпидермоидная карцинома гортани), HeLa (карцинома шейки матки человека), SPEV-2 (клетки почки эмбриона свиньи, зараженные онковирусом), С6 (глиома крысы) и клеточные линии CHO-K1 (клетки яичников китайского хомячка), Vero (клетки эпителия почки африканской зеленой мартишки) получены из Института цитологии РАН (Россия); штамм опухоли рака почки (РА) получен из банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Остальные расходные материалы отечественного производства, реактивы отечественного производства марки «осч» и «хч».

4.17 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.

При определении противоопухолевой активности *in vivo*, эксперименты проводились в четырех повторностях в трех независимых экспериментах. При статистической обработке данных экспериментов нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения средних полученных показателей был использован критерий Крамера-Уэлча (T), при котором разность средних арифметических двух выборок (контрольной и экспериментальной) делится на естественную оценку среднего квадратичного отклонения этой разности. При данном методе разность средних с вероятностью в 95% определяется при $T \geq 1,96$. Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения STATISTICA 10.0 Interprise.

ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА БАЗИДИАЛЬНЫХ МАКРОМИЦЕТОВ

Предметом нашего исследования являются особенности жизненного цикла базидиальных макромицетов и вопросы, касающиеся молекулярно-генетических, физиологических, ультраструктурных аспектов образования различных морфоструктур, что позволяет понять механизмы, связанные с клеточной дифференцировкой и инициацией образования морфогенных структур, в том числе плодовых тел, у высших грибов. С другой стороны промышленное культивирование базидиальных макромицетов чрезвычайно популярно, однако получение плодовых тел ксилотрофных грибов длительный и трудоемкий процесс, что связано с особенностями их жизненного цикла. И вопросы о возможной оптимизации искусственного выращивания базидиом макромицетов, прежде всего биотехнологически значимых культур, до настоящего времени актуальны.

5.1 Особенности морфогенеза базидиомицетов *P. ostreatus*, *A. mellea*, *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*

В ходе выполнения работы в лабораторных условиях на питательных средах разного состава при твердофазном и глубинном культивировании была исследована способность ксилотрофных базидиомицетов *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *A. mellea* и *P. ostreatus* проходить полный жизненный цикл с образованием разных морфоструктур. В процессе онтогенеза базидиальные макромицеты последовательно образовывали несколько характерных стадий: вегетативный непигментированный мицелий, который характеризуется активным ростом, пролиферацией клеток, ветвлением, растяжением мицелиальных гиф, освоением субстрата (Vetchinkina *et al.*, 2017a). Для опенка осеннего также характерной стадией являются ризоморфы – длинные шнуровидные сплетения мицелиальных гиф, данные морфоструктуры способствуют проведению воды и питательных веществ, необходимы для колонизации субстрата, а также могут обеспечивать выживаемость при неблагоприятных условиях (Pareek *et al.*, 2001). На следующем этапе развития, гифы мицелия, расположенные на поверхности субстрата, уплотнялись, приобретали пигментацию, плотно скреплялись между собой, их клеточная стенка сильно утолщалась, таким образом, формировалась пигментированная (коричневая) мицелиальная пленка, структура, характерная для многих макромицетов, образование которой, предшествует плодоношению (Vetchinkina *et al.*, 2017b; Vetchinkina, 2025). В дальнейшем, под поверхностью мицелиальной пленки, закладывались примордии, которые затем формировались в плодовые тела (Ветчинкина и Никитина, 2007; 2017; Vetchinkina, 2025).

Характерной стадией морфогенеза многих базидиальных макромицетов является коричневая мицелиальная пленка – бархатистое пленчатое образование, образующееся поверх вегетативного непигментированного мицелия и представляющее собой плотное сплетение

пигментированных гиф. После колонизации и освоения субстрата внешний слой вегетативного мицелия уплотняется и приобретает пигментацию, формируется бархатистая кожистой консистенции мицелиальная пленка от бежевого до темно-коричневого цвета, состоящая из плотно переплетенных толстостенных меланизированных гиф. Мицелиальная пленка напоминает ткань и покрывает большую часть поверхности непигментированного мицелия, она образуется непосредственно перед началом плодоношения, под ее поверхностью начинают формироваться примордии. В процессе эволюции эта структура, вероятно, появилась как защитный механизм, предохраняющий мицелий и формирующиеся плодовые тела от неблагоприятных воздействий окружающей среды: избытка освещения, пересыхания мицелия, снижения проницаемости клеточных стенок для токсичных веществ и патогенов (Garibova *et al.*, 1999). Данная морфоструктура по ряду признаков напоминает склероции – стадии покоя базидиомицетов, формирующиеся в ответ на неблагоприятные внешние раздражители. Склероции – это образования часто неправильной формы, состоящие снаружи из окрашенных плотно переплетенных толстостенных гиф, служащих для защиты внутренних, тонкостенных, живых клеток мицелия, из которых впоследствии развиваются плодовые тела. Гифы склероция богаты питательными резервными материалами, особенно маслами и содержат очень малое количество воды. Данные сложные структуры могут варьировать в зависимости от вида грибов и быть разного цвета, размера, формы. У некоторых видов наличие склероция – важный таксономический признак (Bisko *et al.*, 1983; Bukhalo, 1988). Считается, что коричневая мицелиальная пленка также как и склероции, стадия покоя базидиомицетов, возникающая при неблагоприятных внешних условиях среды и выполняющая только «каркасную» защитную функцию. Однако, на основании наших наблюдений и исследований есть все основания полагать, что это не мертвая структура, а живая метаболически активная динамичная система, несущая полифункциональную нагрузку, активно взаимодействующая с ниже расположенным мицелием и окружающей средой и выполняющая важнейшие регуляторные функции в процессе онтогенеза базидиомицетов (Ветчинкина и Никитина, 2007; Vetchinkina and Nikitina 2017; Vetchinkina *et al.*, 2017a; 2017b).

Несмотря на то, что большинство изучаемых макромицетов образовывали эту морфоструктуру, по своему внешнему виду мицелиальные пленки разных грибов различались. Пленка трутовика лакированного кожистая очень плотная, содержащая очень мало влаги, имела насыщенный бежевый цвет и формировалась в основном по центру колонии (Рисунок 5А, Б). Примордии закладывались у *G. lucidum* до образования пленки и по мере роста плодового тела формировалась и покрывала всю колонию и мицелиальная пленка (Рисунок 5В, Г).

Культура *G. lucidum* была способна к образованию как типичных плодовых тел (Рисунок 6А, В), так и атипичных базидиом (Рисунок 6Б, Г). Некоторые штаммы *G. lucidum* способны образовывать атипичные плодовые тела, именуемые «оленьи рога», коралловидные атипичные плодовые тела, тем не менее, способны к формированию жизнеспособных базидиоспор. Такие

абиотические факторы, как освещенность, аэрация, pH и некоторые источники углеродного и азотного питания не влияли на способность культур к образованию атипичных плодовых тел и, следовательно, этот признак можно считать штаммовым.

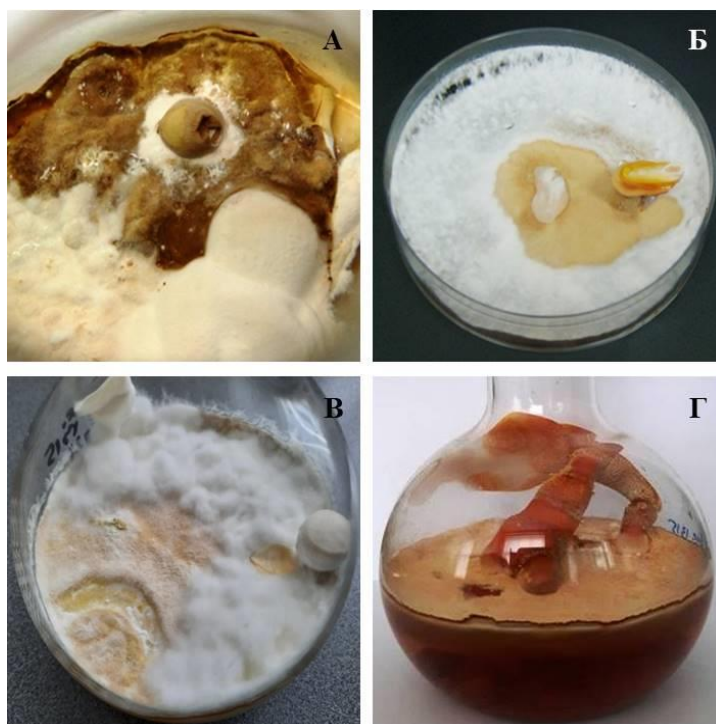


Рисунок 5 – Особенности морфогенеза и образования мицелиальной пленки, примордий и плодовых тел у *G. lucidum*
(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

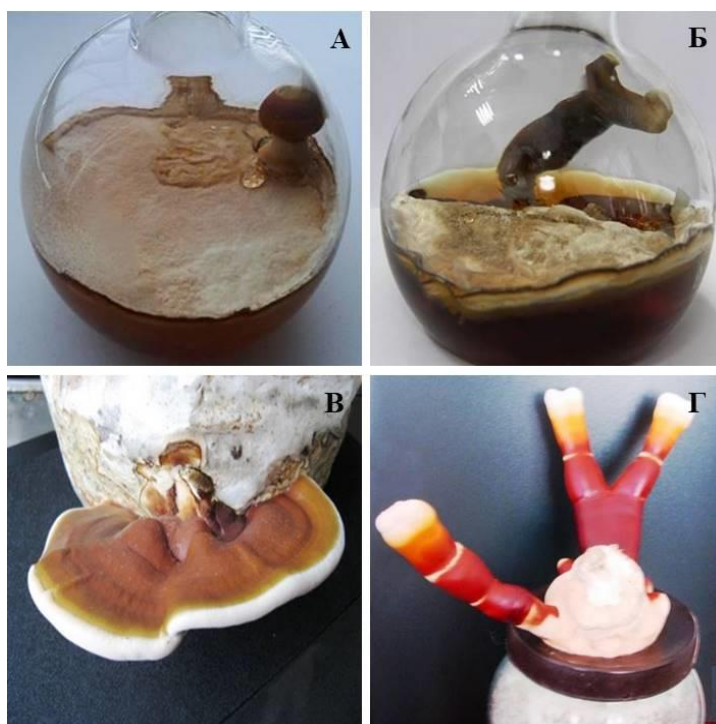


Рисунок 6 – Образование типичных плодовых тел (А, В) и атипичных базидиом (Б, Г) у *G. lucidum* при глубинном культивировании (А, Б) и на опилочно-зерновом субстрате (В, Г)

У грифолы курчавой данная структура была менее плотная, обводненная, расположенная по всей поверхности мицелия, оранжево-коричневого цвета. Примордии появлялись после образования пигментированной мицелиальной пленки (Рисунок 7А, Б).

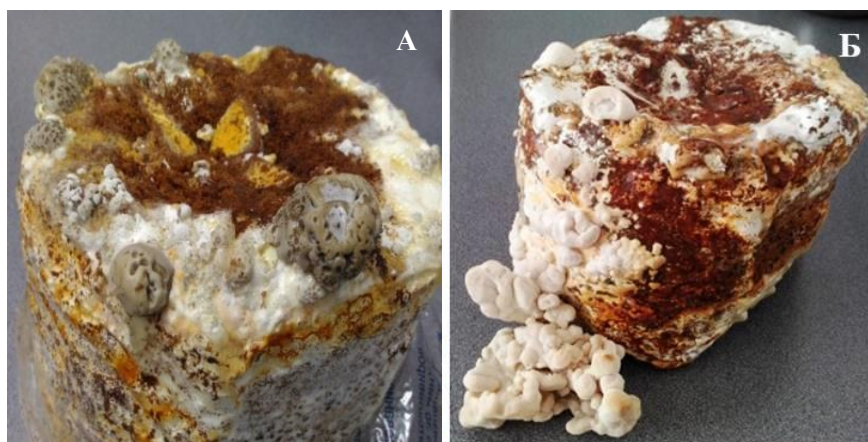


Рисунок 7 – Особенности морфогенеза и образования мицелиальной пленки, примордий и плодовых тел у *G. frondosa*
(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

Для вешенки устричной *P. ostreatus* характерной особенностью данной морфоструктуры являлось почти полное отсутствие пигментации, мицелиальная пленка данной культуры представляла собой тонкое пленчатое образование белого или слабо кремового цвета, покрывающее всю площадь рыхлого непигментированного мицелия. Плодовые тела у *P. ostreatus*, как и у трутовика лакированного, формировались до появления данной плотной мицелиальной структуры (Рисунок 8А, Б).

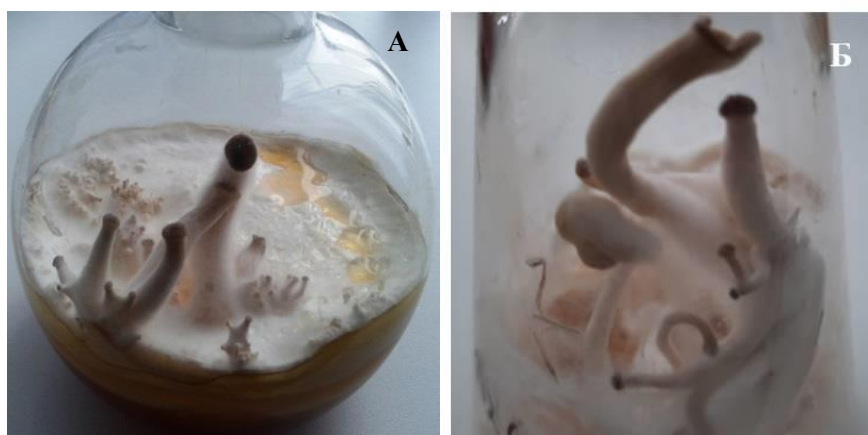


Рисунок 8 – Особенности морфогенеза и образования мицелиальной пленки, примордий и плодовых тел у *P. ostreatus*
(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

У *A. mellea*, одновременно с разрастанием непигментированного мицелия, формировались и принимали участие в освоении субстрата ризоморфы – длинные

шнуровидные сплетения мицелиальных гиф, характерные для опенка морфообразования, необходимые для проведения воды и питательных веществ, а также обеспечения выживаемости при неблагоприятных условиях (Рисунок 9А, Б). После накопления достаточной мицелиальной массы, начинала формироваться коричневая мицелиальная пленка (Рисунок 9В).



Рисунок 9 – Особенности морфогенеза, образования ризоморф, коричневой мицелиальной пленки, примордий и плодовых тел у *A. mellea*
(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

У шиитаке *L. edodes*, также как и у опенка осеннего коричневая мицелиальная пленка была очень плотная бархатистая, заполняла большую часть поверхности мицелия и имела темно коричневый (почти черный) цвет из-за большого количества меланина внутри и на поверхности клеток (Рисунок 10А, Б). У базидиомицетов *A. mellea* (Рисунок 9Г, Д) и *L. edodes* (Рисунок 10В, Г) образование примордий и плодовых тел наблюдалось только после формирования коричневой мицелиальной пленки.

Разные штаммы базидиомицета *L. edodes* на древесном субстрате плодоносили по-разному. Типовой штамм шиитаке F-249 после формирования коричневой мицелиальной пленки, которая покрывала большую часть поверхности непигментированного мицелия, образовывал большое количество примордиев и типичных плодовых тел (Рисунок 11А).

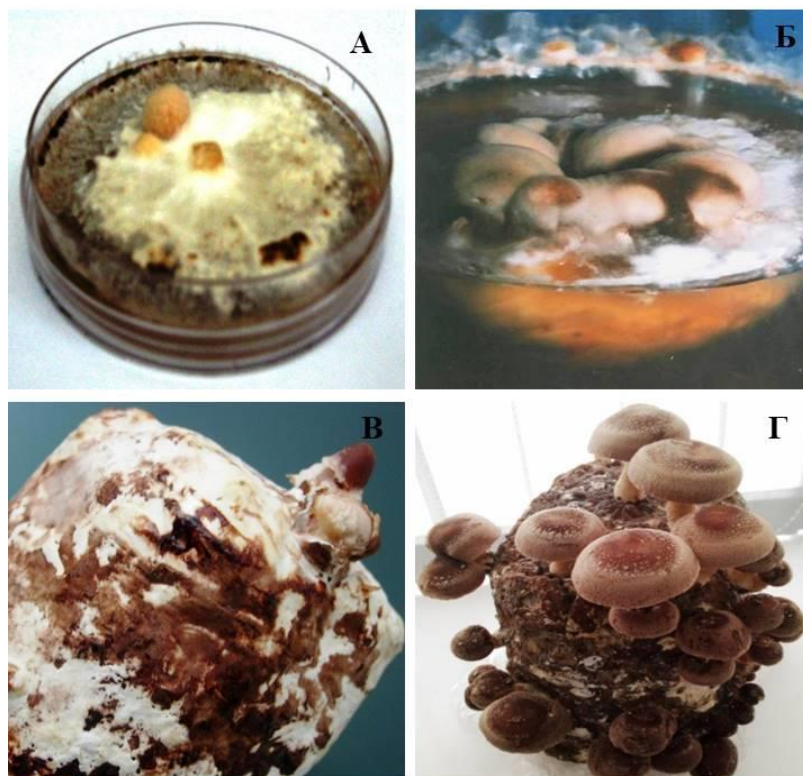


Рисунок 10 – Особенности морфогенеза и образования коричневой мицелиальной пленки, примордий и плодовых тел у *L. edodes* (Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

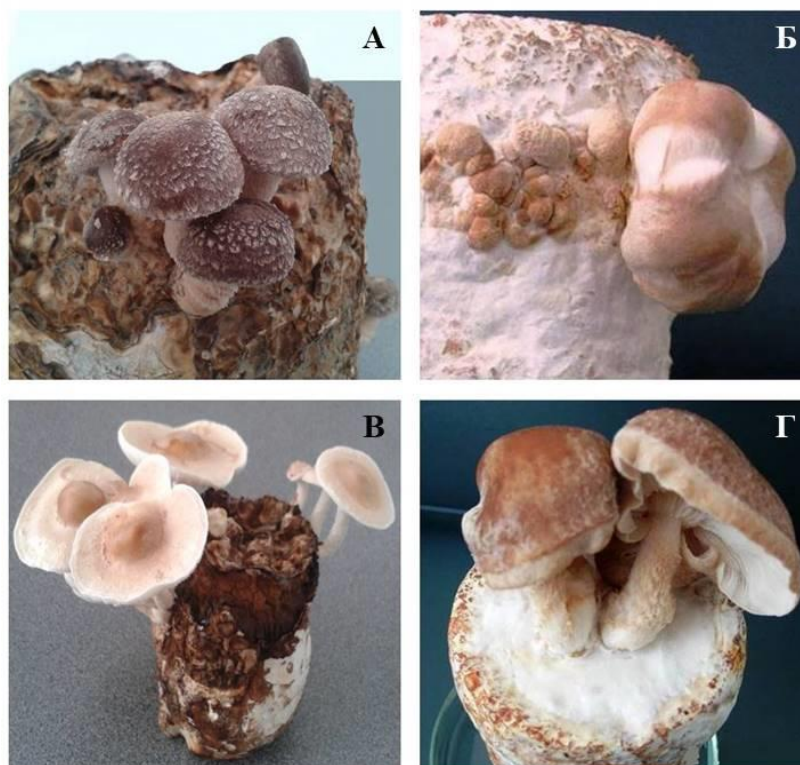


Рисунок 11 – Образование коричневой мицелиальной пленки, примордий и типичных плодовых тел у штамма F-249 (А), дефектных базидиом на непигментированном мицелии у штамма 2-Т (Б), типичных плодовых тел на мицелиальной пленке у штамма 2-Т (В) и типичных плодовых тел на непигментированном мицелии у штамма 363 (Г) базидиомицета *L. edodes* при культивировании на опилочно-зерновом субстрате (Vetchinkina *et al.*, 2015 <https://doi.org/10.1134/S0026261715010166>)

У штамма 2-Т наблюдался сбой в программе нормального плодоношения. После колонизации субстрата и уплотнения мицелия, гриб не формировал мицелиальную пленку, а образовывал гипертрофированные бесформенные примордии, которые развивались в нетипичные плодовые тела, не дифференцированные на шляпку и ножку, без развития гимениального слоя (Рисунок 11Б). После удаления дефектных базидиом, непигментированный мицелий спустя некоторое время покрывался слоем плотно переплетенных толстостенных меланизированных гиф, формировалась коричневая мицелиальная пленка, а затем нормальные примордии и плодовые тела (Рисунок 11В).

Нами было отмечено, что полноценные плодовые тела шиитаке образовывал только после формирования данной структуры, характерной практически для всех штаммов *L. edodes*. Некоторые штаммы шиитаке, не образующие коричневую мицелиальную пленку, также не были способны и к плодоношению. Исключением из этого правила является штамм 363, который без формирования коричневой мицелиальной пленки на непигментированном мицелии образовывал нормальные примордии и плодовые тела (Рисунок 11Г).

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

5.2.1 Исследование структуры гиф методом световой микроскопии

Исследования методом световой микроскопии полутонких срезов мицелия базидиомицетов показали, что гифы на стадии образования мицелиальных пленок расположены неоднородно. В качестве отличительной особенности, общей для всех базидиомицетов, можно отметить усиление межклеточной спайки, гифы были погружены в общий матрикс и очень плотно прилегали друг к другу, образуя многоклеточную структуру (Рисунок 12А–В). С поверхности клетки были расположены намного плотнее, образуя слой переплетенных меланизированных гиф, имеющих больший диаметр относительно ниже расположенных клеток мицелия. Внешний матрикс снаружи был очень плотный, протопласт клеток оставался живым, лишь крайний ряд выглядел мертвым. Гифы, проникающие внутрь субстрата, имели меньшую плотность расположения по сравнению с внешними (Рисунок 12А–В).

Исследование полутонких срезов непигментированного рыхлого мицелия методом световой микроскопии показало, что гифы имели диаметр 3–4 мкм и образуя над субстратом слой толщиной примерно 40–50 мкм. Гифы, проникающие внутрь субстрата, имели гораздо меньшую плотность расположения по сравнению с внешними (Рисунок 13А). Полутонкие срезы непигментированного плотного мицелия показали его неоднородность. С верхней стороны, гифы были расположены плотнее, среди них было отмечено много тонких около 1 мкм, диаметр гиф в нижней части, плотно прилегающей к субстрату, был равен 2–3 мкм. Кроме того, гифы были погружены в общий матрикс (Рисунок 13Б).

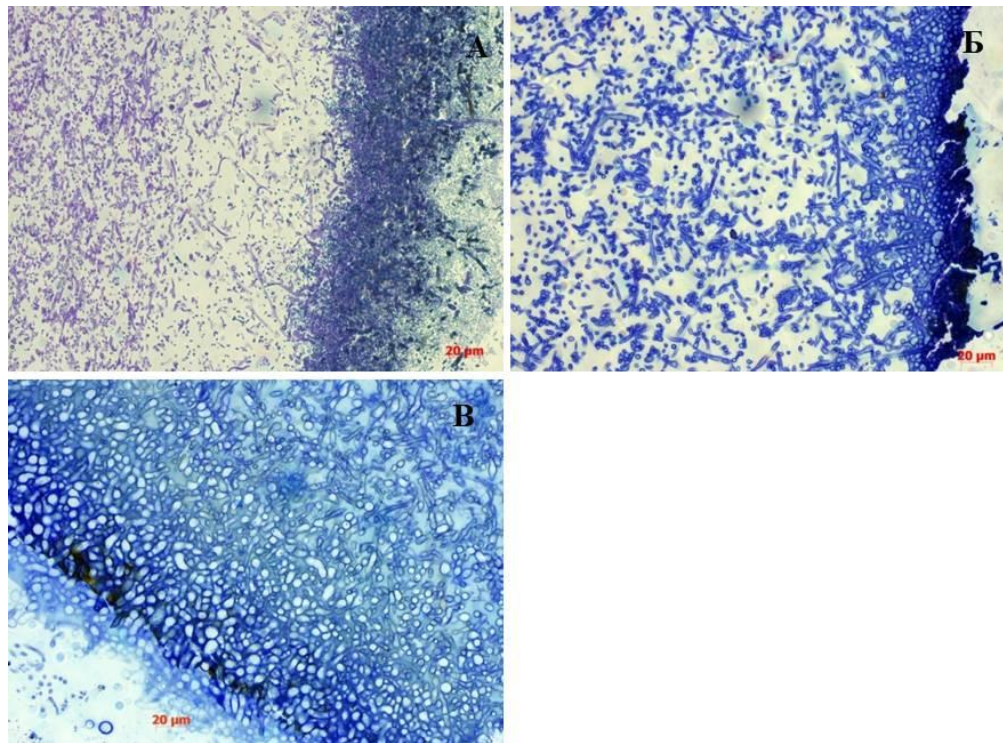
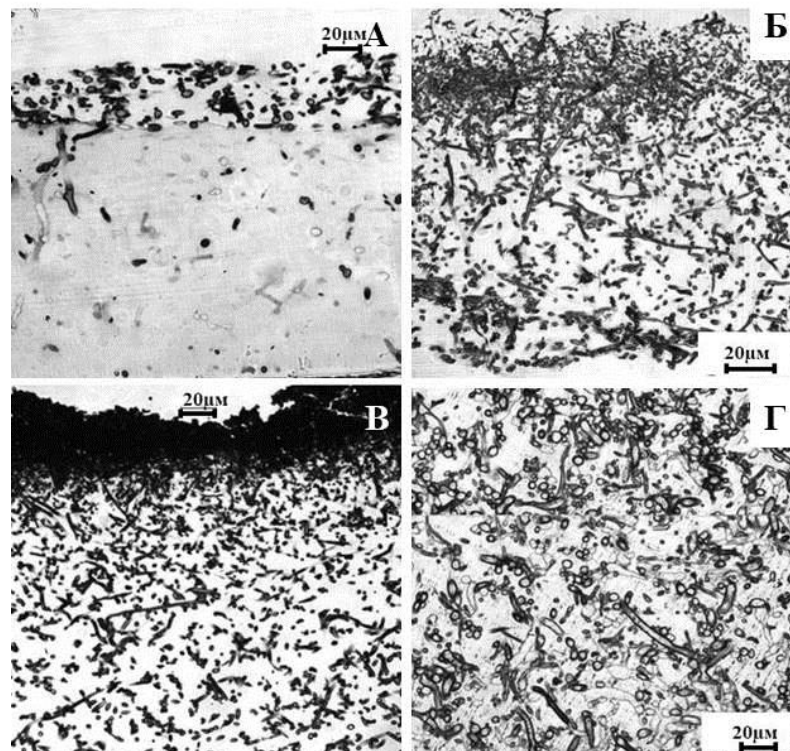


Рисунок 12 – Световая микроскопия полутонких срезов клеток мицелиальных пленок базидиомицетов *G. lucidum* (А), *L. edodes* (Б) и *G. frondosa* (В); масштабная линейка – 20 мкм (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2017024280>)

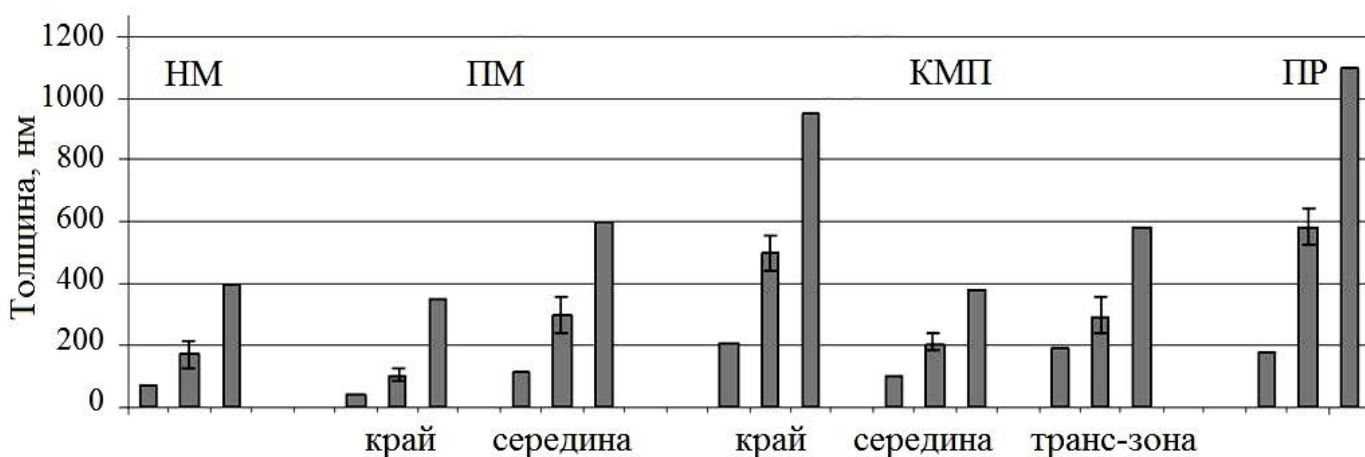


А – рыхлый непигментированный мицелий; Б – плотный непигментированный мицелий; В – коричневая мицелиальная пленка; Г – примордии; масштабная линейка – 20 мкм.

Рисунок 13 – Световая микроскопия полутонких срезов клеток *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6320-z>)

На поверхности мицелиальной пленки гифы имели диаметр 2.5 мкм и очень плотно прилегали друг к другу, образуя защитный сильно пигментированный слой толщиной 40–50 мкм. Внешний матрикс снаружи был более плотный, чем в примордиях (Рисунок 13В). Гифы примордиев были погружены в общий матрикс с рыхлой нитчатой структурой и имели наибольший среди всех вариантов диаметр (4–5 мкм) (Рисунок 13Г).

Ультраструктурная морфология клеточной стенки, которая является важным компартментом, определяющим направление морфогенеза базидиальных грибов, в зависимости от стадии развития макромицетов сильно различалась. По данным просвечивающей электронной микроскопии клетки рыхлого непигментированного мицелия имели толщину клеточной стенки в среднем 150 нм. Несмотря на то, что гифы, проникающие внутрь субстрата, имели гораздо меньшую плотность расположения, по сравнению со слоем клеток, находящихся на поверхности, диаметр клеток, как и толщина клеточной стенки, были одинаковы. При формировании мицелиальной пленки происходила существенная цитодифференцировка клеточной стенки, наблюдалось сильное утолщение, в 5–10 раз по сравнению с тонкостенными гифами непигментированного мицелия. По мере роста и уплотнения мицелия, происходила дальнейшая дифференцировка гиф и изменение ультраструктуры клеточных стенок. С наружной стороны гифы еще более уплотнялись и сжимались, наблюдалось много тонких гиф диаметром около 1 мкм, толщина клеточной стенки которых в среднем составляла 100 нм. Размер клеточной стенки гиф плотно прилегающих к субстрату и погруженных в общий матрикс, увеличивался и составлял порядка 300 нм, в отдельных случаях достигал 600 нм (Рисунок 14).

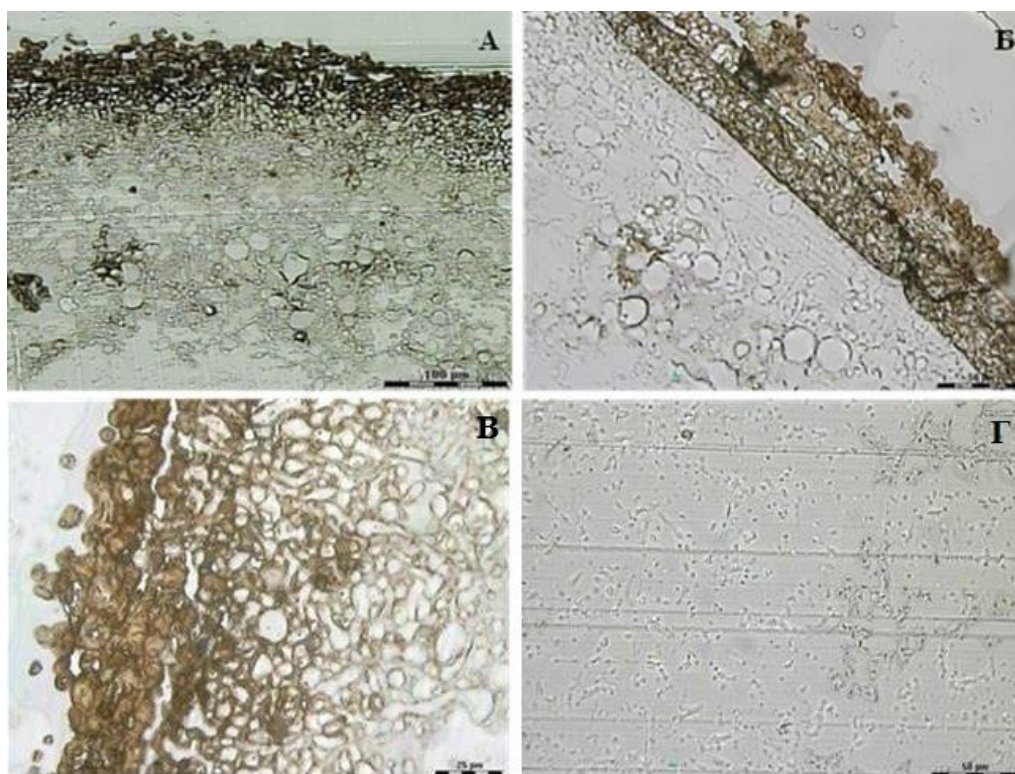


Расположение клеток в мицелиальной ткани: край (наружный), середина, транс-зона (прилегающая к субстрату); обозначения стадий морфогенеза: НМ – непигментированный мицелий, ПМ – плотный мицелий (начало пигментации), КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии.

Рисунок 14 – Толщина клеточной стенки мицелиальных гиф *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза

(Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6320-z>)

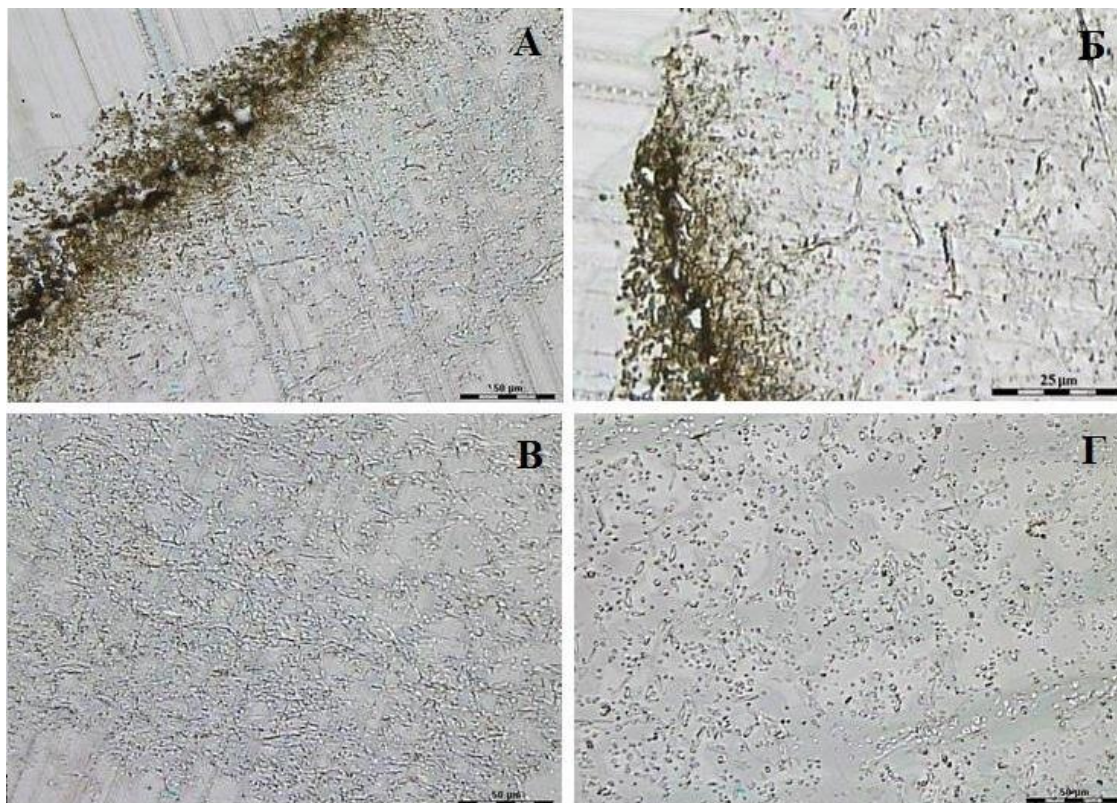
При сравнении гифальной организации на стадии мицелиальной пленки у разных базидиомицетов, можно заметить отличительные особенности. У трутовика лакированного мицелиальная пленка была неоднородна, состояла из нескольких слоев. Внешний слой был очень плотный сильно пигментированный, самый крайний ряд клеток выглядел мертвым. Под ним располагался слой более крупных, но также плотно переплетенных клеток. Далее находился слой крупных слабо меланизированных клеток, «ткань» была пронизана воздушными полостями (Рисунок 15А–В). Гифы непигментированного мицелия в сравнении с мицелиальной пленкой имели сильные различия: клетки непигментированные меньшего размера, расположение мицелиальных гиф было сильно разрежено (Рисунок 15Г).



А–В – мицелиальная пленка, Г – непигментированный мицелий;
масштабная линейка – 100, 50 и 25 мкм.

Рисунок 15 – Особенности гифальной организации на стадии образования мицелиальной пленки у *G. lucidum*
(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

Базидиомицет *L. edodes* формировал плотный сильно пигментированный слой толщиной около 50 мкм. Диаметр клеток коричневой мицелиальной пленки шиитаке сильно не отличался от размера клеток непигментированного мицелия, но клетки имели очень толстую клеточную стенку и очень плотно прилегали друг к другу (Рисунок 16А, Б). Непигментированный мицелий на поверхности субстрата был уплотненный (Рисунок 16В), а погруженный в субстрат мицелий, имел разреженное расположение (Рисунок 16Г).

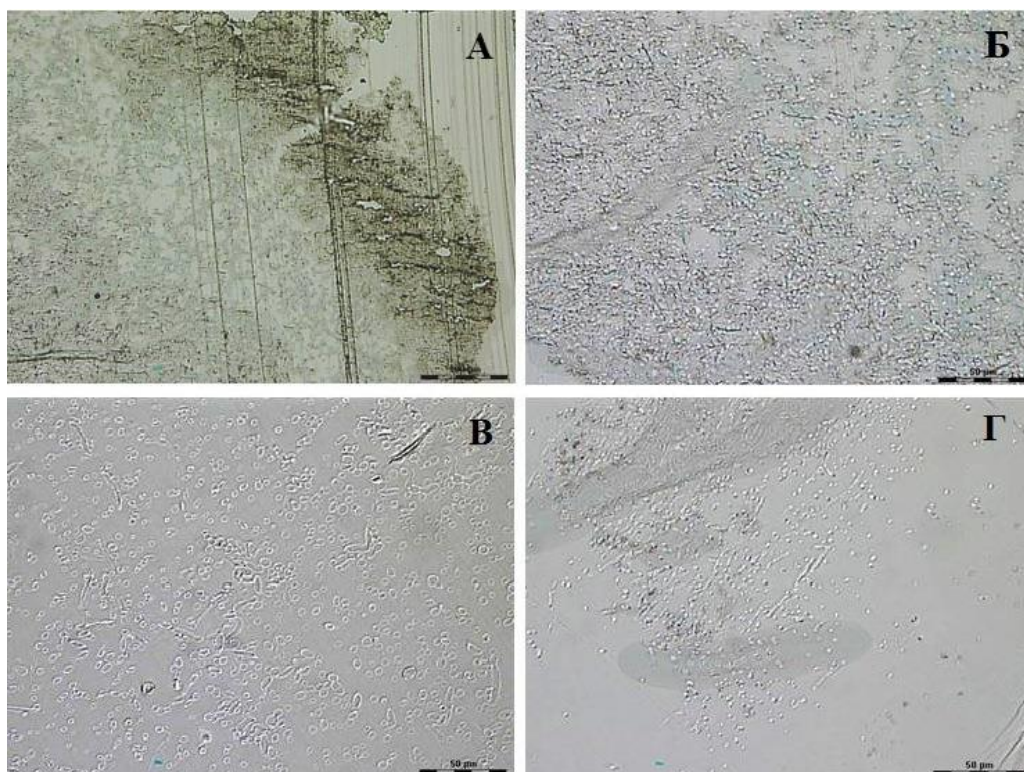


А, Б – коричневая мицелиальная пленка, В, Г – непигментированный мицелий; масштабная линейка – 100, 50 и 25 мкм.

Рисунок 16 – Особенности гифальной организации на стадии образования коричневой мицелиальной пленки у *L. edodes* (Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

Коричневая мицелиальная пленка базидиомицета *A. mellea*, также как и у трутовика лакированного, была неоднородна. Внешний слой был сильно пигментированный, очень плотный, состоящий из мелких толстостенных клеток (Рисунок 17А). Внутренний слой менее плотный, представленный клетками большего диаметра (Рисунок 17Б). Клетки ризоморф были организованы достаточно плотно и упорядочено, имели толстые стенки и больший диаметр, относительно всех морфоструктур опенка осеннего (Рисунок 17В). Непигментированный мицелий базидиомицета был представлен тонкостенными непигментированными клетками, неплотно расположенными относительно друг друга (Рисунок 17Г).

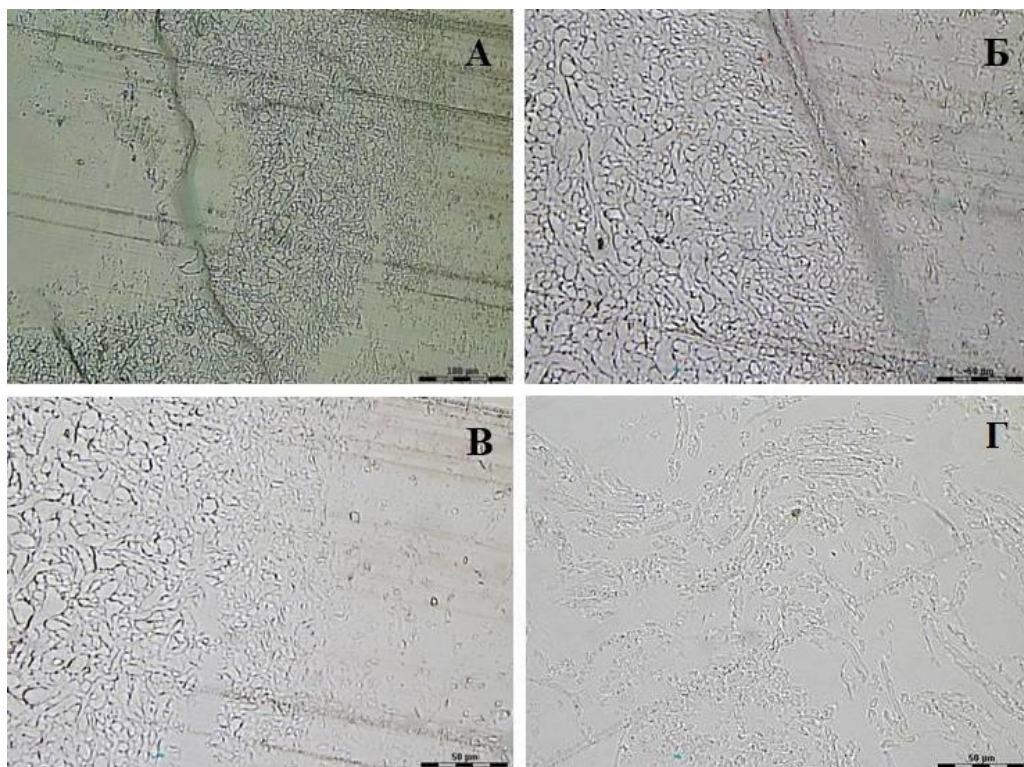
Особенности гифальной организации мицелиальной пленки базидиомицета *G. frondosa* заключались в однородности данного мицелиального образования, что не характерно для мицелиальных пленок предыдущих грибных культур. Наблюдалась конгломерация крупных, слабо пигментированных клеток, однородных по содержанию, плотно прилегающих друг к другу и погруженных в общий матрикс (Рисунок 18). Четко прослеживалось разграничение между мицелиальной пленкой и ниже расположенным мицелием (Рисунок 18А–В). Расположение непигментированного мицелия было разреженное, клетки более мелкие, с тонкими стенками (Рисунок 18Г).



А, Б – коричневая мицелиальная пленка, В – ризоморфы, Г – непигментированный мицелий;
масштабная линейка – 100 и 50 мкм.

Рисунок 17 – Особенности гифальной организации на стадии образования коричневой
мицелиальной пленки у *A. mellea*

(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)



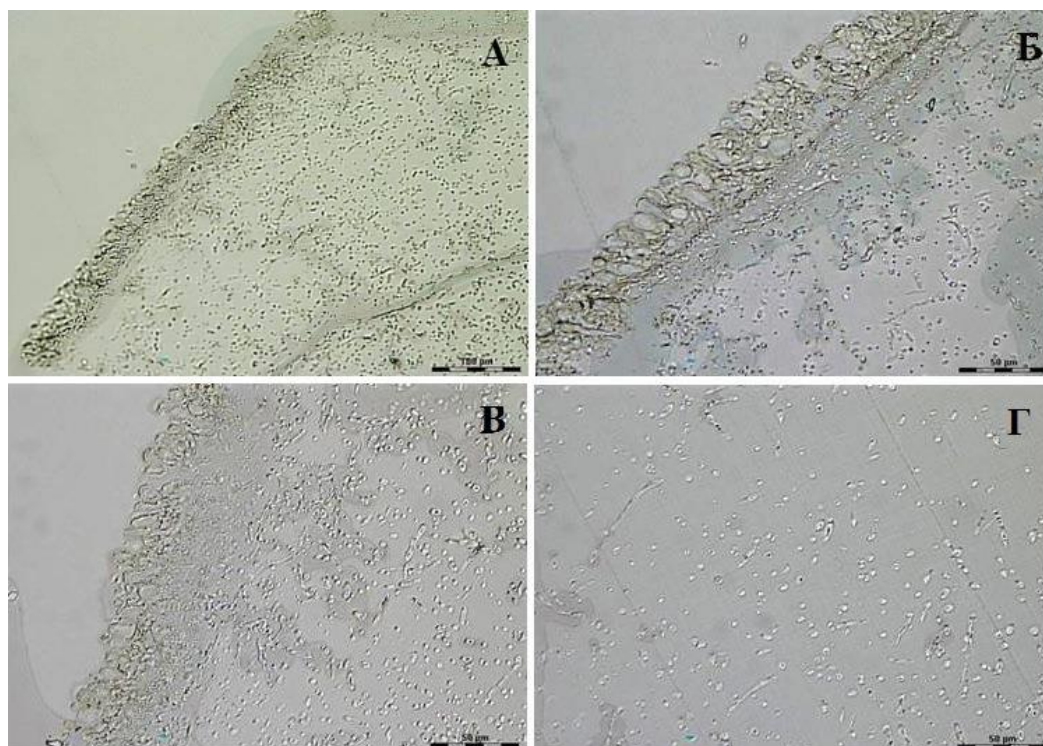
А–В –мицелиальная пленка, Г – непигментированный мицелий;
масштабная линейка – 100 и 50 мкм.

Рисунок 18 – Особенности гифальной организации на стадии образования мицелиальной
пленки у *G. frondosa*

(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

У ксилотрофного базидиомицета *P. ostreatus* мицелиальная пленка сильно отличалась от других макромицетов и была представлена плотным упорядоченным слабопигментированным слоем, состоящим из 3–4 рядов очень крупных толстостенных клеток (Рисунок 19А–В). Наблюдалось четкое разграничение между мицелиальной пленкой и расположенным ниже разреженным слоем мелких клеток непигментированного мицелия (Рисунок 19Б). Клетки непигментированного мицелия в субстрате располагались достаточно разреженно (Рисунок 19Г).

При сравнении данных, полученных методом световой микроскопии, наблюдались сильные изменения в гифальной организации у грибов на стадии мицелиальной пленки по сравнению с непигментированным мицелием. В качестве отличительной особенности, общей для всех культур, можно отметить усиление межклеточной спайки, грибные гифы очень плотно прилегали друг к другу, образуя многоклеточную структуру. С поверхности клетки были расположены намного плотнее, образуя слой переплетенных меланизированных гиф, имеющих больший диаметр относительно ниже расположенных. Можно отметить различия в строении мицелиальных пленок. У *A. mellea*, *L. edodes* и *G. lucidum* строение пленки было неоднородно, состояло из нескольких слоев, каждый из которых имел особенности в морфометрии клеток. У *P. ostreatus* и *G. frondosa* мицелиальные пленки состояли из нескольких рядов клеток однородного строения, менее пигментированных (особенно у *P. ostreatus*), по сравнению с другими культурами. Четко прослеживалось разграничение между пленкой и ниже расположенным



А–В – мицелиальная пленка, Г – непигментированный мицелий;
масштабная линейка – 100 и 50 мкм.

Рисунок 19 – Особенности гифальной организации на стадии образования мицелиальной пленки у базидиомицета *P. ostreatus*

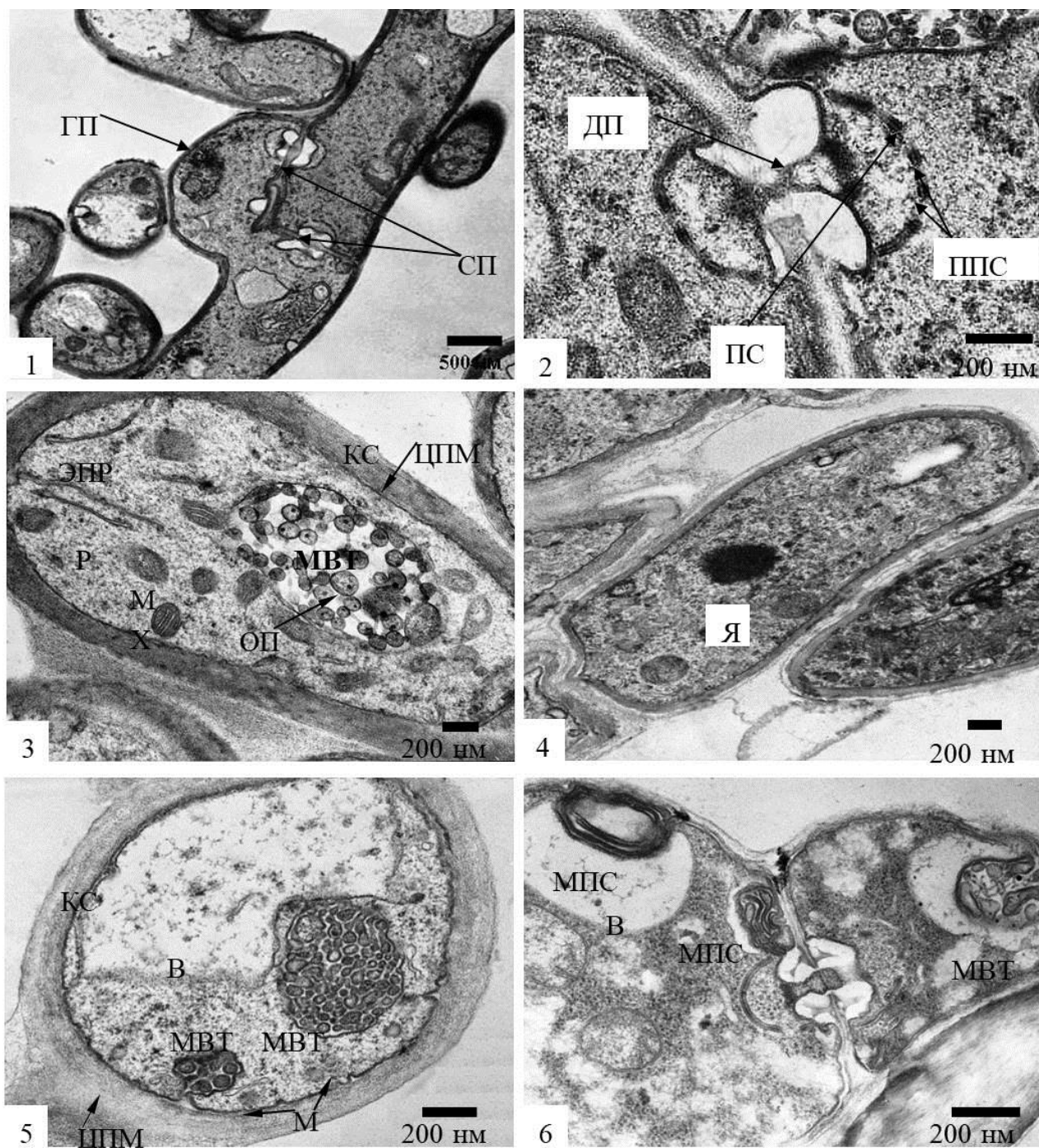
(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

мицелием. Гифы в субстрате, имели гораздо меньшую плотность расположения по сравнению с внешним мицелием. Видоизменения клеток, указывают на особенности цитодифференцировки мицелия у разных базидиомицетов, приспособление гиф к условиям культивирования и при формировании морфогенных структур.

5.2.2 Исследование ультраструктурного строения клеток на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов методом ПЭМ

Существенные изменения происходили и в ультраструктуре клеток, особенно это касалось клеточной стенки базидиомицетов. На микрофотографиях ультратонких срезов были видны септированные гифы, хорошо просматривались долипоры и парентосомы с множественными отверстиями. Долипорные септы, характерны для базидиомицетов и впервые описаны Муром и МакАлеаром (Moore and McAlear, 1962). Септы также состоят из типично толстых клеточных стенок, ограниченных плазматической мембраной (Roberson *et al.*, 2010). Наблюдалось большое количество одиночных пряжек – каналов, в дополнение к септовому аппарату, для передачи цитоплазматического материала при делении клеток у многих базидиальных грибов (Рисунки 20.1 и 20.2). В клетках непигментированного мицелия была четко видна цитоплазматическая мембрана толстая, волнистая, что может быть связано с интенсивной секрецией. К ней примыкает клеточная стенка, состоящая из хитина (структурного полимера β -1,4-N-ацетилглюкозамина), глюканов (в основном разветвленных β -1,3-глюканов) и белков, которые тесно перекрестно связаны друг с другом, образуя сложную сеть, представляющую структурную основу клеточной стенки (Bowman and Free, 2006; Gow *et al.*, 2017) (Рисунок 20.3). Меланин также присутствует в структуре клеточной стенки (Garcia-Rubio *et al.*, 2020). Клетки богатые цитоплазмой, имели одну или несколько мелких вакуолей, прозрачных или с фибриллярным содержимым. Хондриом очень хорошо развит, митохондрии разветвленные, ортодоксального типа, вытянуты вдоль гифы. В цитоплазме присутствует много свободных рибосом. Эндоплазматический ретикулум в основном гладкий, хорошо развитый, иногда его цистерны были расширены. Мембраны эндоплазматического ретикулума, как правило, выровнены вдоль продольной оси гиф и особенно присутствуют в субапикальной области, где синтез белка очень интенсивен, и необходим как для образования структурных белков, создания стенок гиф, так и для деградации субстратов в окружающей среде (Faoro *et al.*, 2022). Секреторные везикулы многочисленны, морфологически разнородны, имеют прозрачное или сероватое однородное содержимое, мембрана тонкая (Рисунок 20.3). Ядра, окруженные двухслойной мембранной оболочкой, как в гифах непигментированного мицелия, так и в клетках других стадий развития, имели классическую структуру, и, как правило, округлую или вытянутую форму (Рисунок 20.4). Вакуолярная система хорошо выражена, вакуоли образуются в результате локального расширения мембран гладкого эндоплазматического ретикулума. В

более старых областях гиф вакуоли обычно сливались в более крупную, занимающую почти весь объем клетки (Рисунок 20.5). Помимо хранения и переработки клеточных метаболитов, грибные вакуоли способствуют удлинению клеток, продвигая протоплазму к кончику гифы (Faoro *et al.*, 2022).



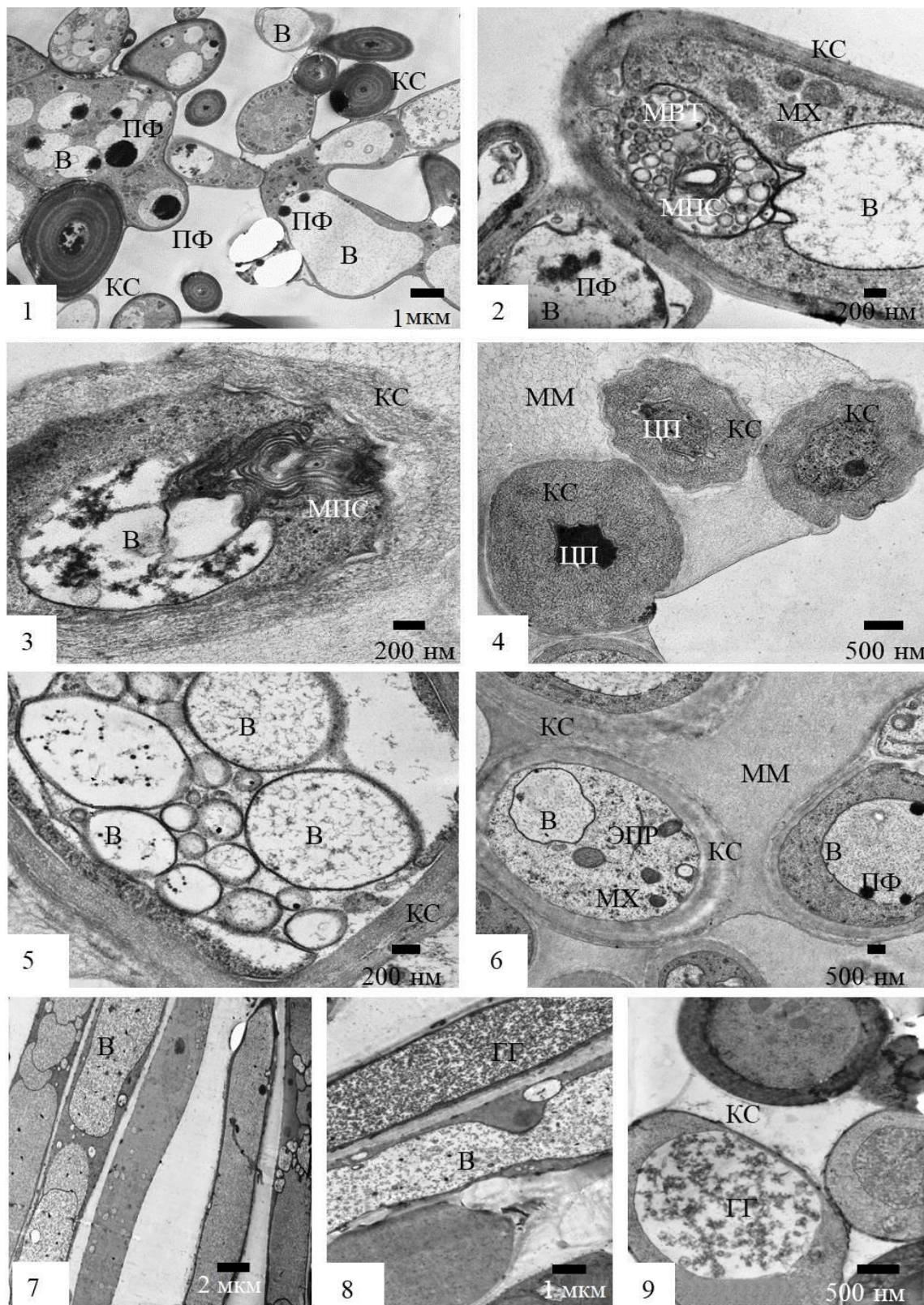
Ультраструктура клеток на стадии непигментированного мицелия: гифальная пряжка (ГП), септа (СП), долипора (ДП), парентосома (ПС), пора парентосомы (ППС), клеточная стенка (КС), цитоплазматическая мембрана (ЦПМ), митохондрия (МХ), рибосомы (Р), эндоплазматический ретикулум (ЭПР), окаймленные пузырьки (ОП), ядро (Я), мультивизукулярные тела (МВТ), мембрана (М), вакуоль (В), миелиноподобные структуры (МПС). Масштаб: 500 и 200 нм.

Рисунок 20 – ПЭМ продольных и поперечных срезов клеток непигментированного мицелия *L. edodes* (1, 3, 5), *G. frondosa* (2, 4) и *G. lucidum* (6)
(Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6320-z>)

Мультивезикулярные тела присутствовали во всех клетках, они представляли собой скопление везикул, окруженных мембраной с локализацией в цитозоле, а не вблизи клеточной стенки (Рисунок 20.5). Средний размер внутренних везикул варьирует от 50 до 200 нм, они имеют близкую к сферической форму, в основном плотно прилегают друг к другу и содержат гранулярный материал. У грибов мультивезикулярные тела могут использоваться как крупные транспортные компартменты. Возможен их межклеточный транспорт через септальные поры на большие дистанции внутри гиф, например из одного участка грибной колонии к другой, а также мультивезикулярные тела могут принимать участие в секреции, выступая в роли экзосомы (Комзолкина и др., 2014). В клетках часто встречались «мотки» мембран – миелиноподобные структуры или мультимембранный комплекс (Zacchi *et al.*, 2000) (Рисунок 20.6). Данные образования чаще всего представляют собой концентрические внутриклеточные мембранные структуры, не связанные с плазмалеммой (Комзолкина и др., 2014). Предполагают, что данные органеллы являются результатом реорганизации предсуществующих мембранных структур или клеточных включений (Curgu, 1968). Ультраструктура клеток в целом мало различалась в зависимости от местоположения. Митохондрии располагались большими группами, было отмечено много полисом. Вакуоли были разного размера с фибриллярным содержимым. Клетки края были более вакуолизированы, присутствовали мультивезикулярные тела. В нижней части гифы имели признаки интенсивной секреции, отмечено много секреторных везикул, наблюдалось их слияние с плазмалеммой (Рисунок 20.1 – 20.6).

В отличие от непигментированного мицелия клетки на стадии мицелиальной пленки имели сильно утолщенную клеточную стенку (Рисунок 21.1). Также, характерно большое количество вакуолей, часть из которых автолитические. В вакуолях часто наблюдались включения полифосфатных гранул (Рисунки 21.1 и 21.2). Ультраструктура и распределение полифосфатов у гриба *Gigaspora margarita* были описаны в работе Куга с соавторами (2008). Вакуоли являются преобладающими органеллами, занимающими большую часть объема клетки и, следовательно, обладают потенциалом для хранения фосфора (Kuga *et al.*, 2008). По сравнению с другими стадиями в клетках содержалось меньше рибосом и шероховатого эндоплазматического ретикулума. В большом количестве присутствовали разнообразные мультивезикулярные и миелиноподобные структуры (Рисунки 21.2 и 21.3).

Гифы примордиев были погружены в общий матрикс с рыхлой нитчатой структурой и имели самый большой диаметр клеток от 4 до 5 мкм. Клеточная стенка очень толстая, достигала 1 мкм и имела характерную «пеструю» текстуру, но были и тонкостенные гифы. В клетках с очень толстой многослойной клеточной стенкой наблюдалось уплотнение цитоплазмы, люмен на срезе приобретал «звездчатую» форму, так как клетки уже мертвые и не имеют тургора, данные гифы, по всей видимости, выполняют опорную (скелетную) функцию (Рисунок 21.4). Клетки были не однородны и различались в основном по степени вакуолизации



Ультраструктура гиф на разных стадиях морфогенеза: 1, 2, 3 – мицелиальная пленка, 4, 5, 6 – примордии, 7, 8 – плодовое тело (ножка), 9 – плодовое тело (шляпка). Клеточная стенка (КС), вакуоль (В), гранулы полифосфата (ПФ), митохондрия (МХ), мультивизукулярные тела (МБТ), миелиноподобные структуры (МПС), межклеточный матрикс (ММ), цитоплазма (ЦП), гликоген (ГГ). Масштаб: 200, 500 нм; 1, 2 мкм.

Рисунок 21 – ПЭМ продольных и поперечных срезов мицелиальных гиф на разных стадиях морфогенеза *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6320-z>)

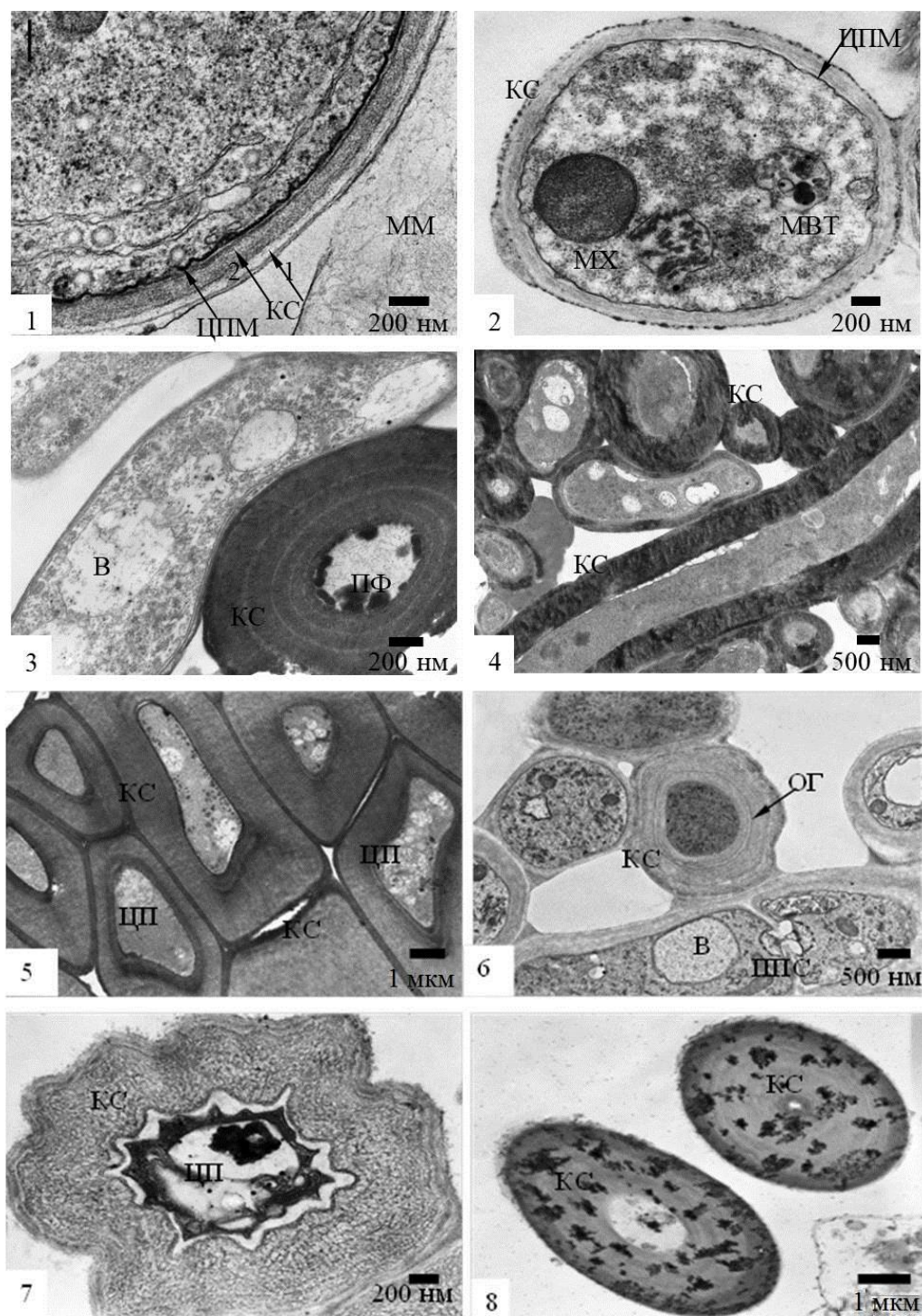
и плотности цитоплазмы. В гифах присутствовали вакуоли разного размера с фибриллярным содержимым (Рисунок 21.5). В ряде случаев происходило образование крупных вакуолей, иногда диаметром 80 нм, и везикул, вминающихся друг в друга, с черными плотными включениями – полифосфатными гранулами (Рисунок 21.6). Митохондрии были ортодоксального типа. Эндоплазматический ретикулум в основном шероховатый, в отличие от непигментированного мицелия, но был и гладкий, были различимы многочисленные полисомы, видны продольно лежащие микротрубочки. В отличие от мицелия других стадий развития базидиомицетов секреторные везикулы встречались редко, окаймленные везикулы отсутствовали (Рисунок 21.6).

В плодовых телах базидиомицетов была хорошо выражена вакуолярная система, часто вакуолей в клетке обнаруживалось несколько, они вминались друг в друга и заполняли почти все клеточное пространство, наблюдались включения полифосфатных гранул (Рисунок 21.7). Цитоплазма некоторых клеток предположительно была забита гликогеном (Рисунок 21.8, 21.9). Типичным включением, наблюдаемым в цитоплазме мицелиальных грибов, является наличие гликогеновых агрегатов, являющихся формой хранения энергии (Faoro *et al.*, 2022). Встречались «опорные» гифы с очень толстой клеточной стенкой, а также сильно пигментированные клетки (Рисунок 21.9). По-видимому, в плодовых телах хорошо развита специализация клеток и определенных клеточных фрагментов.

5.2.3 Исследование ультраструктуры клеточной стенки гиф на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов методом ПЭМ

Ключевая роль в морфообразовании макромицетов принадлежит клеточной стенке – сложной, биохимически и морфологически динамичной структуре, изменение состава и строения которой приводит к цитодифференцировке, отвечающей определенному функциональному значению: вегетативному росту, освоению пространства; способности защищать от неблагоприятных условий окружающей среды и патогенов, образовывать морфоструктуры и базидиомы. Клеточная стенка гриба – это динамическая структура, которая защищает клетки от изменений осмотического давления и других стрессов окружающей среды, одновременно позволяя взаимодействовать с окружающей средой и другими организмами (Garcia-Rubio *et al.*, 2020). Помимо поддержания формы и целостности клетки при стрессе в окружающей среде, она играет роль сигнального центра, активируя пути передачи сигнала внутри грибных клеток и опосредуя взаимодействие с внешней средой через рецепторы, вызывающие сложный каскад сигналов внутри клетки (Bowman and Free, 2006).

На микрофотографиях видна цитоплазматическая мембрана к которой примыкает двухслойная клеточная стенка, состоящая из внутреннего электронно-плотного слоя, имеющего фибриллярное строение (фибриллы хитина, погруженные в β -глюкановый матрикс), и внешнего



Клетка НМ *L. edodes* с тонкостенной (КС) клеточной стенкой (1); клетка ПМ *G. frondosa* с утолщенной КС (2); «опорная» гифа КМП *G. lucidum* с очень толстой меланизированной КС (3); сильно меланизированные КС КМП *L. edodes* (4); толстостенные спрессованные гифы КМП *G. lucidum* (5); толстостенная опорная гифа ПР *L. edodes* (6); «звёздчатая» клетка ПР *L. edodes* (7); клетки плодового тела *L. edodes* с очень толстой пигментированной КС (8).

Клеточная стенка (КС): 1 – наружный электрон-прозрачный слой, 2 – внутренний электрон-плотный слой; цитоплазматическая мембрана (ЦПМ), межклеточный матрикс (ММ), мультивизукулярные тела (МВТ), вакуоль (В), цитоплазма (ЦП), гранулы полифосфата (ПФ), «опорные» гифы (ОГ), пора парентосомы (ППС). Масштаб: 200, 500 нм; 1 мкм.

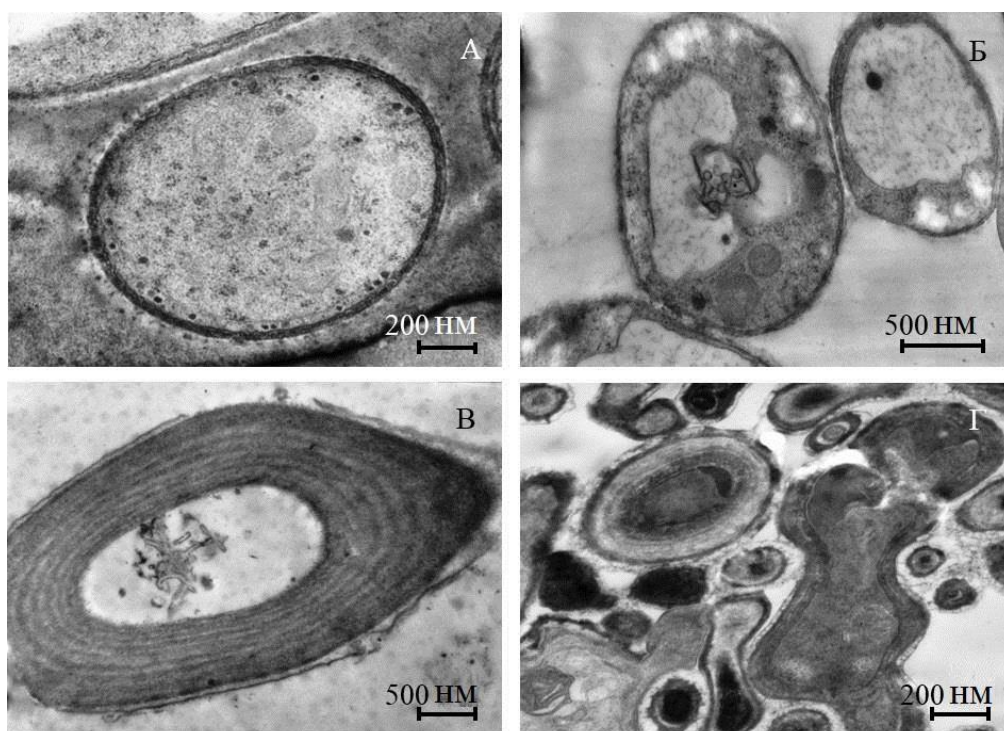
Рисунок 22 – Изменение ультраструктуры клеточной стенки базидиомицетов в зависимости от стадии морфогенеза

(Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6320-z>)

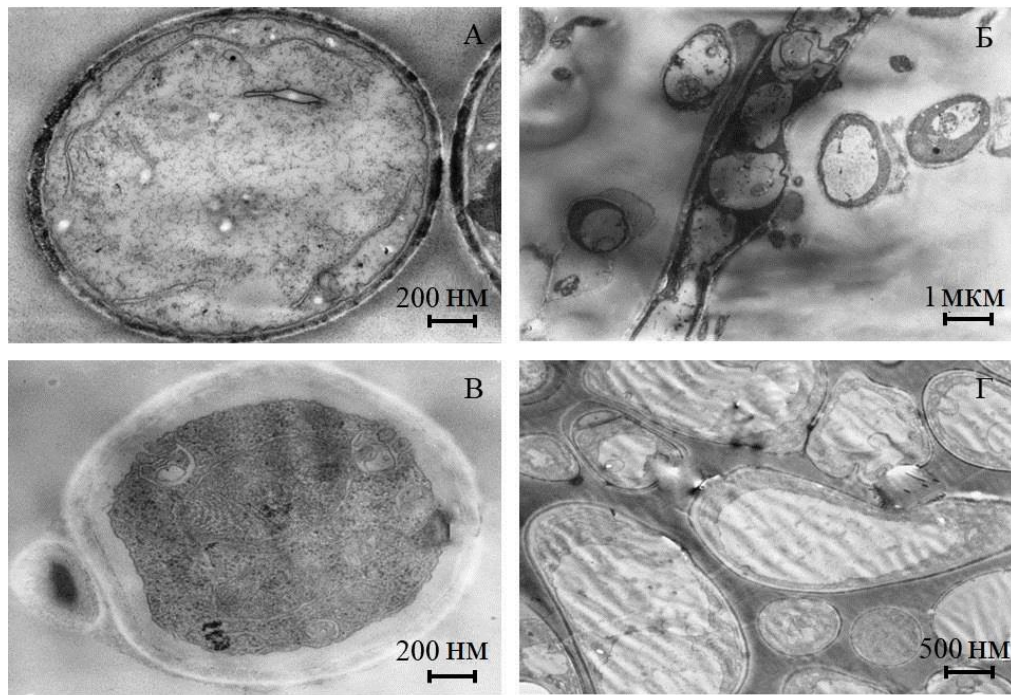
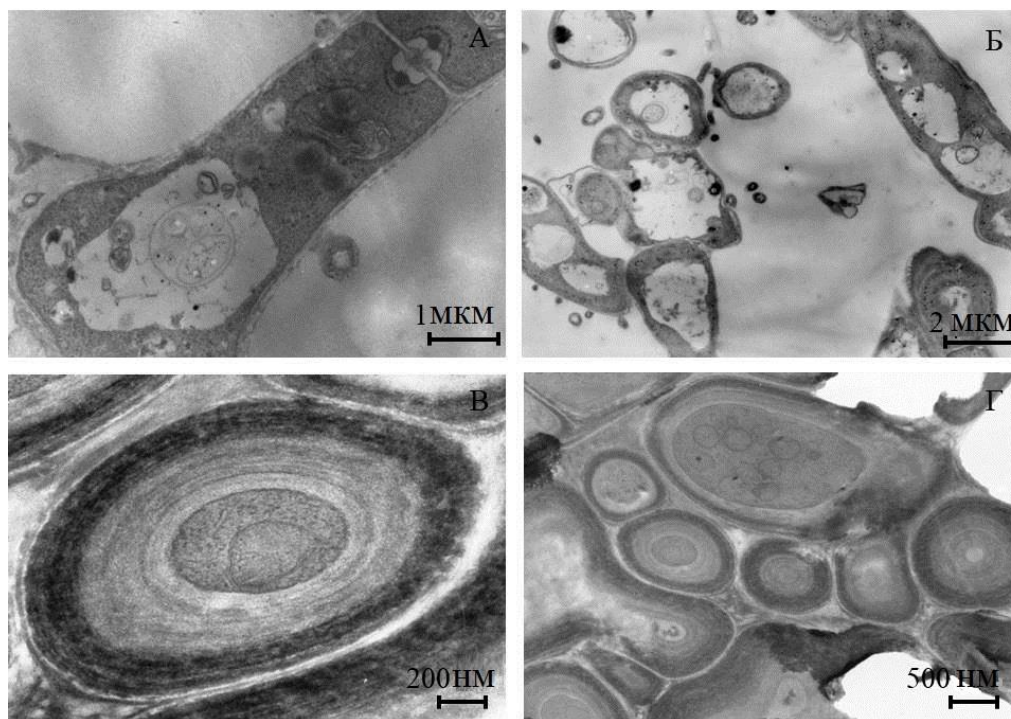
электронно-прозрачного слоя, состоящего из глюкана (Рисунки 22.1 и 22.2).

У коричневой мицелиальной пленки происходила еще большая цитодифференцировка мицелиальных гиф и ультраструктура клеточной стенки сильно различалась в зависимости от местоположения клеток (Рисунок 22.3). В отличие от тонкостенных гиф предыдущей стадии развития, происходило сильное утолщение клеточной стенки наружного слоя мицелия от 450 до 950 нм. Кроме того гифы были сильно меланизированы и очень плотно прилегали друг к другу, образуя непроницаемый каркас толщиной порядка 50 мкм (Рисунки 22.4 и 22.5). По мере уплотнения «ткани» мицелия у макромицетов появлялось большое количество пигментированных гиф с толстой стенкой, у *G. lucidum* их значительно больше, чем у *L. edodes* и *G. frondosa*, кроме того клеточная стенка последних была менее толстая (Рисунки 22.3–22.5). Слой клеток расположенных в средней части ткани, был менее плотный, толщина клеточной стенки в среднем достигала 200 нм. Плотность клеток прилегающих к субстрату, так же как и толщина их клеточных стенок, была сопоставимы с предыдущей стадией развития, плотным непигментированным мицелием и составляла 280–570 нм (Рисунок 22.2).

В примордиях стенки клеток имели наибольшую среди всех вариантов толщину, в среднем 600 нм, в отдельных случаях толщина достигала 2 мкм и имела характерную «пеструю» текстуру, были и тонкостенные гифы (Рисунок 22.6). В клетках с очень толстой клеточной стенкой наблюдалось уплотнение цитоплазмы, люмен на срезе приобретал «звездчатую» форму (мертвые, не имеющие тургора клетки) (Рисунок 22.7). На этой стадии морфогенеза, в отличие от вышеописанных, «опорных» гиф было очень много, что позволяет макромицетам поддерживать форму образующихся базидиом. В плодовых телах также часто встречались «опорные» (скелетные) гифы с очень толстой сильно пигментированной клеточной стенкой (Рисунок 22.8).



G. lucidum

*G. frondosa**L. edodes*

А, Б – непигментированный мицелий, В, Г – мицелиальная пленка; масштаб: 200, 500 нм; 1, 2 мкм.

Рисунок 23 – Ультраструктура гиф базидиомицетов *G. lucidum*, *G. frondosa* и *L. edodes* на стадии непигментированного мицелия и мицелиальной пленки
(Vetchinkina E. // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

На стадии мицелиальной пленки (Рисунок 23В, Г), в сравнении с непигментированным мицелием макромицетов (Рисунок 23А, Б), происходила существенная ультраструктурная перестройка клеток. На микрофотографиях ультратонких срезов видно, что клетки мицелиальной пленки имеют сильно утолщенную клеточную стенку, которая может достигать 1–2 мкм, четко видна цитоплазматическая мембрана, к которой примыкает двухслойная клеточная стенка. Мицелиальные гифы приобретали сильную пигментацию и очень плотно прилегали друг к другу, были погружены в глюкановый матрикс, усиливалась межклеточная спайка, образуя многоклеточную структуру. В клетках с очень толстой клеточной стенкой наблюдалось уплотнение цитоплазмы (Рисунок 23).

Проведенные электронно-микроскопические исследования показали, что по мере разрастания, освоения субстрата и смены стадий морфогенеза гифы базидиомицетов претерпевают заметные изменения, происходят ультраструктурные перестройки внутри клеток и цитодифференцировка грибного мицелия. Значительные изменения наблюдались в строении клеточной стенки, которая является важной системой, определяющей направление морфогенетического развития базидиальных макромицетов.

5.3 Характеристика содержания белков и углеводов в клетках базидиальных макромицетов на разных стадиях морфогенеза

Было исследовано соотношение общего содержания белков и углеводов в грибных клетках на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов (Таблица 5). В клетках непигментированного мицелия у макромицетов *P. ostreatus*, *A. mellea* и *G. frondosa* общее содержание углеводов было в 5–6 раз выше чем содержание белка, у трутовика *G. lucidum* в 2 раза выше, а у *L. edodes*, напротив, концентрация белка была выше в 3 раза по сравнению с углеводами (Рисунок 24). Для культуры шиитаке ситуация менялась по мере пигментирования и уплотнения мицелия, на стадии пигментированного мицелия содержание углеводов уже в 2 раза превышало содержание белка и в 7 раз на стадии коричневой мицелиальной пленки. У *P. ostreatus* в уплотненном мицелии как и на предыдущей стадии соотношение углеводов/белок было 1/5, но в мицелиальной пленке концентрация как белка (в 6.5 раз), так и углеводов (в 17 раз) резко снижалась и выравнивалась, составляя 1/2. Для культур *A. mellea* и *G. frondosa* наблюдалась несколько иная картина, на стадии пигментированной мицелиальной пленки значительно возрастало содержание углеводов по отношению к другим стадиям морфогенеза, у грифолы курчавой в 6 раз, а у опенка осеннего в 74 раза. У культуры *G. lucidum* в непигментированном мицелии содержание углеводов было в 2 раза выше, в пигментированной мицелиальной пленки в 3.5 раза, а в плодовых телах соотношение белок/углевод практически выравнивалось (Рисунок 24).

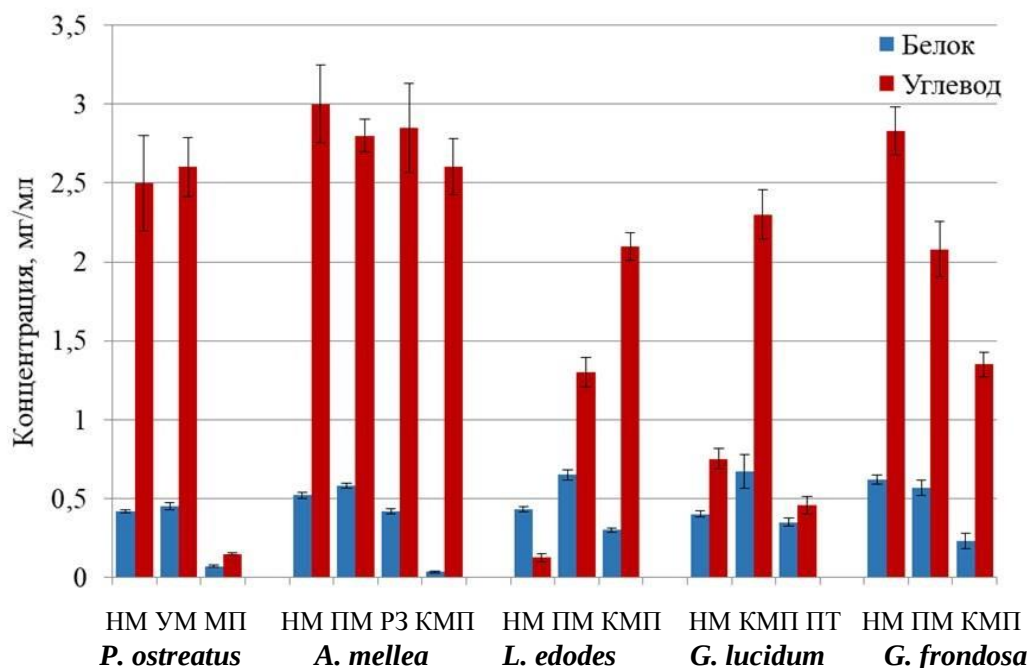
Таблица 5 – Общее содержание белков и углеводов у ксилотрофных базидиомицетов *P. ostreatus*, *A. mellea*, *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa* на разных стадиях морфогенеза

Базидиомицеты	Стадия морфогенеза	Белок, мг/мл	Углевод, мг/мл
<i>P. ostreatus</i>	НМ	0.42 ± 0.010	2.5 ± 0.301
	УМ	0.45 ± 0.024	2.6 ± 0.189
	МП	0.07 ± 0.007	0.15 ± 0.004
<i>A. mellea</i>	НМ	0.52 ± 0.020	3 ± 0.248
	ПМ	0.58 ± 0.018	2.8 ± 0.105
	РЗ	0.42 ± 0.018	2.85 ± 0.284
	КМП	0.035 ± 0.005	2.6 ± 0.178
<i>L. edodes</i>	НМ	0.43 ± 0.017	0.125 ± 0.024
	ПМ	0.65 ± 0.032	1.3 ± 0.093
	КМП	0.3 ± 0.011	2.1 ± 0.088
<i>G. lucidum</i>	НМ	0.4 ± 0.019	0.75 ± 0.065
	КМП	0.67 ± 0.107	2.3 ± 0.154
	ПТ	0.35 ± 0.026	0.458 ± 0.056
<i>G. frondosa</i>	НМ	0.62 ± 0.031	2.83 ± 0.154
	ПМ	0.57 ± 0.048	2.08 ± 0.176
	КМП	0.23 ± 0.049	1.35 ± 0.079

Примечание: НМ – непигментированный мицелий, УМ – уплотненный мицелий, РЗ – ризоморфы, ПМ – пигментированный мицелий, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПТ – плодовое тело.

(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

Таким образом, соотношение общего содержания белков и углеводов в грибных клетках на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов значительно менялось. Общее содержание углеводов в мицелиальных пленках увеличивалось и превосходило общее содержание белка в 2–8 раза в зависимости от вида грибной культуры. Значительное снижение концентрации белка и углеводов в мицелиальной пленке *P. ostreatus*, делает данную морфоструктуру практически неактивной, представляющей собой пленчатое образование с функцией защиты мицелия от пересыхания. Резкое повышение содержания углеводов в мицелиальной пленке других базидиомицетов согласуется с результатами микроскопии, которые показывают утолщение в 10 раз клеточной стенки мицелиальных гиф, состоящей из фибрилл хитина и β -глюкана. Относительно большое содержание белка, (кроме *A. mellea*, мицелиальная пленка которой очень плотная, ломкая, содержащая минимум белковых соединений), позволяет предполагать в клетках данных морфоструктур активную деятельность, связанную с сигнальными и коммуникативными процессами, везикулярным транспортом, межклеточными контактами, запасом питательных веществ. Эти данные свидетельствуют в пользу не только протекторной, но и сенсорно-регуляторной функции мицелиальной пленки базидиальных макромицетов.



НМ – непигментированный мицелий, УМ – уплотненный мицелий, РЗ – ризоморфы, ПМ – пигментированный мицелий, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПТ – плодовое тело.

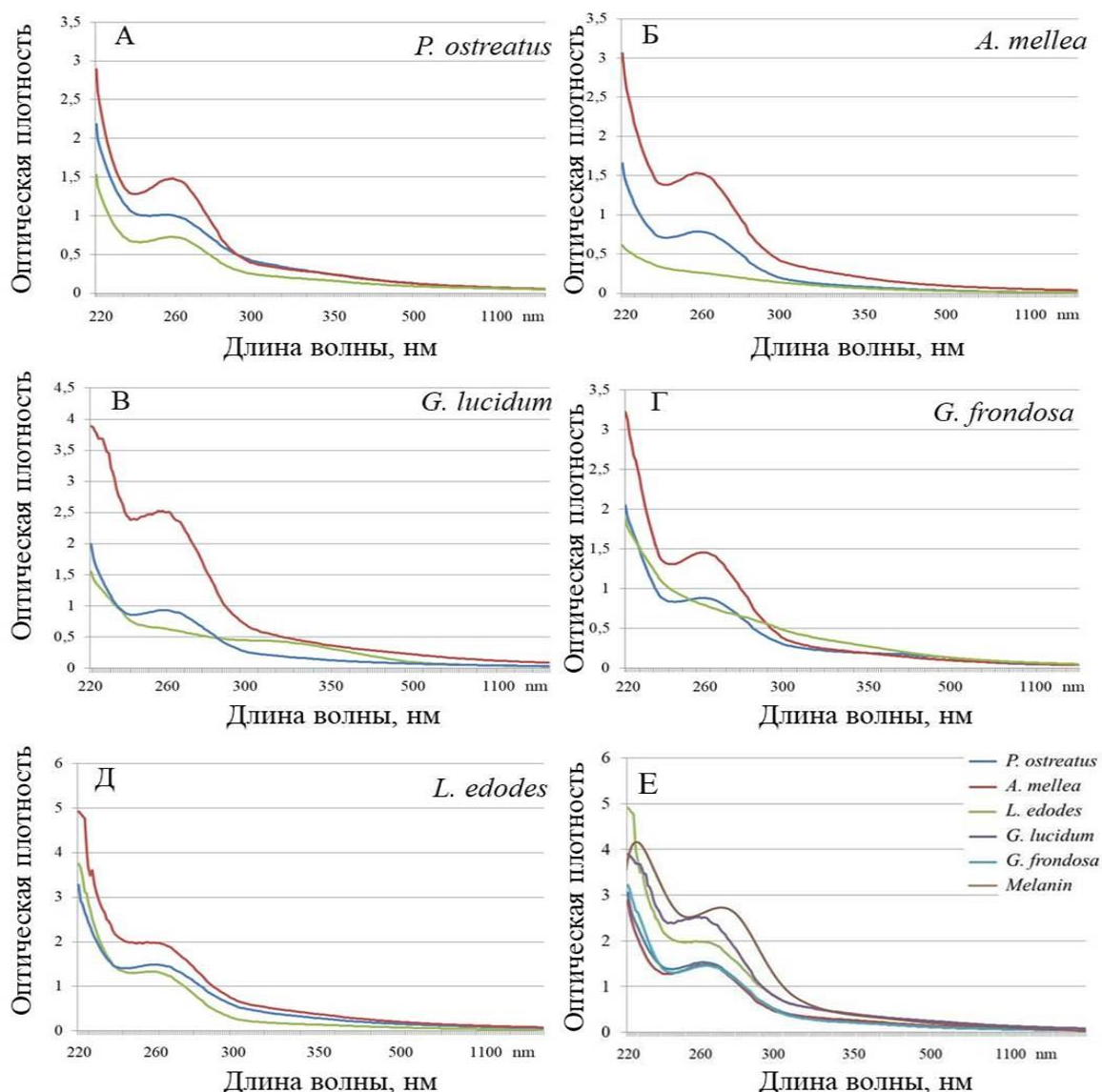
Рисунок 24 – Соотношение общего содержания белков и углеводов у ксилотрофных базидиомицетов в зависимости от стадии морфогенеза

5.4 Характеристика содержания пигментов (меланинов) в клетках базидиальных макромицетов на разных стадиях морфогенеза

Клетки мицелиальных пленок, как правило, сильно пигментированные, было отмечено значительное повышение содержание пигментов в данных морфоструктурах, кроме *P. ostreatus*, по сравнению с вегетативным непигментированным мицелием. Спектрофотометрическое исследование в широком диапазоне показало, что максимум поглощения пигментов соответствовал 260 нм. Наиболее интенсивные пики поглощения наблюдались в экстрактах коричневой мицелиальной пленки базидиомицетов, минимальные в экстрактах непигментированного мицелия (Рисунок 25 А–Д). Содержание пигмента в клетках коричневой мицелиальной пленки *L. edodes* и *G. lucidum* было наибольшим по сравнению с другими базидиомицетами (Рисунок 25Е).

Качественные реакции показали, что водные растворы пигментов из ксилотрофных базидиомицетов обесцвечивались добавлением H_2O_2 , а в присутствии $KMnO_4$ изменяли окраску с коричневой на зеленую с последующим выпадением осадка. Добавление $FeCl_3$ приводило к выпадению осадка, который растворялся в присутствии избытка $FeCl_3$. Такое поведение исследуемых пигментов характерно для меланинов, высокомолекулярных полимеров нерегулярной структуры фенольной и (или) индольной природы, и свидетельствует о присутствии в их структуре хиноидных и фенольных компонентов (Fogarty and Tobin, 1996;

Harki *et al.*, 1997). По химическому строению они подразделяются на три класса: эу-, фео- и алломеланины. При этом грибы содержат преимущественно эумеланины и алломеланины (Liakh, 1981; Du *et al.*, 2023).



■ непигментированный мицелий, ■ пигментированный мицелий, ■ пигментированная мицелиальная пленка (А–Д); Е – спектры поглощения меланинов на стадии пигментированной мицелиальной пленки базидиомицетов и стандарт меланина (Melanin).

Рисунок 25 – Спектры поглощения меланинов на разных стадиях морфогенеза базидиальных макромицетов *P. ostreatus*, *A. mellea*, *G. lucidum*, *G. frondosa* и *L. edodes* (Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

Пигменты располагались либо в виде отдельных гранул на внешней поверхности гиф, либо внутри клеточной стенки грибов, образуя комплекс с хитином. Считается, что образование пигмента меланина необходимо для обеспечения резистентности к ультрафиолету и излучению видимого света. Но также, пигмент выступает в качестве связующих элементов, усиливающих межклеточную спайку, при сшивке компонентов клеточных стенок мицелиальных гиф и при

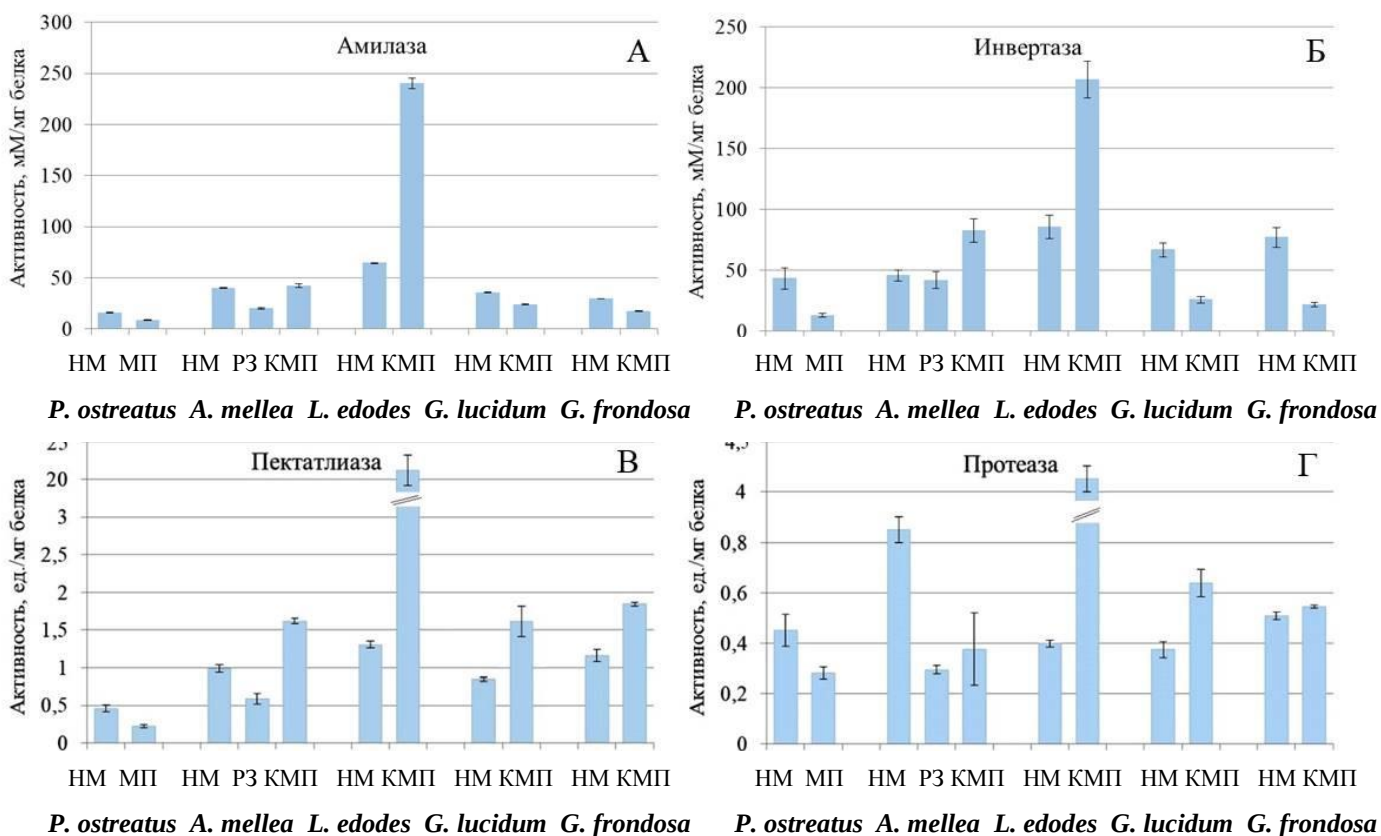
образовании базидиом (Leatham and Stahmann, 1981). Присутствие данного пигмента также оказывает сильное влияние на устойчивость хитин-глюкан-меланинового комплекса, в результате чего возникает наружный барьер, обладающий большой устойчивостью к действию хитиназы и 1,3- β -глюканазы патогенных организмов (Whitaker, 1995; Van Gelder *et al.*, 1997; Feofilova, 2002).

5.5 Сравнительный анализ активности ключевых ферментных систем в мицелиальных пленках *A. mellea*, *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa* с оценкой предполагаемых функций в онтогенезе базидиомицетов

В подтверждение активного метаболизма коричневой мицелиальной пленки, было проведено исследование по сравнению динамики активности в процессе онтогенеза ряда ферментов: лиаз (пектатлиаз), гидролаз (пептидаз), в том числе гликозил-гидролаз (амилаз, инвертаз, хитиназ, ксиланаз, целлюлаз (эндоглюканаз, целлобиогидролаз) и α -, β -глюкозидазы, α -, β -галактозидаза), а также оксидоредуктаз (лакказ, тирозиназ, лигнин пероксидаз, Mn-пероксидаз), входящих в состав целлюлолитического, лигнинолитического комплексов ксилотрофных грибов, а также участвующих в биогенезе клеточной стенки базидиомицетов.

Динамика активности ферментов амилаз, инвертаз, протеаз и пектатлиаз в непигментированном мицелии и мицелиальной пленке базидиомицетов

Было установлено, что наибольшую активность ферменты амилазы и инвертазы, необходимые грибам для расщепления поли- и олигосахаридов до легкоусвояемых мономеров и обеспечивающие клетку питательными веществами, проявляли на стадии непигментированного вегетативного мицелия, во время активного роста, пролиферации клеток, освоения субстрата, наращивания биомассы (Рисунок 26А, Б). Фермент инвертаза катализирует гидролиз сахарозы, расщепляя О-С связь, до фруктозы и глюкозы. Фермент амилаза расщепляет крахмал (α -1,4-гликозидную связь) до олигосахаридов. Для бактерий, грибов и растений характерна β -амилаза, которая отсутствует у животных, хотя α -амилаза, являющаяся основным пищеварительным ферментом животных, была также обнаружена у бактерий, растений и в грибах (аскомицетах и базидиомицетах). β -Амилаза, гидролизует полисахаридную цепь крахмала, отщепляя вторую с конца α -1,4-гликозидную связь и образуя дисахарид мальтозу, а γ -амилаза отщепляет последнюю α -1,4-гликозидную связь, приводя к образованию глюкозы. Высокая активность данных ферментов из класса гликозил-гидролаз характерна также и для мицелиальных пленок *L. edodes* и *A. mellea*. Активность инвертазы на данной стадии развития базидиомицетов была выше в 2 раза по сравнению с непигментированным мицелием, активность амилазы в коричневой мицелиальной пленке *L. edodes* была выше более чем в 4 раза (Рисунок 26А, Б).



НМ – непигментированный мицелий, РЗ – ризоморфы, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка.

Рисунок 26 – Динамика активности ферментов амилаз (А), инвертаз (Б), пектатлиаз (В) и протеаз (Г) в непигментированном мицелии и мицелиальных пленках базидиомицетов (Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

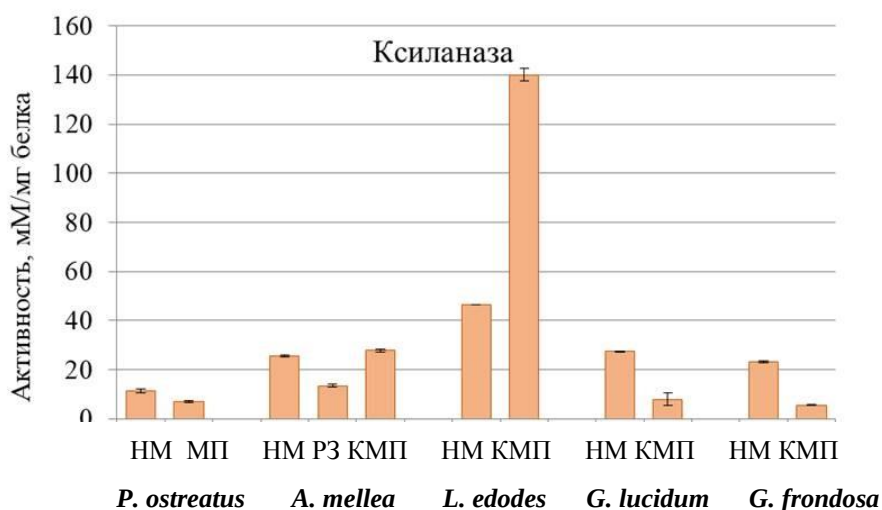
Также и ферменты из класса лиаз – пектатлиазы, были даже более активны в клетках пигментированной мицелиальной пленки (кроме *P. ostreatus*) по сравнению с вегетативным непигментированным мицелием. Данные ферменты участвуют во взаимопревращениях пентозы и глюкуроната, путем расщепления пектата с образованием олигосахаридов с 4-дезоксид- α -D-манн-4-энуранозильными группами на их невосстанавливающих концах, таким образом, принимая участие в разрушении пектиновых полисахаридов – структурных элементов растительных тканей. И для микроорганизмов, источником питания которых являются различные компоненты древесины, крайне необходимо наличие активных пектатлиаз, обеспечивающих клетку высокоэнергетическими молекулами, продуктами расщепления полигалактуроната. Ферменты пектатлиазы проявляли высокую активность на стадии непигментированного мицелия, однако наряду с этим данные ферменты были также высокоактивны в клетках мицелиальных пленок базидиомицетов, за исключением *P. ostreatus*.

У *L. edodes* активность пектатлиазы в мицелиальной пленке была более чем в 15 раз выше по сравнению с вегетативным мицелием, у других культур примерно в 2 раза выше (Рисунок 26В). Протеолитические ферменты протеазы (протеиназы) из класса гидролаз, ответственные за

разрушение пептидной связи между аминокислотами в белках, проявляли высокую ферментативную активность у базидиомицетов *G. lucidum* и *L. edodes* в клетках мицелиальной пленки, в 1.5 и в 10 раз, соответственно, превышая таковую в непигментированном мицелии. У культур *A. mellea* и *P. ostreatus* напротив активность протеаз была в 2 раза выше на стадии непигментированного мицелия, а у *G. frondosa* на обеих стадиях онтогенеза достоверно не различалась (Рисунок 26Г).

Динамика активности ферментов ксиланаз в непигментированном мицелии и мицелиальной пленке базидиомицетов

Также как и лиазы, ферменты класса гликозил-гидролаз необходимы грибам для расщепления поли- и олигосахаридов до мономеров, обеспечивающих клетку питательными веществами. Например, ксиланазы, которые необходимы для расщепления сложных молекул растительных тканей, эти ферменты разрушают гемицеллюлозу, один из основных компонентов клеточных стенок растений. Было установлено, что внутриклеточные ферменты ксиланазы высокоактивны в непигментированном мицелии макромицетов, а также на стадии коричневой мицелиальной пленки у *L. edodes* и *A. mellea* (Рисунок 27). Разложение полисахаридов, в данном случае ксилана, до олигосахаридов и моносахаров, необходимо грибам для поддержания активного метаболизма.



НМ – непигментированный мицелий, РЗ – ризоморфы, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка.

Рисунок 27 – Динамика активности ферментов ксиланаз в непигментированном мицелии и мицелиальных пленках базидиальных макромицетов
(Vetchinkina E. // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

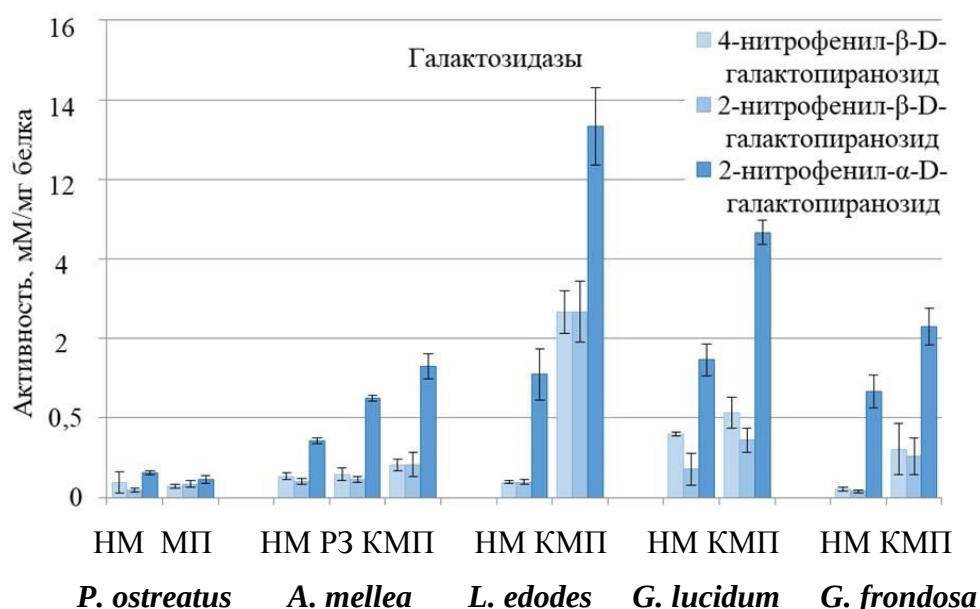
Активность ферментов галактозидаз и глюкозидаз в непигментированном мицелии и мицелиальной пленке базидиомицетов

Было отмечено также увеличение активности внутриклеточных ферментов галактозидаз, отщепляющих галактозу от различных субстратов олигосахаридов, полисахаридов и

гликоконъюгатов (гликолипидов, гликопротеидов). α -Галактозидазы (мелибиазы) отщепляют терминальные нередуцирующие остатки α -D-галактозы от α -D-галактозидов, в том числе от галактоолигосахаридов, галактоманнанов и галактолипидов. К α -галактозидазам биохимически и эволюционно близки α -N-ацетилгалактозаминидазы. β -Галактозидаза (лактаза) катализирует гидролиз β -галактозидов в моносахариды путем разрыва гликозидной связи и является ключевым поставщиком энергии и источником углерода путем расщепления лактозы до галактозы и глюкозы. Активность α -, β -галактозидаз и α -, β -глюкозидаз оценивалась по скорости превращения ряда субстратов, наиболее активны галактозидазы были в отношении 2-нитрофенил- α -D-галактопиранозид (орто-положение) и 4-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (пара-положение), наименее в отношении 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозид.

На стадии мицелиальной пленки у базидиомицетов по сравнению с непигментированным мицелием увеличивалась активность данных ферментов в 2–20 раз, меньше всего у *P. ostreatus*, наибольшее увеличение наблюдалось у *L. edodes*. У базидиомицетов *A. mellea*, *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa* активность галактозидаз была выше на стадии мицелиальной пленки, у *P. ostreatus* достоверных различий в активности данных ферментов на разных стадиях морфогенеза отмечено не было (Рисунок 28).

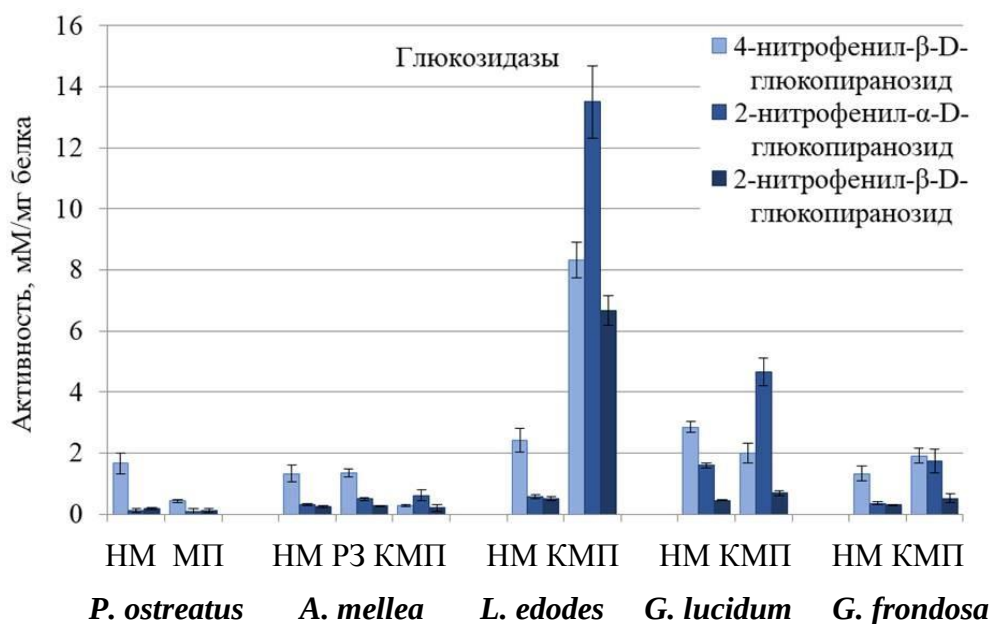
Активность глюкозидаз в реакциях с высвобождением 4-нитрофенола была максимальной в мицелиальных пленках по сравнению с непигментированным мицелием базидиомицетов *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa*. У *A. mellea* и *P. ostreatus* активность данных ферментов была выше в клетках вегетативного непигментированного мицелия (Рисунок 29).



НМ – непигментированный мицелий, РЗ – ризоморфы, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка.

Рисунок 28 – Динамика активности ферментов α -, β -галактозидаз в непигментированном мицелии и мицелиальных пленках базидиомицетов

(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)



НМ – непигментированный мицелий, РЗ – ризоморфы, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка.

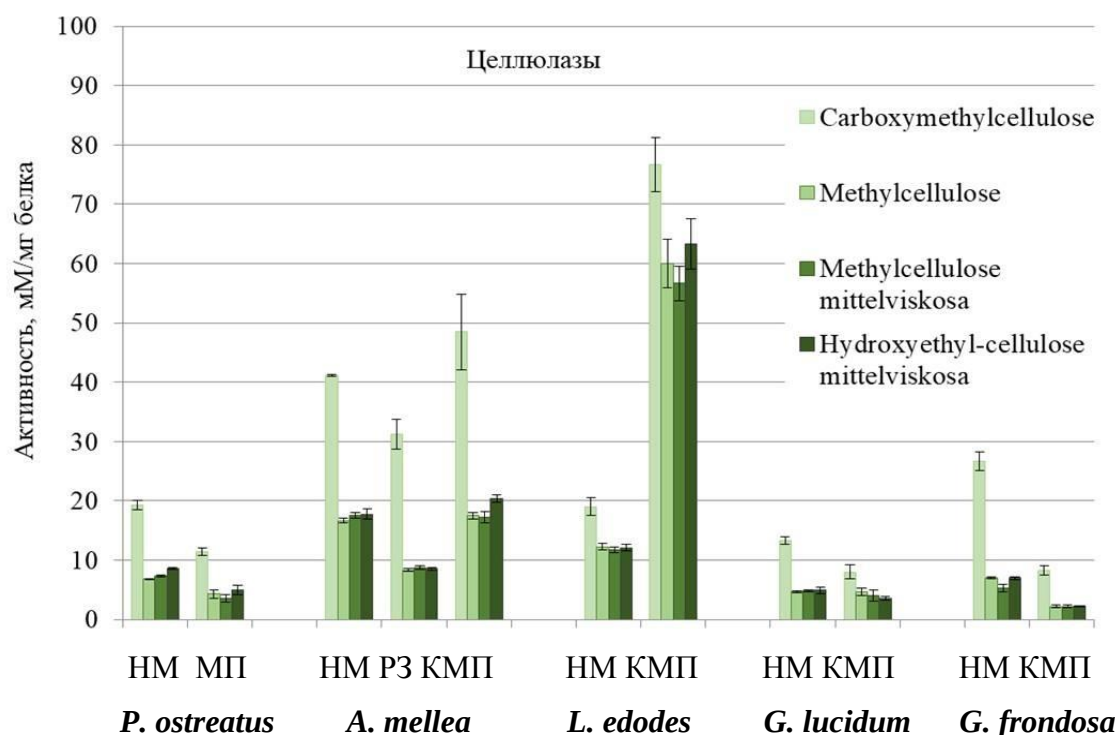
Рисунок 29 – Динамика активности ферментов α-, β-глюкозидаз в непигментированном мицелии и мицелиальных пленках базидиомицетов
(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

Активность ферментов целлюлолитического комплекса в непигментированном мицелии и мицелиальной пленке базидиомицетов

Важнейшими ферментами для ксилотрофных базидиомицетов, необходимыми для разрушения древесины и обеспечения себя питательными веществами, являются ферменты целлюлолитического комплекса, к которым относятся эндоглюканызы, экзоглюканызы (целлобиогидролазы) и β-глюкозидазы (целлобиазы), отличающиеся по характеру действия на молекулы целлюлозы и, как правило, действующие совместно. Целлюлазы катализируют гидролиз β-(1,4)-гликозидных связей в целлюлозе с образованием набора олигосахаридов различной степени полимеризации вплоть до дисахарида целлобиозы и мономера глюкозы. Эндоглюканызы способны расщеплять β-глюканы, ксиланы, ксилоглюканы и растворимые производные целлюлозы, содержащие β-1,4-связи, например карбоксиметил-, гидроксиметилцеллюлозу, образуя набор поли- и олигомерных фрагментов различной длины. Эффективно гидролизуют аморфную часть целлюлозы, в то время как активность к ее кристаллической части у них достаточно низка. Целлобиогидролазы последовательно отщепляют остатки целлобиозы с конца полимерной молекулы целлюлозы. Основное отличие целлобиогидролаз от остальных целлюлаз заключается в их способности гидролизовать кристаллические участки целлюлозы. β-Глюкозидазы, могут быть как внеклеточными, так и внутриклеточными ферментами, они гидролизуют гликозидные связи у нередуцирующих остатков у β-D-глюкозидов и олигосахаридов с высвобождением глюкозы, в отличие от α-

глюкозидаз, которые действуют на α -1,4-связи. Характерное свойство разных типов целлюлаз – наличие синергизма при их совместном действии на высокоупорядоченные формы целлюлозы.

В ходе проведенных экспериментов, было установлено, что при биодegradации субстрата карбоксиметилцеллюлозы наибольшая активность ферментов целлюлаз была в клетках непигментированного мицелия у базидиомицетов *P. ostreatus*, *G. lucidum* и *G. frondosa*, а у *A. mellea* и *L. edodes* высокоактивные целлюлазы были также отмечены на стадии мицелиальной пленки. В клетках данной морфоструктуры *L. edodes* по сравнению с непигментированным мицелием активность целлюлаз была выше в 4 раза (Рисунок 30). Высокая активность пищеварительных ферментов на стадии мицелиальной пленки, особенно в случае *L. edodes* и *A. mellea*, говорит в пользу поддержания активного метаболизма в данных морфоструктурах. Все исследуемые нами базидиомицеты были также способны к биодegradации других субстратов, содержащих целлюлозу (methylcellulose, methylcellulose mittelviskosa, hydroxyethyl-cellulose mittelviskosa) с помощью активных целлюлаз, однако разница между активностью данных ферментов на стадиях непигментированного мицелия и мицелиальной пленки была незначительна. Исключение составляет культура *L. edodes*, у которой активность ферментов в коричневой мицелиальной пленке, также как и в случае с карбоксиметилцеллюлозой, была выше, в среднем в 6 раз (Рисунок 30).

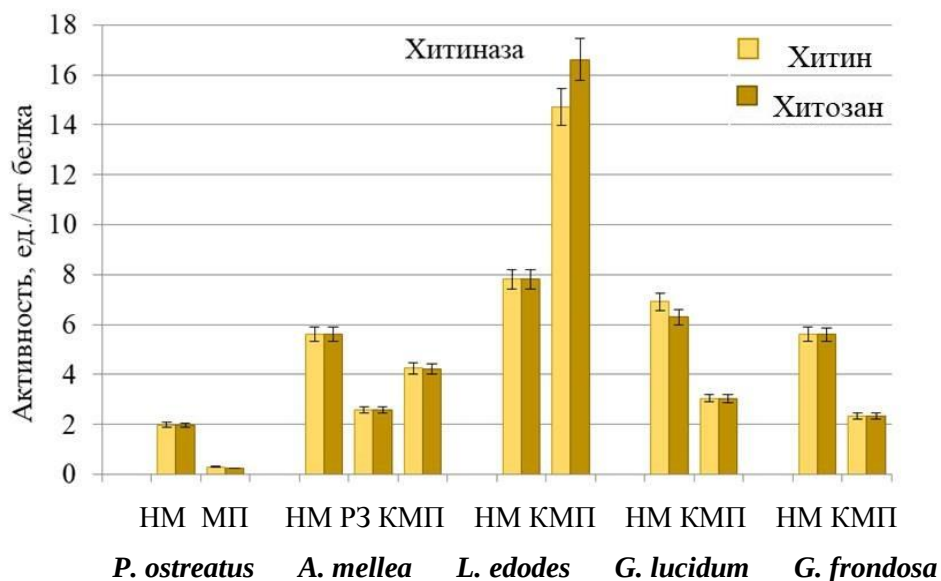


HM – непигментированный мицелий, РЗ – ризоморфы, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка.

Рисунок 30 – Динамика активности ферментов целлюлаз (эндоглюканаз, целлобиогидролаз) в непигментированном мицелии и мицелиальных пленках базидиомицетов (Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

*Активность ферментов хитиназ в непигментированном мицелии и мицелиальной пленке
базидиомицетов*

Ключевая роль в морфообразовании грибов принадлежит клеточной стенке – сложной, биохимически и морфологически динамичной структуре, изменение состава и строения которой приводит к цитодифференцировке, отвечающей определенному функциональному значению: вегетативному росту, освоению пространства; способности защищать от неблагоприятных условий окружающей среды и патогенов, образовывать морфоструктуры и базидиомы (Michalenko *et al.*, 1976; Feofilova, 1983; Fontaine *et al.*, 1997). Клеточная стенка базидиомицетов содержит большое количество хитина, образующего комплексы с β -глюканами. Глюканы, наряду с хитином, являются преобладающими полисахаридами этого компартмента и ответственны за форму и жесткость стенки грибных гиф (Michalenko *et al.*, 1976; Cabib *et al.*, 1988; Feofilova, 2002). Исследование биосинтеза компонентов клеточной стенки доказывает, что хитин, глюканы и гликопротеины связаны вместе поперечными ковалентными связями, и такое соединение является динамичным (Kamada *et al.*, 1985; Cabib *et al.*, 1988; Fontaine *et al.*, 1997; Bowman and Free, 2006).



HM – непигментированный мицелий, РЗ – ризоморфы, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка.

Рисунок 31 – Динамика активности ферментов хитиназ в непигментированном мицелии и мицелиальных пленках базидиомицетов
(Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

В процессе морфогенеза грибов ключевая роль отведена ферментам β -(1,3)-глюканазам и хитиназам, представляющая собой непрерывную перестройку компонентов клеточной стенки, обеспечивающая поддержание баланса между гидролизом существующей клеточной стенки и синтезом новой (Adams, 2004). Эндоглюканазы расщепляют β -глюканы, а хитиназы катализируют деградацию хитина, отщепляя хитоолигосахариды длиной в 2,6-N-

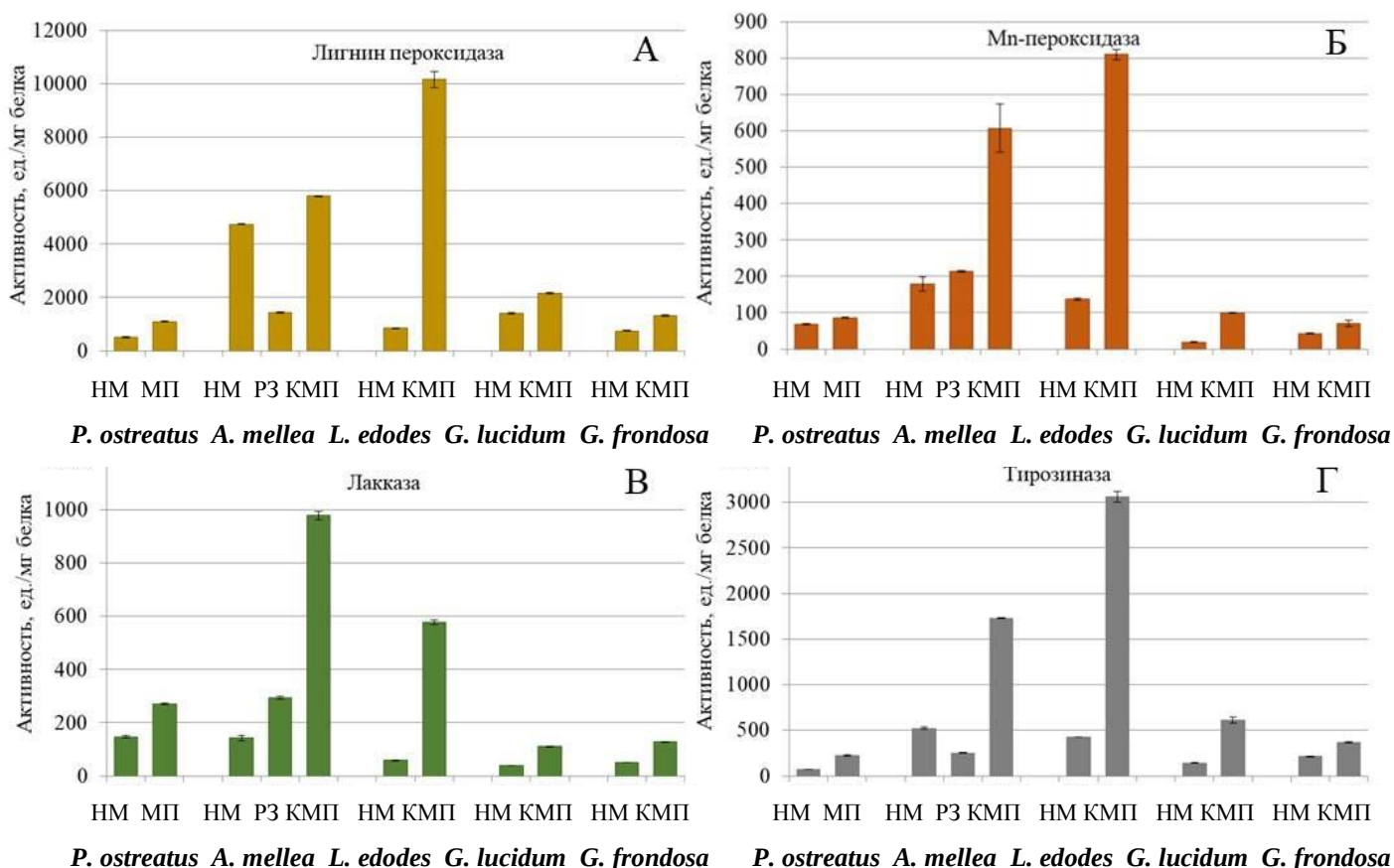
ацетилглюкозаминовых остатков и действуют чаще всего как эндоферменты. Хитиназы относятся к группе О-гликозидных гидролаз, разрушающих гликозидную связь между двумя или более углеводными остатками или между углеводным и неуглеводным компонентом. Наряду с другими литическими ферментами глюканазы и хитиназы находятся в вакуолях, откуда поступают в клеточную стенку. Также многие ферменты, участвующие в процессе автолиза, в том числе глюканазы и хитиназы, связываются с субапикальными стенками грибов, что предполагает их участие в процессах растяжения, ветвления и слияния гиф при анастомозах.

Таким образом, грибные глюканазы и хитиназы играют важную роль в при апикальном росте, набухании, прорастании и высвобождении спор, клеточном делении и ветвлении мицелия, механических повреждениях (Feofilova, 1983, 2002; Vetchinkina *et al.*, 2015). Помимо участия в деградации целлюлозы, ферменты β -глюкозидазы также связаны с синтезом β -глюкана во время перестройки компонентов клеточной стенки, формировании базидиом, в защитных механизмах и метаболизме пигментов (Tiwari *et al.*, 2013; Vetchinkina *et al.*, 2017a; 2017b). Было отмечено, что активные ферменты хитиназы, способные к деградации коллоидного хитина и хитозана, также как и ферменты глюканазы и глюкозидазы, присутствуют в грибных клетках на всех стадиях морфогенеза базидиомицетов. Наибольшая активность ферментов хитиназ у всех базидиомицетов была отмечена в вегетативном непигментированном мицелии. Исключение составляет культура *L. edodes*, у которой была отмечена двукратная активация хитиназ на стадии коричневой мицелиальной пленки (Рисунок 31). Поскольку внутренние слои клеточной стенки базидиомицетов состоят из фибрилл хитина погруженных в β -глюкановый матрикс и при росте и морфогенезе необходима постоянная перестройка полисахаридов данного компартмента, высокий уровень активности данных ферментов подтверждает ключевую их роль в поддержании баланса между синтезом и лизисом компонентов данной структуры (Vetchinkina, 2025).

Активность ферментов лигнинолитического комплекса в непигментированном мицелии и мицелиальной пленке базидиомицетов

Неоднозначная роль представляется у важнейших для ксилотрофных базидиомицетов ферментов лигнинолитического комплекса. Вероятно, что фенолоксидазы, необходимые ксилотрофам для разрушения древесины и обеспечения себя питательными веществами, могут также принимать участие в морфообразовании грибов (Thurston, 1994; Leonowicz *et al.*, 2001; Baldrian, 2006; Vetchinkina *et al.*, 2017a; Vetchinkina, 2025). Предполагают, что образование морфоструктур сопряжено с катализируемым лакказой синтезом внеклеточных пигментов, участвующих в качестве связующих элементов при сшивке компонентов клеточных стенок мицелиальных гиф при образовании базидиом (Leatham and Stahmann, 1981). А также, могут выступать в качестве сигнальных молекул, активность которых зависит от этапа и особенностей

развития грибной культуры. Было отмечено, что активность данного фермента зависела от стадии развития базидиальных грибов и после образования плодовых тел она резко снижалась, а не содержащие лакказы мутанты не образовывали плодовых тел, в отличие от ревертантов с нормальной активностью фермента (Wood, 1980; Das *et al.*, 1997). У некоторых штаммов *L. edodes* не способных к формированию мицелиальной пленки отмечалась низкая фенолоксидазная активность (Vetchinkina *et al.*, 2015). Изучение активности лигнинолитических ферментов лакказ, Мп-пероксидазы и лигнин пероксидазы, показало значительную активацию в мицелиальных пленках относительно непигментированного вегетативного мицелия базидиомицетов (Рисунок 32А–В). Кроме того, было установлено, что в мицелиальных пленках всех изучаемых нами культур наблюдается высокая активность ферментов тирозиназ, которые принимают участие в синтезе меланиновых пигментов, и таким образом, выполняют защитную функцию, обеспечивая резистентность к ультрафиолету и излучению видимого света. Наибольшая активность данных ферментов была отмечена в сильно пигментированных мицелиальных пленках *A. mellea*, *L. edodes* и *G. lucidum* (Рисунок 32Г).



НМ – непигментированный мицелий, РЗ – ризоморфы, МП – мицелиальная пленка, КМП – коричневая мицелиальная пленка.

Рисунок 32 – Динамика активности ферментов оксидоредуктаз (лакказ, тирозиназ, лигнин пероксидаз, Мп-пероксидаз) в непигментированном мицелии и мицелиальных пленках базидиомицетов

(Vetchinkina E. // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

Присутствие пигмента оказывает сильное влияние на устойчивость хитин-глюкан-меланинового комплекса к действию хитиназы и 1,3- β -глюканазы патогенных организмов (Feofilova, 1983; Whitaker, 1995; Gessler *et al.*, 2014; Belozerskaya *et al.*, 2017). Пигменты располагаются либо в виде отдельных гранул на внешней поверхности гиф, либо внутри клеточной стенки грибов, образуя комплекс с хитином, в результате возникает наружный барьер, обладающей большой устойчивостью к ферментам патогенов (Van Gelder *et al.*, 1997; Eisenman and Casadevall, 2012).

Таким образом, при формировании морфогенных структур происходит сильное утолщение и растяжение клеточной стенки, отмечается усиление гифальной агрегации, кроме того, повышается синтез пигментов, выполняющих защитную функцию. В данных процессах необходимы фенолоксидазы, участвующие в окислительной полимеризации компонентов клеточной оболочки, усиливающих скрепление между клетками. Это говорит о том, что фенолоксидазы участвуют не только в процессах биodeградации фенольных субстратов для обеспечения клеток питательными веществами, но также принимают участие в ультраструктурной перестройке компонентов клеточных стенок грибов, гифальной агрегации, устойчивости к стрессам и смене стадий развития, что дает основание предполагать регуляторную деятельность этих соединений и/или их продуктов в процессе онтогенеза макромицетов (Vetchinkina, 2025).

5.6 Гемагглютинирующая активность на разных стадиях морфогенеза базидиомицетов *P. ostreatus*, *A. mellea*, *G. lucidum*, *G. frondosa* и *L. edodes*

На разных стадиях в процессе онтогенеза базидиомицетов были обнаружены высокоактивные лектины характерные только для определенного этапа развития, с повышением удельной гемагглютинирующей активности на стадии пигментированной мицелиальной пленки в 2, 3 или даже в 20 (у *L. edodes*) раз (Рисунок 33). Определение углеводной специфичности лектинов показало, что они проявили высокое сродство в отношении *L-D*-мелибиозы, *D*-лактозы и *D*-галактозы. Лектины способны оказывать влияние на функционирование живых тканей, индуцируя у них необходимый биологический ответ, например образование морфоструктур, плодовых тел. Участвовать в обеспечении направленного роста и межклеточного взаимодействия мицелиальных гиф, в том числе при формировании базидиом (Vetchinkina *et al.*, 2017b).

Также лектины могут принимать участие в регуляции ферментативных систем (Vetchinkina *et al.*, 2008c). Непрерывную активность лектинов на разных стадиях онтогенеза можно объяснить участием данных белков в качестве агрегирующего агента для образования плотного сплетения мицелиальных гиф. Возможно также, что переход от одной стадии развития базидиомицета к другой регулируется присутствием и активностью в клеточных структурах маркерных молекул, обладающих выраженной углеводной специфичностью.

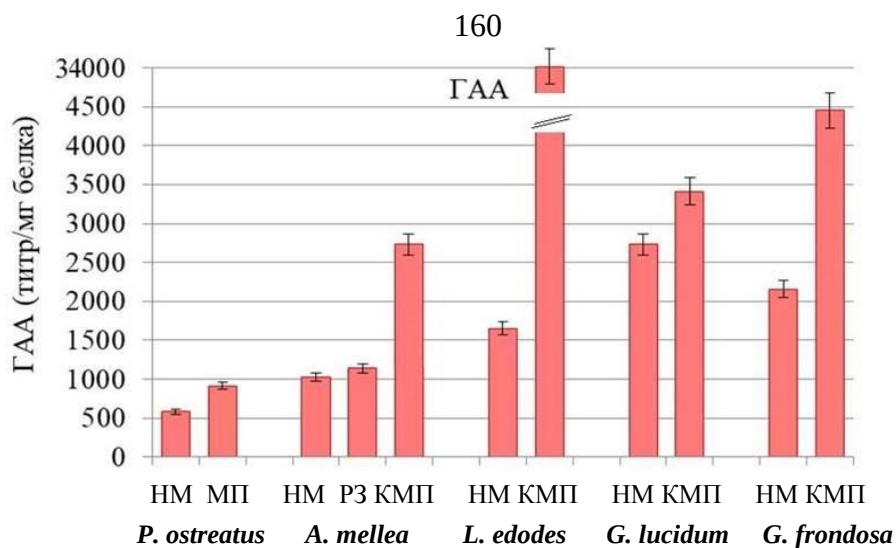


Рисунок 33 – Гемагглютинирующая активность в клетках непигментированного мицелия и мицелиальных пленок базидиальных макромицетов
 (Vetchinkina // Mycological Progress, 2025 <https://doi.org/10.1007/s11557-025-02068-1>)

Таким образом, охарактеризованы особенности морфологии, ультраструктуры и биохимического состава (полисахариды, ферменты, лектины, пигменты) плотных пигментированных мицелиальных образований ксилотрофных базидиомицетов *A. mellea*, *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa*. Морфометрия, цвет, ультраструктура мицелиальных пленок у разных грибных культур были различны, отмечено сложное строение или однородность данных образований. Наблюдались схожие признаки, например, плотно прилегающие друг к другу переплетенные гифы данной стадии морфогенеза отличались сильно утолщенной (в 5–10 раз) клеточной стенкой. Отмечено значительное повышение содержание пигментов (меланинов), по сравнению с вегетативным мицелием, кроме *P. ostreatus*. Общее содержание углеводов в мицелиальных образованиях увеличивалось и превосходило общее содержание белка в 2–74 раза в зависимости от вида грибной культуры. Под поверхностью коричневой мицелиальной пленки закладывались примордии, формирующиеся в плодовые тела. Установлено, что для *L. edodes*, *A. mellea* и *G. frondosa* формирование данной морфоструктуры предшествовало и было необходимо для последующего плодоношения. Плодовые тела *G. lucidum* формировались в непосредственной близости к мицелиальной пленке, а у культуры *P. ostreatus* плодоношение не зависело от данного фактора, и пленка образовывалась при пересыхании мицелия, выполняя защитную функцию.

Анализ динамики активности ряда функциональных гликопротеинов показал, что для некоторых культур (*L. edodes* и *A. mellea*), в коричневой мицелиальной пленке, по сравнению с непигментированным мицелием, отмечено многократное повышение активности высокоспецифичных лектинов и ряда ферментных систем: лиаз (пектатлиаз), гидролаз (пептидаз), гликозил-гидролаз (амилаз, инвертаз, хитиназ, ксиланаз, целлюлаз (эндоглюканаз,

целлобиогидролаз) и α -, β -глюкозидазы, α -, β -галактозидаза), а также оксидоредуктаз (лакказ, тирозиназ, лигнин пероксидаз, Mn-пероксидаз), входящих в состав целлюлолитического, лигнинолитического комплексов базидиомицетов, а также принадлежащих к функциональной категории биогенеза клеточной стенки высших грибов. Вполне возможно, что пигментированные мицелиальные пленки разных базидиомицетов отличаются друг от друга, как по составу, так и по функциональному значению. У трутовика *G. lucidum* и вешенки *P. ostreatus* они сродни склероциям, выполняющим защитную функцию и представляют собой стадию покоя при неблагоприятных условиях среды. Напротив, процессы, происходящие в коричневой мицелиальной пленке *L. edodes* и *A. mellea* указывают на активный метаболизм в клетках данной морфоструктуры, несущей полифункциональную нагрузку в процессах модификации клеточной стенки и цитодифференцировки мицелиальных гиф, формировании морфогенных структур, взаимодействии с внешней средой и регуляции перехода в фазу плодоношения.

5.7 Транскриптомное профилирование немодельных организмов, на примере *L. edodes*, алгоритм для физиологической интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2500

Универсальных алгоритмов для транскриптомного профилирования немодельных организмов не существует, и для проведения такого анализа необходимо самостоятельно комбинировать различные программы, тратя много времени и применяя большие вычислительные мощности (Li *et al.*, 2014; Shang *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016). В посвященных транскриптомному анализу *de novo* экспериментальных статьях, направленных на выявление дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), нет подробного описания используемых программ, параметров расчетов и скриптов. В исследованиях, как правило, обсуждается ограниченный круг генов, которые интересны авторам и описание огромного количества активируемых/репрессируемых процессов остается не исследованными. Особенно если речь идет о характеристике генетического профиля и метаболических процессов на протяжении всего жизненного цикла организмов.

По результатам проведенных экспериментов по характеристике транскриптомов базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза, предлагается определенный набор инструментов, в том числе разработанных нами, для быстрого и эффективного анализа данных транскриптомного профилирования немодельных организмов. Предлагаемый протокол подразумевает полный цикл анализа транскриптомных данных: от селекции исходных нуклеотидных последовательностей кДНК (ридов) до выявления и визуализации активируемых/репрессируемых метаболических путей (https://github.com/RimGubaev/path_annotation). С использованием данного алгоритма проведено сравнение транскриптомных профилей *L. edodes* на стадиях непигментированного мицелия, коричневой мицелиальной пленки – структуры, характерной для данного вида макромицета, образование которой

необходимо для последующего перехода к плодоношению, примордия и плодового тела. Это позволило выявить различия на транскрипционном уровне в целом ряде физиологических процессов в разных морфоструктурах базидиомицета *L. edodes*.

5.7.1 Первичный анализ, селекция прочтений и сборка транскриптов *L. edodes*

В ходе высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2500 получены прочтения, соответствующие фрагментам мРНК *L. edodes* на четырех стадиях жизненного цикла в двух биологических повторностях (Таблица 6). Поскольку на различных стадиях онтогенеза в разных тканях при различных условиях экспрессируются разные группы генов, для сборки репрезентативных транскриптомов *de novo* используют несколько образцов кДНК-библиотек, соответствующих разным физиологическим состояниям организма (Zhao *et al.*, 2011). Это позволяет «охватить» максимальное количество транскриптов генов. В данном исследовании для сборки транскриптов были использованы наборы прочтений, которые соответствуют четырем стадиям онтогенеза шиитаке. Используя такой набор, удалось собрать число транскриптов, которое примерно соответствует среднему числу генов у базидиомицетов (Mohanta and Bae, 2015). Чтобы осуществить корректную сборку транскриптов, на начальном этапе анализа необходимо провести селекцию «ненужных» прочтений. Это связано с тем, что короткие, низкокачественные и соответствующие рРНК прочтения могут снизить качество сборки и затруднить поиск ДЭГ (Zhao *et al.*, 2014; Macmanes, 2014; Williams *et al.*, 2016). Некачественные прочтения и прочтения, соответствующие рРНК, удаляли с помощью программ Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) и SortMeRNA (Kopylova *et al.*, 2012), соответственно. В ходе вышеуказанных процедур удалили от 1 до 12% исходных прочтений (Таблица 6).

Таблица 6 – Количество прочтений, соответствующих транскриптам *L. edodes*, после разных этапов селекции

Образец	Исходное количество прочтений	Количество прочтений после Trimmomatic	Количество прочтений после Trimmomatic и SortMeRNA
НМ 1	21377045	21377045	18722340 (87.6 %)
НМ 2	13367213	13366832	13208592 (98.8 %)
КМП 1	14148496	14147994	13738611 (97.1 %)
КМП 2	19419173	19419173	17759970 (91.5 %)
ПР 1	13810403	13807276	13530262 (98.0 %)
ПР 2	13111065	13106618	13039414 (99.5 %)
ПТ 1	9136518	9132280	8953365 (98.0 %)
ПТ 2	13691060	13678764	13296360 (96.1 %)

Примечание: для образцов НМ – непигментированного мицелия, КМП – коричневой мицелиальной пленки, ПР – примордиев и ПТ – плодовых тел); 1, 2 – номера повторностей; в скобках указан процент прочтений, оставшихся после процедуры селекции.

(Gubaev *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1134/S0026893318040076>)

Для сборки транскриптов была использована программа Trinity (Grabherr *et al.*, 2011). Этот сборщик расположен в свободном доступе, прост в использовании и показал себя как наиболее эффективный при сборке сложного эукариотического транскриптома (Honaas *et al.*, 2016). Для получения сборки с оптимальными характеристиками (медианный размер транскрипта, количество собранных транскриптов) варьировали следующие параметры: минимальная длина собранного транскрипта (180, 200, 250 н.п.); размер k-мера (20, 25, 30 н.п.); алгоритм сборки (butterfly, pasafly). Были подобраны следующие оптимальные параметры: минимальная длина транскрипта – 200 н.п.; длина k-мера – 25 н.п.; алгоритм сборки – butterfly. С использованием данных параметров из отсортированных прочтений собрали 16231 транскрипт гена *L. edodes* с медианной длиной 1854 нуклеотида.

Одна из важных проблем при автоматизированной реконструкции транскриптома *de novo* связана с некорректной сборкой так называемых избыточных транскриптов, которые представляют собой фрагменты более протяженных «истинных» транскриптов, что может являться причиной ошибок в процессе аннотации транскриптома и при анализе ДЭГ. С помощью программы EvidentialGene удаляли избыточные транскрипты, а также транскрипты, не содержащие открытых рамок считывания. В результате такой процедуры удалено 3662 транскрипта. Неоптимальное количество образцов (одно физиологическое состояние, отсутствие повторностей), а также отсутствие этапов селекции собранных транскриптов при оптимизации сборки могут приводить к перенасыщению собранного транскриптома избыточными транскриптами. Это влечет за собой получение некорректных результатов в ходе дальнейшего анализа. Так, собранные ранее транскриптомы *L. edodes* содержали значительно большее число транскриптов (31511 и 55322), чем количество генов у базидиомицетов, поскольку алгоритмы их сборки не оптимизировали (Tang *et al.*, 2013; Zhong *et al.*, 2013).

Собранные транскрипты – своего рода «фундамент» для дальнейшего поиска ДЭГ. Поэтому, сборка должна, с одной стороны, соответствовать числовым показателям качества (количество транскриптов, медианная, минимальная и максимальная длина транскриптов), с другой стороны, нуклеотидные последовательности транскриптов должны кодировать аминокислотные последовательности, то есть нести биологический смысл. Программы-сборщики используют сложные математические модели для воссоздания транскриптов из прочтений, не учитывая при этом биологической информации, которая содержится в собранных последовательностях. Один из способов проверки биологической составляющей качества сборки – сравнение получившихся транскриптов с набором высококонсервативных ортологичных генов родственных организмов. Для такого сравнения, чтобы проверить качество сборки, была использована универсальная база данных/программу BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) (Simão *et al.*, 2015), которая позволяет сравнить собранные *de novo* транскрипты с последовательностями генов, включенных в базу данных универсальных ортологов OrthoDB. В

этой базе для базидиомицетов представлено 1335 генов. В осуществленной нами сборке был найден 1071 транскрипт генов (80%), ортологичных представленным в базе данных OrthoDB генов для базидиомицетов (Таблица 7), что свидетельствует о высоком качестве сборки. Этот процент для различных сборок транскриптомов эукариотических организмов составляет от 70 до 80 (Tassone *et al.*, 2016; Lok *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017).

5.7.2 Аннотация собранных *de novo* транскриптов *L. edodes*

В ходе дальнейшего анализа собранные транскрипты использовали в качестве матрицы для подсчета их содержания в различных образцах. При поиске ДЭГ выбрали описанный ранее набор программ (Trapnell *et al.*, 2012), поскольку он относительно прост в использовании и достаточно эффективен (Zhang *et al.*, 2014). Собранные транскрипты, а также информация о ДЭГ, позволяют сравнить уровни экспрессии разных генов в исследуемых образцах в рамках числовых параметров и статистических метрик. При этом скрытый в этом большом массиве данных биологический смысл не виден, поскольку собранным *de novo* транскриптам присваивают только идентификационные номера, но не информацию о продуктах, которые они кодируют. В связи с этим, важный этап транскриптомного анализа – аннотация собранных транскриптов, которая подразумевает поиск кодируемых ими белков и их функций и, таким образом, позволяет интерпретировать результаты с физиологической точки зрения. Поскольку для функционального анализа транскриптомных данных необходима информация о продуктах генов, нами на основе программы BLAST+ (Camacho *et al.*, 2009) и с применением альтернативных наборов аминокислотных последовательностей проведена аннотация реконструированных транскриптов *L. edodes*. Чтобы аннотировать собранные транскрипты, использовали неспециализированную базу данных UniProt, которая содержит все известные аминокислотные последовательности; при этом мы аннотировали 94% собранных транскриптов (Таблица 7).

Таблица 7 – Количество транскриптов *L. edodes* после различных этапов анализа

Собрано транскриптов с помощью Trinity	16231
Количество транскриптов после сортировки с помощью пакета EvidentialGene	12569
Аннотировано с помощью базы всех аминокислотных последовательностей UniProt	11814
Аннотировано по аминокислотным последовательностям грибов («Fungi»)	10355
Аннотировано по аминокислотным последовательностям <i>A. bisporus</i>	8665
Аннотировано по аминокислотным последовательностям <i>P. rubens</i>	6568
Аннотировано с помощью KAAS	3900
Вошло в категории GO	6069

(Gubaev *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1134/S0026893318040076>)

Несмотря на то, что использование неспециализированных баз данных аминокислотных последовательностей типа UniProt позволяет аннотировать большую часть собранных транскриптов, такой подход обладает определенными недостатками. Во-первых, при применении таких баз не учитывается таксономическая принадлежность исследуемого организма, что может приводить к некорректной аннотации некоторых транскриптов (Aguilera-Aguirre *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2016). Во-вторых, белки, представленные в таких базах данных, не собраны в функциональные категории, что затрудняет дальнейшую обработку и обобщение данных транскриптомного профилирования.

В связи с этим мы дополнительно аннотировали реконструированные транскрипты с помощью специализированной базы данных аминокислотных последовательностей «Fungi», в которой содержится информация о продуктах генов всех грибов, что позволило аннотировать 82% транскриптов *L. edodes* (Таблица 7). Кроме того, для последующей классификации генов по функциональным категориям, мы, во-первых, аннотировали собранные транскрипты, используя информацию об аминокислотных последовательностях *A. bisporus* и *P. rubens*. Выбор этих организмов обусловлен тем, что *A. bisporus* и *P. rubens* являются наиболее близкими исследуемому видам среди тех, продукты генов которых достаточно хорошо аннотированы и сгруппированы в метаболические пути в базах данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и BioСус, соответственно (Avin *et al.*, 2012). Около 70 и 50% собранных транскриптов генов *L. edodes* аннотировано с помощью информации об аминокислотных последовательностях *A. bisporus* и *P. rubens*, соответственно (Таблица 7). Применение ресурса BioСус также позволило визуализировать ДЭГ на метаболических схемах.

Во-вторых, чтобы распределить транскрипты по всем метаболическим путям, описанным в базе данных KEGG, мы присвоили собранным транскриптам идентификационные номера ортологичных генов (к-номера). В результате этого 3900 транскриптов получили соответствующие к-номера. Транскрипты генов, проаннотированные с помощью аминокислотных последовательностей *A. bisporus*, а также транскрипты с присвоенными к-номерами, распределены по метаболическим путям *A. bisporus* и всем известным путям, представленным в базе данных KEGG, соответственно. В результате распределения, собранные *de novo* транскрипты генов *L. edodes* вошли в 114 метаболических путей, характерных для *A. bisporus*, и 365 известных метаболических путей базы данных KEGG. При этом определенный транскрипт (белок) мог входить как в один, так и в несколько метаболических путей. В категории BioСус вошло 4556 собранных транскриптов *L. edodes* с присвоенными идентификационными номерами генов *P. rubens*. Помимо ресурсов KEGG и BioСус для классификации собранных транскриптов была также использована база данных GO (Gene Ontology); при этом 6069 собранным транскриптам присвоили идентификационные GO-номера.

Поскольку применение видоспецифичных наборов метаболических путей близкородственных организмов, не всегда позволяет «охватить» все потенциально активируемые/репрессируемые пути, мы дополнительно классифицировали гены шиитаке по метаболическим путям, представленным в базе данных KEGG для всех живых организмов, а также по функциональным группам ресурса GO. Такой шаг позволил нам дополнить физиологическую картину, полученную с помощью информации для близкородственных видов. Использование альтернативных биоинформационных ресурсов при классификации ДЭГ – целесообразный подход, поскольку разные базы данных могут оперировать разными функциональными категориями генов, и некоторые категории могут быть представлены недостаточно. Так, например, категории BioCyc оказались менее «обширными» и более детализированными, чем категории KEGG и GO. В связи с этим, применение нескольких баз данных позволяет снизить «потери» при описании активируемых/репрессируемых физиологических процессов. Таким образом, на основе проведенного анализа транскриптома *L. edodes* мы описали алгоритм для проведения транскриптомного профилирования, который может быть легко адаптирован для аналогичного анализа других немодельных организмов (Рисунок 34).

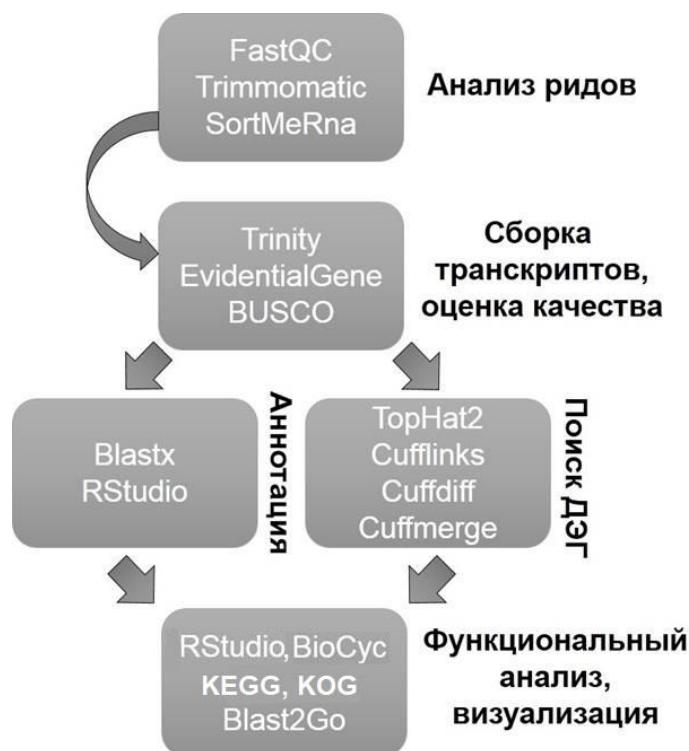


Рисунок 34 – Схема протокола, использованного для анализа транскриптома *L. edodes*. В прямоугольниках расположены использованные программы и ресурсы (Gubaev *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1134/S0026893318040076>)

Предложенный алгоритм подразумевает использование программ и разработанных скриптов, для проведения полного цикла анализа: от селекции исходных нуклеотидных последовательностей кДНК до функциональной классификации ДЭГ и визуализации активируемых/репрессируемых метаболических путей https://github.com/RimGubaev/deg_to_path.

Таблица 8 – Список альтернативных программ для проведения транскриптомного анализа

Этап анализа	Используемые программы	Источник	Оптимизация
Сборка транскриптов	Oases	https://github.com/dzerbino/oases	(Ghangal <i>et al.</i> , 2013; Yang and Smith, 2013; Zhao <i>et al.</i> , 2011; Haznedaroglu <i>et al.</i> , 2012)
	Trans-ABYSS	https://github.com/bcgsc/transabyss	
	SOAPdenovo-Trans	http://soap.genomics.org.cn/SOAPdenovo-Trans.html	
	Trinity	https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq	
Оценка качества сборки	Detonate	http://deweylab.biostat.wisc.edu/detonate/	(Li <i>et al.</i> , 2014)
	Trans-rate	http://hibberdlab.com/transrate/	(Smith-Unna <i>et al.</i> , 2016)
	EvidentialGene	http://sourceforge.net/projects/evidentialgene/	(Chen <i>et al.</i> , 2015)
	Busco	http://busco.ezlab.org/	(Simão <i>et al.</i> , 2015)
Выравнивание ридов на собранные транскрипты	TopHat2	https://ccb.jhu.edu/software/tophat/manual.shtml	(Shang <i>et al.</i> , 2014; Yuan <i>et al.</i> , 2016; Kim <i>et al.</i> , 2015)
	HISAT	https://ccb.jhu.edu/software/hisat/manual.shtml	(Kim <i>et al.</i> , 2015)
	SOAP2	http://soap.genomics.org.cn/soapaligner.html	(Kim <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2009)
	BWA	http://bio-bwa.sourceforge.net/	(Yuan <i>et al.</i> , 2016; Li and Durbin, 2009)
Подсчет количества ридов на транскрипт	Ht-Seq	http://www-huber.embl.de/HTSeq/doc/overview.html	(Anders <i>et al.</i> , 2015)
	eXpress	http://bio.math.berkeley.edu/eXpress/	(Roberts and Pachter, 2013)
	Cufflinks	http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/	(Trapnell <i>et al.</i> , 2012)
	RSEM	http://deweylab.github.io/RSEM/	(Roberts and Pachter, 2013; Li, Dewey, 2011)
Поиск ДЭГ	Cuffdiff	http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffdiff/	(Trapnell <i>et al.</i> , 2012)
	edgeR	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html	(Robinson <i>et al.</i> , 2010)
	DESeq2	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html	(Love <i>et al.</i> , 2014)
	baySeq	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/baySeq.html	(Hardcastle and Kelly, 2010)
Функциональная аннотация ДЭГ	Blast+	ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+	(Camacho <i>et al.</i> , 2009)
	Hmmer3	http://hmmer.org/download.html	(Eddy, 2009)
	InterProScan	https://www.ebi.ac.uk/interpro/interproscan.html	(Jones <i>et al.</i> , 2014)
	Annocript	https://github.com/frankMusacchia/Annocript	(Musacchia <i>et al.</i> , 2015)
Поиск достоверно изменяющихся путей	BioCyc	https://biocyc.org/	(Caspi <i>et al.</i> , 2016)
	GAGE	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/gage.html	(Luo <i>et al.</i> , 2009)
	DAVID	https://david-d.ncifcrf.gov/	(Huang <i>et al.</i> , 2009)
	Goseq	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/goseq.html	(Young <i>et al.</i> , 2010)

(Gubaev *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1134/S0026893318040076>)

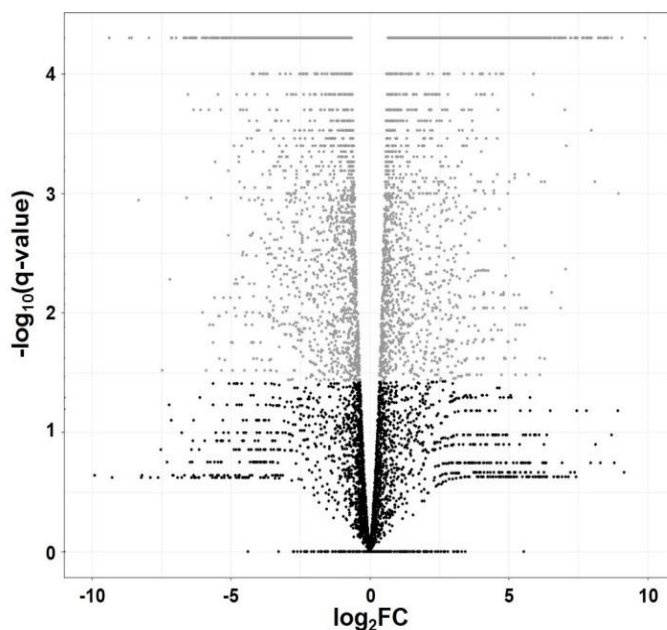
Данный протокол позволяет выявить различия в профиле экспрессии групп генов, входящих в целый ряд функциональных категорий, и судить об особенностях физиологии макромицета при чередовании этапов онтогенеза (Таблица 8). Проведенный анализ подразумевает действия, связанные с компоновкой и сортировкой большого массива информации, которые невозможно осуществить без применения автоматизированных подходов. С этой целью на языке программирования R нами написаны авторские скрипты, которые, вместе с описанием, находятся в свободном доступе и могут быть использованы в качестве шаблонов для проведения аналогичного анализа для любого организма https://github.com/RimGubaev/deg_to_path. Чтобы адаптировать данные скрипты под другой организм, необходимо: 1) выбрать наиболее близкий к целевому организм с определенной последовательностью генома и качественной его аннотацией, и информацией, позволяющей проводить автоматизированную функциональную классификацию генов; 2) загрузить аминокислотные последовательности этого организма и номера метаболических путей, которым они соответствуют.

Остальная информация о собранных транскриптах и ДЭГ, необходимая для проведения функционального анализа с помощью созданных скриптов, включает в себя выходные данные программ Trinity и Cuffdiff. Некоторые из предлагаемых нами программ для транскриптомного профилирования имеют аналоги, которые, возможно, в тех или иных случаях могут оказаться более эффективными. Нами приведен список таких программ, а также ссылки на работы по оптимизации параметров расчетов при их применении (Таблица 8). При необходимости описываемый алгоритм может быть адаптирован с помощью замены использованных нами программ на альтернативные. Предлагаемый протокол для транскриптомного профилирования *de novo* может быть использован и для исследования физиологических процессов у организмов с расшифрованной нуклеотидной последовательностью генома. Геномные данные для многих организмов, в том числе для шиитаке (Chen *et al.*, 2016), представляют собой разрозненный набор нуклеотидных последовательностей (скаффолдов) с аннотацией низкого качества. Использование таких геномных данных в качестве референсов затруднено в связи с тем, что они потребуют дополнительной трудоемкой обработки, включающей, например, объединение скаффолдов и аннотацию. Причем, в процессе аннотирования генов в таких геномах могут возникать сложности, связанные с потерей части информации на «стыках» скаффолдов, а также с интронэкзонной структурой генов эукариот. Кроме того, гены и кодируемые ими белки при такой геномной сборке не распределены по функциональным категориям. В связи с этим, для целого ряда экспериментальных работ процесс сборки и аннотирования транскриптома *de novo* может оказаться более информативным и менее трудоемким. Таким образом, предлагаемый нами алгоритм позволяет сформировать основу для интерпретации данных РНК-секвенирования, преобразуя их в наглядные схемы активируемых/репрессируемых физиологических процессов.

Описанный на примере *L. edodes* протокол универсален и его легко адаптировать для проведения транскриптомного анализа других немодельных организмов. С помощью предлагаемого алгоритма нам удалось описать особенности физиологии коричневой мицелиальной пленки, свидетельствующие о динамичности и полифункциональности этой структуры, а также ее роли в индукции плодоношения базидиомицета *L. edodes*.

5.7.3 Выявление ДЭГ на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*

На основе разработанного нами алгоритма установлено общее количество генов на стадии непигментированного вегетативного мицелия, коричневой мицелиальной пленки и генеративных стадиях развития (в примордии и плодовом теле) базидиомицета *L. edodes*. Поиск генов, экспрессирующихся дифференциально на разных стадиях онтогенеза, проводили с помощью программ Bowtie2, Cufflinks, Cuffmerge, Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2012). Заметные изменения наблюдались в динамике транскрипционной активности генов на стадии мицелиальной пленки по сравнению с непигментированным мицелием. С помощью кластерного анализа установлено, что биологические повторности для анализируемых стадий онтогенеза самосогласуются, то есть схожи между собой. Выявленные ДЭГ на стадии непигментированного мицелия и мицелиальной пленки визуализированы с помощью пакета CummeRbund (Trapnell *et al.*, 2012) в RStudio (Рисунок 35).



Серыми точками обозначены транскрипты, содержание которых достоверно различается на исследованных стадиях морфогенеза гриба ($q < 0.05$). $\log_2FC$ (Fold Change) – логарифм соотношения уровня экспрессии гена в двух образцах по основанию 2. $-\log_{10}(q\text{-value})$ – отрицательный логарифм q -уровня значимости по основанию 10.

Рисунок 35 – График Volcano, отображающий гены, которые экспрессируются у *L. edodes* на стадии непигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки (Gubaev *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1134/S0026893318040076>)

Собранные транскрипты были аннотированы на основе поиска гомологии к белкам 20 референсных организмов, а также с использованием информации об аминокислотных последовательностях *A. bisporus* и *P. rubens*, продукты генов данных грибов достаточно хорошо аннотированы и сгруппированы в метаболические пути (около 70 и 50%) в базе данных KEGG и информационном ресурсе BioСус, соответственно. ДЭГ в коричневой мицелиальной пленке относительно непигментированного мицелия – 10216 генов, при этом активируется 5166, а репрессируется 5050 генов, В коричневой мицелиальной пленке относительно примордия активируется 2407, репрессируется – 2347 генов (всего 4754 ДЭГ). В примордии относительно мицелия всего ДЭГ – 5395, активируется – 2775, репрессируется – 2620 генов. Наибольшее количество ДЭГ (11201) в паре непигментированный мицелий относительно плодового тела, что говорит о существенном различии в метаболических процессах, происходящих между данными стадиями морфогенеза, причем количество активированных и репрессированных генов практически одинаково. Наименьшие различия наблюдаются между стадией примордия и плодового тела, всего ДЭГ в этой паре – 2808, активируется – 1062, репрессируется – 1746.

Информация по общему количеству генов, ДЭГ, активированных/репрессированных генов исходя из аннотации, представлена в таблице (Таблица 9).

Таблица 9 – ДЭГ на разных стадиях развития базидиомицета *L. edodes*

Всего контингов			16231			HM-КМП	HM-ПР	HM-ПТ	КМП-ПР	ПР-ПТ
diff.exp (sig)	all	up	down			10216	5395	11201	4754	2808
						5166	2775	5567	2407	1062
						5050	2620	5634	2347	1746
Аннотация			8965 (491 named)			HM-КМП	HM-ПР	HM-ПТ	КМП-ПР	ПР-ПТ
по <i>A. bisporus</i>			diff.exp (sig)	all		6230 (338)	2772 (155)	6603 (361)	2707 (132)	1682 (77)
		up				3600	1744	3821	1401	731
		down				2630	1028	2782	1306	951
in kegg	all	sign				5011				
					3582 (2066 up)	1384 (955 up)	3788 (2371 up)	1299(818 up)	803 (392 up)	
Аннотация			6568			HM-КМП	HM-ПР	HM-ПТ	КМП-ПР	ПР-ПТ
по <i>P. rubens</i>			diff.exp(sig)	all		4672	2009	4921	1959	1199
		up				2580	1254	2766	1086	494
		down				2108	755	2155	873	705
in biocyc	all (sig)					4672	2009	4921	1959	1199
Общая аннотация			10883 (6800)			HM-КМП	HM-ПР	HM-ПТ	КМП-ПР	ПР-ПТ
diff.exp (sig)	all	up	down			7370 (4681)	3432 (2006)	7918 (4975)	3302 (1912)	2111 (1197)
						4196	2110	4467	1712	877
						3174	1322	3451	1590	1234

Примечание: В скобках указано количество генов с аннотацией, в случае с аннотацией по *A. bisporus* аннотированных в базе данных KEGG, в случае с аннотацией по *P. rubens* аннотированных с помощью web-ресурса BioСус.

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; Up – активируемые гены; Down – репрессированные гены. НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордий, ПТ – плодовое тело.

5.7.4 Классификация ДЭГ по функциональным категориям с использованием базы данных KEGG и их визуализация

Чтобы определить различия в работе разных метаболических путей на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* с помощью сделанной нами аннотации и авторского скрипта, выявленные ДЭГ группировали в функциональные категории в соответствии с информацией, представленной в базах данных KEGG. Группы генов из KEGG <https://bit.ly/2EDuksN>, как они представлены для *A. bisporus*, а также на основе поиска гомологии к белкам 20 референсных организмов, белки *L. edodes* были распределены по тем же категориям. Гены были собраны в функциональные категории с оценкой насыщенности метаболического пути активируемыми/репрессируемыми генами. На основе проведенного анализа мы получили 140 функциональных категорий и метаболических путей, насыщенных транскриптами ДЭГ в трех группах сравнения: коричневая мицелиальная пленка относительно непигментированного мицелия, примордий относительно мицелия и плодовое тело относительно примордия. Было подсчитано общее количество генов и из них ДЭГ в каждой группе сравнения. Метаболические пути, в которых репрессируемых генов содержится большее количество, были помечены синим цветом, если путь представлен большим содержанием активированных генов – красным цветом. Обращает на себя внимание большое количество активированных категорий при формировании коричневой мицелиальной пленки и примордий по сравнению с непигментированным мицелием, это объясняется перестройкой метаболизма грибных клеток на данных стадиях онтогенеза, поэтому большая часть метаболических путей находится в активации. В клетках плодового тела относительно примордия напротив, гораздо больше функциональных категорий находится в репрессии, что говорит о некотором замедлении метаболизма в ряде клеточных процессов. Также стоит отметить большое количество дифференциально не экспрессирующихся генов (нДЭГ) относительно примордий, что указывает на сходство данных морфоструктур по целому ряду физиологических процессов. Информация по метаболическим путям на разных стадиях онтогенеза представлена в таблице (Таблица 10).

*Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию «Хранение, передача и реализация генетической информации» на разных стадиях онтогенеза *L. edodes**

Было установлено, что метаболические пути, ответственные за хранение, передачу и реализацию генетической информации, на стадиях коричневой мицелиальной пленки и примордия по сравнению с непигментированным мицелием, насыщены в основном репрессируемыми генами (Таблица 11). В репрессии на данных стадиях онтогенеза находится большее количество генов, отвечающих за работу общих факторов транскрипции. Базальные транскрипционные факторы (GTF), представляют собой класс белковых транскрипционных

Таблица 10 – Общий анализ активации/репрессии функциональных групп генов в процессе онтогенеза *L. edodes* с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути (KEGG)	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
2-Oxocarboxylic acid metabolism	32	0,366	19	0,534	14	0,369	4
ABC transporters	10	0,652	7	0,731	6	-0,307	4
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	23	0,776	13	0,647	8	0,225	3
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	48	0,670	30	0,485	21	0,288	9
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	34	0,316	9	0,579	13	0,620	7
Aminobenzoate degradation	11	-0,313	4	0,508	4	-0,594	3
AMPK signaling pathway	24	0,722	18	0,643	10	0,398	2
Apoptosis	20	0,719	14	0,605	10	0,340	2
Arachidonic acid metabolism	9	0,302	6		4		3
Arginine and proline metabolism	31	0,276	18	0,393	7	-0,659	7
Arginine biosynthesis	15	0,744	10	0,659	8	0,412	3
Ascorbate and aldarate metabolism	10	-0,435	4	-0,628	4	-0,915	4
Autophagy - other	20	0,441	12	0,357	6	0,283	2
Autophagy - yeast	51	0,491	34	0,344	14	0,286	5
Basal transcription factors	27	-0,461	13	-0,305	6	-0,144	0
Base excision repair	24	-0,541	16	-0,632	8	0,637	7
beta-Alanine metabolism	17	0,616	9	-0,244	5	-0,801	5
Biosynthesis of amino acids	103	0,445	59	0,528	44	0,203	12
Biosynthesis of antibiotics	216	0,411	117	0,332	73	0,231	46
Biosynthesis of secondary metabolites	295	0,401	157	0,329	101	-0,281	60
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	17	0,587	10	0,461	4	0,461	8
Biotin metabolism	7	0,268	5		1		0
Butanoate metabolism	16	0,628	10	0,373	5	-0,457	4
Calcium signaling pathway	14	0,505	13	0,470	7	0,629	4
cAMP signaling pathway	17	0,499	11	0,691	11	0,212	1
Carbon metabolism	95	0,572	49	0,380	33	-0,527	18
Cell cycle	53	0,286	30	0,255	12	0,774	26
Cell cycle - yeast	76	0,409	48	0,493	22	0,779	35
Cellular senescence	27		22		16		7
cGMP-PKG signaling pathway	18	0,475	15	0,594	11	0,450	4
Citrate cycle (TCA cycle)	28	0,681	16	0,604	10	0,240	3
Cyanoamino acid metabolism	17	-0,412	11	-0,365	7	-0,664	3
Cysteine and methionine metabolism	37	-0,312	24	-0,258	17	-0,246	6
Degradation of aromatic compounds	20	0,556	10	-0,388	12	-0,577	10
DNA replication	32	-0,575	21	-0,543	9	0,807	18
Drug metabolism - cytochrome P450	13	-0,708	9	-0,402	10	-0,559	6
Drug metabolism - other enzymes	5		5		3		0
Endocytosis	55	-0,426	36	0,271	19	0,302	5
Ether lipid metabolism	5	-0,420	2		2		2
Fatty acid biosynthesis	10	0,410	8	-0,444	2		1
Fatty acid degradation	23	-0,318	12	-0,429	6	-0,685	10
Fatty acid elongation	5		4		1		4
Fatty acid metabolism	27	0,547	16	0,296	6	0,340	11
Ferroptosis	6		5		2		3
Folate biosynthesis	12	0,366	7	0,477	2	-0,615	1
FoxO signaling pathway	21	0,616	10	0,609	10	0,416	8
Fructose and mannose metabolism	21	0,317	11	-0,526	9	-0,755	7
Galactose metabolism	19	0,498	10	0,391	9	-0,478	6
Glutathione metabolism	29	-0,266	20	0,353	16	0,320	8
Glycerolipid metabolism	27	0,247	11	0,322	12	-0,603	10
Glycerophospholipid metabolism	36	0,337	19	0,414	14	0,404	8
Glycine, serine and threonine metabolism	34	0,611	18	0,436	10	-0,213	5
Glycolysis / Gluconeogenesis	40	0,455	17	0,516	18	-0,673	12
Glycosaminoglycan degradation	3		2		2		1
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynt	17	0,435	11	-0,692	3	-0,406	3
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	25	0,700	17	0,446	7	-0,728	7
HIF-1 signaling pathway	20	-0,483	12	0,403	11	-0,210	3
Histidine metabolism	15	-0,495	8	0,426	5	-0,742	5
Homologous recombination	18	-0,491	12	-0,372	6	0,749	9
Inositol phosphate metabolism	20	0,344	8	-0,346	8	0,374	3
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	10	0,544	9	-0,316	6	-0,633	4
Linoleic acid metabolism	2		2		2		0
Linolenic(-alpha) acid metabolism	2		2		0		2
Lipoic acid metabolism	3		2		1		1
Lysine biosynthesis	11	-0,610	7	0,486	6	0,660	3
Lysine degradation	24	0,423	15	0,404	9	-0,610	9
Lysosome	36	0,546	20	-0,437	15	0,407	6
MAPK signaling pathway	25	0,589	18	0,663	14	0,373	3
MAPK signaling pathway - yeast	61	0,766	48	0,720	34	0,507	11
Meiosis	55	0,572	33	0,503	16	0,798	27

Название метаболического пути (KEGG)	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
Melanogenesis	14	0,577	11	0,531	10	-0,715	3
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	16	-0,719	12	-0,408	9	-0,572	8
Microbial metabolism in diverse environments	187	0,479	92	0,288	70	-0,488	48
Mismatch repair	20	-0,529	16	-0,416	6	0,785	9
Mitophagy	26	0,601	15	0,602	8	0,360	1
mRNA surveillance pathway	51	0,405	27	0,363	20	0,580	6
mTOR signaling pathway	35	0,417	24	0,449	15	0,215	4
Naphthalene degradation	16	0,591	9	0,422	9	-0,510	9
N-Glycan biosynthesis	32	0,401	17	0,345	9	-0,381	6
Necroptosis	19		15		7		7
Nicotinate and nicotinamide metabolism	14	-0,537	7	-0,358	3	0,683	3
Nitrogen metabolism	10	0,738	6	0,299	6	-0,798	3
Non-homologous end-joining	11	-0,565	9	-0,441	3	0,679	7
Nucleotide excision repair	32	-0,420	17	-0,501	9	0,659	7
One carbon pool by folate	11	0,648	6	0,583	3	0,709	5
Other glycan degradation	10	0,729	5	0,406	5	-0,557	2
Other types of O-glycan biosynthesis	12	0,724	5	0,451	3	-0,493	4
Oxidative phosphorylation	76	-0,403	42	-0,359	27	0,252	7
Pantothenate and CoA biosynthesis	16	0,287	10	0,462	6	-0,205	3
Pentose and glucuronate interconversions	20	-0,546	12	0,365	6	-0,532	8
Pentose phosphate pathway	20	-0,318	11	0,378	9	-0,695	5
Peroxisome	49	0,255	21	-0,439	15	-0,256	15
Phagosome	38	0,335	25	-0,259	13	0,450	3
Phenylalanine metabolism	15	0,375	10	0,495	5	-0,405	3
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	17	0,583	14	0,462	8	0,477	3
Phenylpropanoid biosynthesis	10	-0,581	7	-0,379	3	-0,713	3
Phosphatidylinositol signaling system	14	-0,458	8	0,342	4	0,545	2
Phospholipase D signaling pathway	17	0,664	10	0,567	7	-0,199	1
PI3K-Akt signaling pathway	35	0,581	24	0,614	16	0,464	8
Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	11	0,734	6	0,585	6	-0,534	8
PPAR signaling pathway	16	0,410	9	0,209	1	0,470	5
Propanoate metabolism	16	0,432	6	0,225	2	-0,540	3
Proteasome	35	-0,765	24	0,156	5	0,532	1
Protein export	20	-0,472	7	-0,467	7	0,484	2
Protein processing in endoplasmic reticulum	82	0,432	43	0,380	20	0,416	12
Purine metabolism	78	-0,410	42	-0,497	26	0,559	20
Pyrimidine metabolism	63	-0,544	38	-0,441	22	0,595	17
Pyruvate metabolism	39	0,490	28	0,272	18	-0,576	11
Rap1 signaling pathway	16	0,738	11	0,632	8	-0,313	1
Ras signaling pathway	24	0,447	16	0,591	10	0,157	1
Retinol metabolism	6		5		4		1
Riboflavin metabolism	11	-0,726	7	0,328	3	-0,504	2
Ribosome	98	-0,587	55	-0,487	35	0,585	24
Ribosome biogenesis in eukaryotes	65	-0,392	36	-0,264	15	0,642	19
RNA degradation	46	0,414	29	0,313	22	0,492	3
RNA polymerase	25	-0,649	16	-0,694	12	0,507	6
RNA transport	99	-0,329	68	-0,238	35	0,419	19
SNARE interactions in vesicular transport	16	-0,457	12	-0,424	5	0,341	0
Sphingolipid metabolism	23	0,565	13	-0,499	10	-0,436	5
Sphingolipid signaling pathway	28	0,720	19	0,535	13	0,326	2
Spliceosome	89	-0,586	64	-0,413	30	0,506	17
Starch and sucrose metabolism	48	0,667	31	0,570	18	-0,339	11
Steroid biosynthesis	15	0,423	9	-0,596	5	0,709	9
Steroid hormone biosynthesis	5		4		3		3
Styrene degradation	4		3		1		1
Sulfur metabolism	16	0,398	9	0,299	5	0,280	3
Sulfur relay system	7	0,534	7		1		1
Taurine and hypotaurine metabolism	9	0,624	9		4		2
Terpenoid backbone biosynthesis	17	0,291	13	-0,432	5	0,325	3
Thiamine metabolism	10	-0,480	6	0,397	0	-0,388	4
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	8		7		4		2
Tryptophan metabolism	35	-0,414	21	-0,446	12	-0,688	13
Two-component system	14	0,711	10	0,587	4	0,628	2
Tyrosine metabolism	23	0,317	15	-0,405	12	-0,633	8
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	11	0,481	8	-0,336	5	0,442	5
Ubiquitin mediated proteolysis	58	0,356	41	0,476	19	0,354	5
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	12	0,351	8	0,564	7	-0,275	0
Valine, leucine and isoleucine degradation	32	0,462	13	-0,363	8	-0,548	8
Various types of N-glycan biosynthesis	22	0,493	10	0,411	8	-0,589	6
Vitamin B6 metabolism	5	-0,786	1		2		1

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка; ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

факторов, которые связываются с определенными сайтами (промоторами) на ДНК для активации транскрипции генетической информации от ДНК к матричной РНК. Для осуществления транскрипции необходимы общие факторы транскрипции, они принимают непосредственное участие в процессе регуляции генов, и большинство из них жизненно необходимы (Latchman, 1997). В репрессии находятся гены, отвечающих за работу общих факторов транскрипции (basal transcription factors), процесс репликации ДНК, гомологичной рекомбинации и нехомологичной репарации разрывов в ДНК (non-homologous end-joining), системы распознавания и устранения ошибок (mismatch repair), возникающих в процессе репликации и рекомбинации ДНК. Также среди репрессированных находится клеточный механизм эксцизионного восстановления оснований (base excision repair), который восстанавливает поврежденную ДНК, удаляя из генома небольшие, не искажающие спираль повреждения оснований и связанный с ним путь эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair), устраняющий объемные повреждения, искажающие спираль (Liu *et al.*, 2007). На работу данного механизма влияют различные факторы, в том числе тип поражения, стадия клеточного цикла, а также является ли клетка терминально дифференцированной или активно делящейся (Gellon *et al.*, 2008).

Таблица 11 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Хранение, передача и реализация генетической информации» с использованием базы данных KEGG

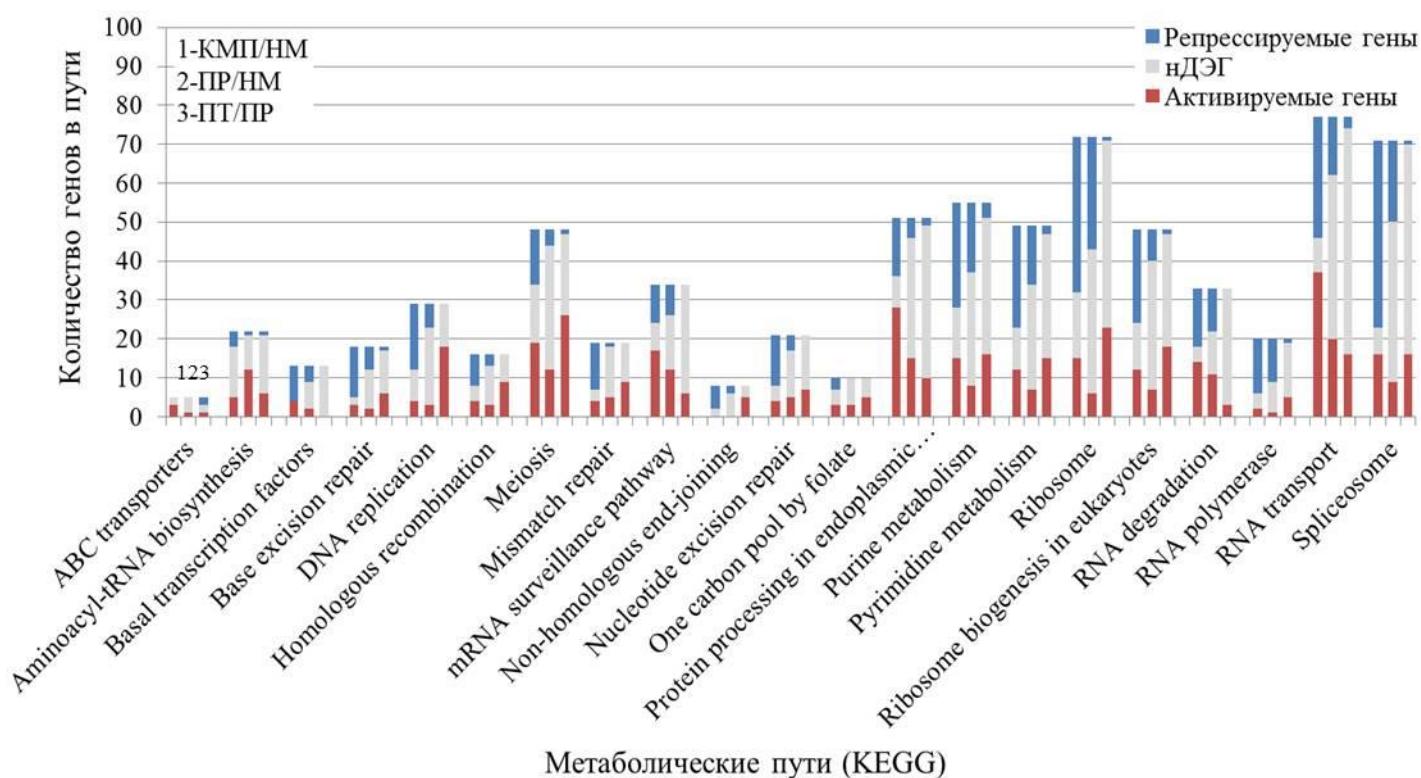
Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
ABC transporters	10	0,652	7	0,731	6	-0,307	4
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	34	0,316	9	0,579	13	0,620	7
Basal transcription factors	27	-0,461	13	-0,305	6	-0,144	0
Base excision repair	24	-0,541	16	-0,632	8	0,637	7
DNA replication	32	-0,575	21	-0,543	9	0,807	18
Homologous recombination	18	-0,491	12	-0,372	6	0,749	9
Meiosis	55	0,572	33	0,503	16	0,798	27
Mismatch repair	20	-0,529	16	-0,416	6	0,785	9
mRNA surveillance pathway	51	0,405	27	0,363	20	0,580	6
Non-homologous end-joining	11	-0,565	9	-0,441	3	0,679	7
Nucleotide excision repair	32	-0,420	17	-0,501	9	0,659	7
One carbon pool by folate	11	0,648	6	0,583	3	0,709	5
Protein processing in endoplasmic reticulum	82	0,432	43	0,380	20	0,416	12
Purine metabolism	78	-0,410	42	-0,497	26	0,559	20
Pyrimidine metabolism	63	-0,544	38	-0,441	22	0,595	17
Ribosome	98	-0,587	55	-0,487	35	0,585	24
Ribosome biogenesis in eukaryotes	65	-0,392	36	-0,264	15	0,642	19
RNA degradation	46	0,414	29	0,313	22	0,492	3
RNA polymerase	25	-0,649	16	-0,694	12	0,507	6
RNA transport	99	-0,329	68	-0,238	35	0,419	19
Spliceosome	89	-0,586	64	-0,413	30	0,506	17

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессированными генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Категория метаболизма пуринов и пиримидинов (purine and pyrimidine metabolism), входящих в состав нуклеотидов и нуклеозидов, необходимых для хранения, транскрипции и трансляции генетической информации, также находится в репрессии. Отмечена репрессия в процессах транспорта РНК, работе РНК-полимеразы, функционировании внутриклеточных органелл рибосом и ядерных структур сплайсосом, осуществляющих сплайсинг – удаление некодирующих последовательностей (интронов) из предшественников мРНК (Таблица 11).

Надо отметить, что хотя и наблюдается замедление вышеуказанных процессов, отражающееся в репрессии большого количества генов данных категорий, однако подавляющее число генов, отнесенных к метаболическим путям, ответственным за хранение, передачу и реализацию генетической информации, дифференциально не экспрессируются относительно мицелия (Рисунок 36). Это логично, поскольку данные процессы происходят в клетках постоянно и необходимы на протяжении всего жизненного цикла организмов.



Группы сравнения: 1 – коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР);
ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессированные отмечены синим цветом);
нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 36 – Метаболические пути и функциональные категории «Хранение, передача и реализация генетической информации», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

В клетках коричневой мицелиальной пленки и примордия функциональные категории насыщенные активными генами были мейоз, АТФ-синтаза-связывающие кассетные

транспортёры (транслоказы), представляющие собой надсемейство генов связанных с транспортными системами, которые катализируют перемещение различных субстратов, молекул и ионов через клеточную мембрану или их разделение внутри мембран, также они участвуют в процессах трансляции и репарации ДНК (Jones and George, 2004). В активации находится аминокислота-тРНК (транспортная РНК), которая доставляет родственную ей аминокислоту к рибосоме для включения в полипептидную цепь, образующуюся во время трансляции. Активными были также путь наблюдения за мРНК – механизм контроля качества, который обнаруживает и разрушает аномальные мРНК, деградация РНК и путь контроля качества и обработки белков в ЭПР. А также одноуглеродный метаболизм фолатов (one carbon pool by folate), основные функции которого заключаются в продукции пуринов и пиримидинов для биосинтеза нуклеиновых кислот, продукции цистеина и предоставлении метильной группы при метилировании ДНК, РНК, белков и липидов (Рисунок 36).

В клетках плодовых тел практически все функциональные категории, ответственные за хранение, передачу и реализацию генетической информации, представлены активированными генами, что логично, поскольку в базидиях плодовых тел происходит половой процесс, рекомбинация генетического материала. Также, большое количество генов данной морфоструктуры дифференциально не экспрессируются относительно примордия, что указывает на схожесть метаболизма данных морфоструктур (Таблица 11, рисунок 36).

Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию «Клеточное дыхание»

Функциональные категории, попадающие под определение «Клеточное дыхание» напротив представлены в основном активированными генами на стадиях коричневой мицелиальной пленки и примордия относительно вегетативного непигментированного мицелия, а в плодовых телах гены данных метаболических путей в основном дифференциально не экспрессируются относительно примордия, либо находятся в репрессии (Таблица 12). Метаболический путь 2-оксокарбоновых кислот (2-Oxocarboxylic acid metabolism) насыщен транскриптами активированных генов как на стадии мицелиальной пленки, так и на генеративных стадиях развития, в примордии и плодовом теле. 2-Оксокарбоновые кислоты (пировиноградная, щавелеуксусная, α -кетоглутаровая кислоты) имеют кетогруппу, примыкающую к карбоновой кислоте, они особенно важны, поскольку участвуют в цикле Кребса и в гликолизе.

Метаболизм пировиноградной кислоты может идти несколькими путями. При недостатке кислорода в цитозоле из пировиноградной кислоты происходит биосинтез молочной кислоты с помощью фермента лактатдегидрогеназы (Zhang *et al.*, 2007). При достаточном количестве кислорода молекула пирувата декарбоксилируется с образованием ацетил-СоА митохондриальным пируватдегидрогеназным комплексом. Ацетил СоА взаимодействует с

оксалоацетатом с образованием лимонной кислоты (Peksel *et al.*, 2002). Либо, метаболизм пирувата у грибов может происходить с помощью ферментов пируваткарбоксилаз с фиксацией CO_2 с образованием щавелевоуксусной кислоты (у грибов были обнаружены митохондриальные и цитоплазматические пируваткарбоксилазы). Оксалоацетат, в случае синтеза в цитоплазме, может транспортироваться в митохондрию и включаться в цикл трикарбоновых кислот, либо он может быть преобразован в яблочную кислоту цитоплазматической или митохондриальной малатдегидрогеназой (Pel *et al.*, 2007). Изолимонная кислота в цикле Кребса декарбоксилируется НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназой до α -кетоглутарата и подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием сукцинил-СоА. Далее превращение сукцинил-СоА в янтарную кислоту катализируется ферментом сукцинил-СоА синтазой и сопровождается образованием АТФ. α -Кетоглутарат участвует в передаче сигналов клетками, функционируя как кофермент (Pel *et al.*, 2007).

Таблица 12 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Клеточное дыхание» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
2-Oxocarboxylic acid metabolism	32	0,366	19	0,534	14	0,369	4
Glycolysis / Gluconeogenesis	40	0,455	17	0,516	18	-0,673	12
Pyruvate metabolism	39	0,490	28	0,272	18	-0,576	11
Citrate cycle (TCA cycle)	28	0,681	16	0,604	10	0,240	3
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	25	0,700	17	0,446	7	-0,728	7
Oxidative phosphorylation	76	-0,403	42	-0,359	27	0,252	7
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	11	0,481	8	-0,336	5	0,442	5

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

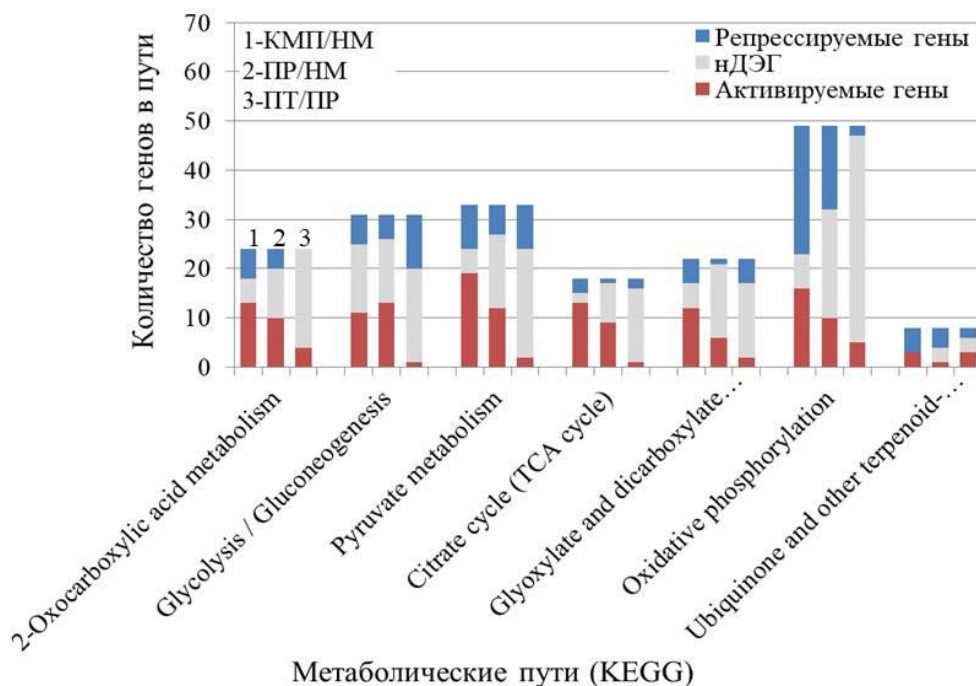
ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Согласно информации, представленной в базе данных KEGG в мицелиальной пленке большинство генов, ответственных за метаболизм 2-оксокарбоновых кислот, активированы, в примордии относительно непигментированного мицелия равное количество генов либо активированы, либо дифференциально не экспрессируются. Небольшое количество генов (1/6) находятся в репрессии. В плодовых телах относительно примордия лишь немногие гены активны, подавляющее большинство генов на данной стадии онтогенеза дифференциально не экспрессируются (Рисунок 37). Также на стадиях мицелиальной пленки и примордия в активации находится метаболический путь «Гликолиз/Глюконеогенез». Гликолиз является общим путем, как для анаэробного, так и для аэробного дыхания; у аэробов он предшествует собственно клеточному дыханию, это процесс расщепления молекулы глюкозы на две молекулы пирувата с

сохранением энергии, высвобождаемой в ходе этого процесса в виде аденозинтрифосфата (АТФ) и никотинамидадениндинуклеотида (НАДН). Глюконеогенез приводит к образованию глюкозы из определенных неуглеводных углеродных субстратов, этот метаболический процесс присутствует во всех организмах. Образовавшаяся в ходе гликолиза пировиноградная кислота (пируват) – конечный продукт гликолиза – под действием пируватдегидрогеназного комплекса распадается на углекислый газ и ацетальдегид, который вместе с коферментом А образует Ацетил-КоА, реакция сопровождается восстановлением НАД до НАДН. Пировиноградная кислота выступает в качестве «точки пересечения» многих метаболических путей. Пируват может быть превращен обратно в глюкозу в процессе глюконеогенеза, или в жирные кислоты или энергию через ацетил-КоА, в аминокислоту аланин, или в этанол. Ацетил-КоА вступает в качестве основного субстрата в цикл трикарбоновых кислот, основного процесса, обеспечивающего снабжение клеток энергией в аэробных условиях и поставляющего различные промежуточные продукты для многочисленных биосинтетических реакций. Это общий конечный этап окисления до углекислого газа (CO_2) и воды (H_2O) углеводов (преимущественно глюкозы), жиров (жирных кислот) и белков (аминокислот).

У грибов также представлен глиоксилатный цикла (видоизмененный цикл трикарбоновых кислот), который служит для превращения ацетил-КоА в сукцинат, использующийся для синтеза углеводов. При недостатке глюкозы он обеспечивает утилизацию простых углеродных соединений в качестве источника углерода (Сазанова и др., 2022). Все перечисленные выше метаболические пути представлены активированными генами на стадиях мицелиальной пленки и примордия и репрессированными в клетках плодового тела. Однако, стоит обратить внимание, что большинство генов нДЭГ, то есть работают схожим образом по отношению к предыдущей стадии онтогенеза непигментированному мицелию. Совокупность биохимических реакций, попадающая под определение «клеточное дыхание», необходима и постоянно происходит в клетках живых организмов. В ходе этих реакций осуществляется расщепление углеводов, липидов и аминокислот до углекислого газа и воды, при этом выделяется энергия, которая используется клеткой во множестве процессов – для движения, роста, создания необходимых клеточных структур и т.д. (Рисунок 37).

Последний этап клеточного дыхания – окислительное фосфорилирование – метаболический путь, в котором клетки используют ферменты для окисления питательных веществ, высвобождая химическую энергию для производства аденозинтрифосфата (АТФ). Гены, ответственные за биосинтез убихинона (коэнзим Q10), который является одним из основных компонентов дыхательной цепи митохондрий (транспорт электронов по электронтранспортной цепи) и обеспечивающий энергетический обмен клеток, находились в репрессии в клетках мицелиальной пленки и в примордии. В клетках плодовых тел данные категории представлены в большинстве активными генами (Таблица 12, рисунок 37).



Группы сравнения: 1– коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые – синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 37 – Метаболические пути и функциональные категории «Клеточное дыхание», насыщенные транскриптами ДЭГ базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию «Углеводный обмен»

Совокупность биохимических процессов происходящих в клетках живых организмов, отвечающих за метаболическое образование, расщепление и взаимопревращение углеводов, попадает под определение «Углеводный обмен». Грибы расщепляют сахара (углеводы) растений и используют клеточное дыхание для расщепления этих накопленных углеводов, чтобы сделать энергию доступной для клеток. Высвобожденная энергия временно хранится в виде высокоэнергетических молекул, таких как аденозинтрифосфат (АТФ), для использования в различных клеточных процессах. Категории, связанные с метаболизмом углеводов (анаболизм, катаболизм), в клетках коричневой мицелиальной пленки и примордия относительно непигментированного мицелия, насыщены транскриптами активированных генов (Таблица 13).

Центральный метаболизм углерода, представляющий собой серию ферментативных этапов по превращению сахаров в метаболические предшественники, из которых строится вся биомасса клетки, и метаболические пути гликолиз/глюконеогенез активированы на данных стадиях онтогенеза (Таблица 13, рисунок 38). Фруктоза (посредник в метаболизме глюкозы) вместе с глюкозой и галактозой являются тремя пищевыми моносахаридами. Манноза играет

важную роль в N-связанном гликозилировании белков. На клеточном уровне D-манноза и ее производные являются ключевыми метаболитами для большинства гликозилирующих реакций. Катаболизм фруктозы и маннозы обеспечивает критически важные компоненты для биосинтеза нуклеотидных сахаров. Глюкоза распределяется по клеткам, где ее либо расщепляют на энергию через клеточное дыхание, либо хранят как гликоген. Метаболизм данных углеводов здесь также активирован (Таблица 13).

Таблица 13 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Углеводный обмен» с использованием базы данных KEGG

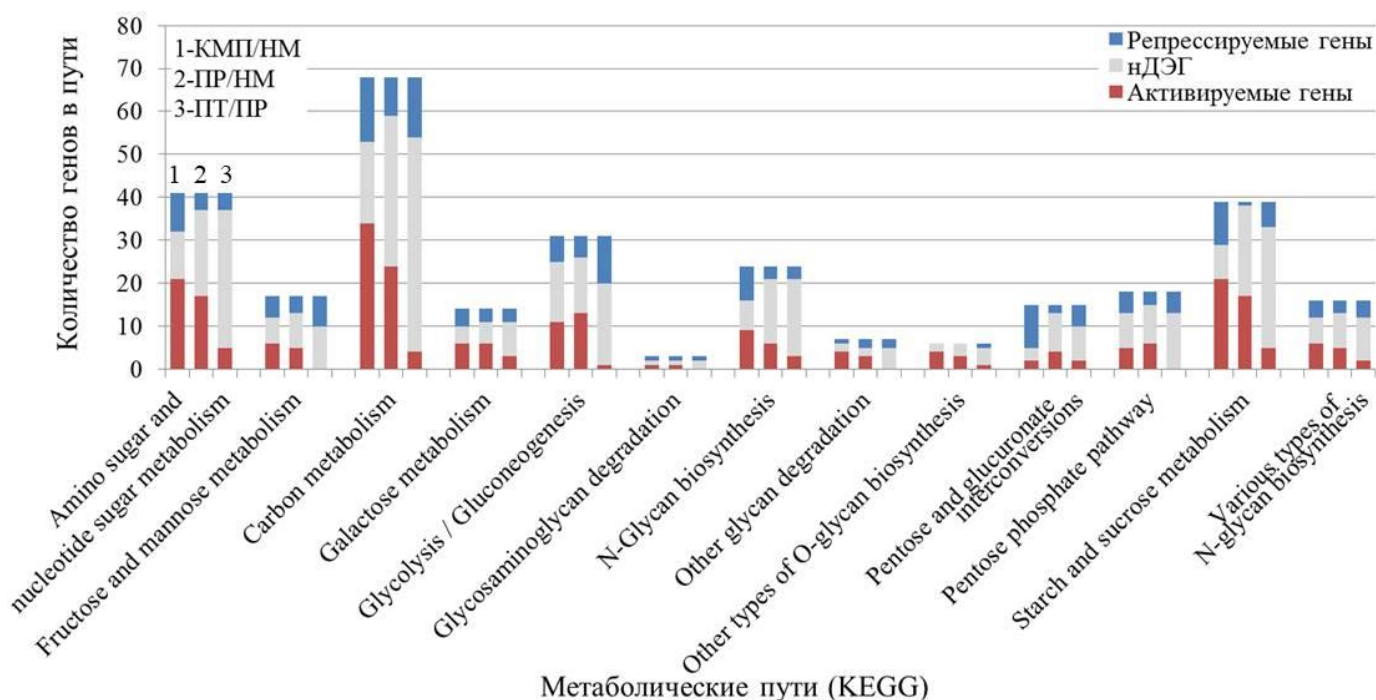
Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	48	0,670	30	0,485	21	0,288	9
Carbon metabolism	95	0,572	49	0,380	33	-0,527	18
Fructose and mannose metabolism	21	0,317	11	-0,526	9	-0,755	7
Galactose metabolism	19	0,498	10	0,391	9	-0,478	6
Glycolysis / Gluconeogenesis	40	0,455	17	0,516	18	-0,673	12
Glycosaminoglycan degradation	3		2		2		1
N-Glycan biosynthesis	32	0,401	17	0,345	9	-0,381	6
Other glycan degradation	10	0,729	5	0,406	5	-0,557	2
Other types of O-glycan biosynthesis	12	0,724	5	0,451	3	-0,493	4
Pentose and glucuronate interconversions	20	-0,546	12	0,365	6	-0,532	8
Pentose phosphate pathway	20	-0,318	11	0,378	9	-0,695	5
Starch and sucrose metabolism	48	0,667	31	0,570	18	-0,339	11
Various types of N-glycan biosynthesis	22	0,493	10	0,411	8	-0,589	6

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом). ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Также активными здесь были функциональные категории, связанные с биосинтезом и метаболизмом гликозаминогликанов, О-гликанов и N-гликанов. В клетках грибов олигосахариды обычно присоединяются к другим макромолекулам, образуя гликоконъюгаты для выполнения своих биологических функций (Hanson *et al.*, 2004). N-сцепленное гликозилирование является одной из наиболее распространенных и сложных посттрансляционных модификаций белков, которая влияет на различные биологические процессы. N-гликаны играют важную роль в передаче сигналов, ответе на стресс и патогены, пролиферации клеток, такие как опосредованное лектином сворачивание белка в системе контроля качества ЭПР и связанные пути деградации (Helenius and Aebi, 2004; Roth and Zuber, 2017). В клетках грибов гликан, присоединенный к аспарагину, почти неизбежно представляет собой N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) в β -конфигурации, основной компонент полисахарида хитина.

Интересной функциональной категорией, насыщенной активированными генами в клетках мицелиальной пленки и примордия, является метаболизм крахмала. Грибной крахмал отличается

от растительного крахмала, он не производится в пластидах, не встречается в гранулированной форме, является в основном компонентом клеточной стенки, и состоит только из короткоцепочечных молекул амилозы. Обычно крахмал считается запасным углеводом, однако грибной крахмал, не является таковым, поскольку представляет собой короткие, неразветвленные цепи и как компонент клеточной стенки спор или гиф он находится вне протопласта и, таким образом, не является легкодоступным в качестве источника энергии (Dodd and McCracken, 1972).



Группы сравнения: 1 – коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 38 – Метаболические пути и функциональные категории «Углеводный обмен», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Метаболические пути взаимопревращения пентозы и глюкуроната, а также пентозофосфатный путь находились в активации в клетках примордия и в репрессии в мицелиальной пленке относительно мицелия (Таблица 13, рисунок 38). Пентозофосфатный путь является метаболическим путем, параллельным гликолизу (альтернативный путь окисления глюкозы, хотя данный путь включает в себя окисление глюкозы, его основная роль анаболическая). Он генерирует NADPH и пентозы (пятиуглеродные сахара), а также рибоза-5-фосфат, предшественник для синтеза нуклеотидов и эритрозы-4-фосфата (E4P) используется при синтезе ароматических аминокислот. Ароматические аминокислоты, в свою очередь, являются предшественниками многих путей биосинтеза, включая лигнин в древесине.

В плодовом теле практически все данные категории находятся в репрессии (Таблица 13). Исключение представлено активированной категорией метаболизма аминсахаров, самым распространенным моносахаридом является глюкозамин, важный предшественник в синтезе гликозилированных белков и липидов, N-ацетил-D-глюкозамин, является основным компонентом полисахарида хитина, основного компонента клеточных стенок грибов. А также метаболизм нуклеотидных сахаров, активированных форм моносахаридов, выступающих в качестве доноров сахарных остатков в реакциях гликозилирования, в результате метаболизма которых образуются полисахариды. Данные молекулы необходимы для синтеза гликоконъюгатов на поверхности организмов, они являются факторами вирулентности и компонентами клеточной стенки грибов. Снова стоит подчеркнуть, что большинство генов дифференциально не экспрессируются на стадиях мицелиальной пленки, в примордии и плодовом теле относительно непигментированного мицелия, что указывает на активный метаболизм в данных функциональных категориях в клетках всех стадий онтогенеза (Рисунок 38).

Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, отвечающих за «Биосинтез и метаболизм аминокислот»

В живых клетках постоянно происходит процесс синтеза и катаболизма аминокислот. Большую роль в метаболизме аминокислот играют обратимые реакции трансаминирования, в результате которых синтезируются заменимые аминокислоты из соответствующих α -кетокислот, таким образом происходит перераспределение аминного азота в организме. В реакциях трансаминирования чаще всего участвуют аминокислоты, содержание которых в тканях значительно выше остальных – глутамат, аланин, аспартат и соответствующие им кетокислоты – α -кетоглутарат, пироват и оксалоацетат. Катаболизм аминокислот происходит через реакцию дезаминирования (отщепления α -аминогруппы от аминокислоты), в результате чего образуется соответствующая α -кетокислота (безазотистый остаток), которая затем окисляется в цикле трикарбоновых кислот и выделяется молекула аммиака. Группа генов, участвующих в метаболизме заменимых аминокислот аланина, аспартата и глутамата, в клетках коричневой мицелиальной пленки и примордия относительно непигментированного мицелия, в большинстве активированы, половина генов дифференциально не экспрессируется (Таблица 14).

Клетки плодовых тел мало отличаются в плане экспрессии генов, продукты которых вовлечены в метаболизм аминокислот, наблюдается преобладание нДЭГ. Метаболизм аргинина и пролина является одним из центральных путей биосинтеза данных аминокислот из глутамата. Аргинин играет большую роль в белковом обмене, в частности участвует в синтезе мочевины, также он является предшественником полиаминов и оксида азота (NO) и важным метаболитом для многих клеточных процессов и процессов развития. Метаболит аргинина орнитин является предшественником различных соединений, включая полиамины и пролин, и выполняет важные

функции в клеточной пролиферации. Например, известно, что во время развития плодовых тел базидиомицетов уровень орнитина повышается, что свидетельствует о важности метаболизма данной аминокислоты при образовании базидиом (Wagemaker *et al.*, 2007). Гены в данной функциональной категории были активны в клетках мицелиальной пленки и генеративных образований, как в примордиях, так и в плодовых телах (Таблица 14, рисунок 39).

Таблица 14 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Биосинтез и метаболизм аминокислот» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	23	0,776	13	0,647	8	0,225	3
Arginine and proline metabolism	31	0,276	18	0,393	7	-0,659	7
Arginine biosynthesis	15	0,744	10	0,659	8	0,412	3
beta-Alanine metabolism	17	0,616	9	-0,244	5	-0,801	5
Biosynthesis of amino acids	103	0,445	59	0,528	44	0,203	12
Cyanoamino acid metabolism	17	-0,412	11	-0,365	7	-0,664	3
Cysteine and methionine metabolism	37	-0,312	24	-0,258	17	-0,246	6
Glycine, serine and threonine metabolism	34	0,611	18	0,436	10	-0,213	5
Histidine metabolism	15	-0,495	8	0,426	5	-0,742	5
Lysine biosynthesis	11	-0,610	7	0,486	6	0,660	3
Lysine degradation	24	0,423	15	0,404	9	-0,610	9
Phenylalanine metabolism	15	0,375	10	0,495	5	-0,405	3
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	17	0,583	14	0,462	8	0,477	3
Tryptophan metabolism	35	-0,414	21	-0,446	12	-0,688	13
Tyrosine metabolism	23	0,317	15	-0,405	12	-0,633	8
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	12	0,351	8	0,564	7	-0,275	0
Valine, leucine and isoleucine degradation	32	0,462	13	-0,363	8	-0,548	8

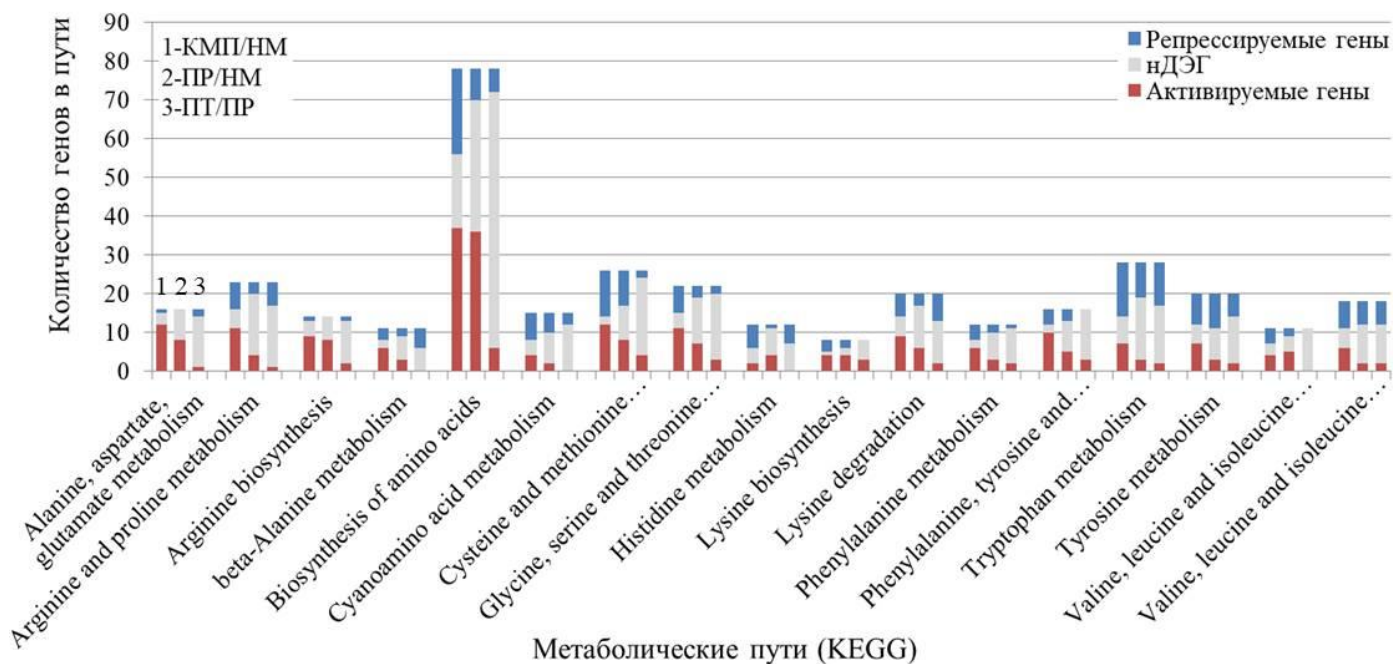
Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Метаболизм глутамата в орнитин, аргинин, пролин и полиамины представляет собой основную сеть путей метаболизма азота, которая также производит промежуточные продукты, такие как оксид азота и γ -аминомасляная кислота, которые играют решающую роль в развитии и стрессе (Majumdar *et al.*, 2016). Активация генов, связанных с биосинтезом и метаболизмом аминокислот аргинина и пролина, отмечена на стадиях мицелиальной пленки и примордия, в плодовых телах данные гены большей частью дифференциально не экспрессируются, часть генов находится в репрессии (Таблица 14, рисунок 39).

Таким образом, на стадиях коричневой мицелиальной пленки и примордия по сравнению с непигментированным мицелием, функциональные категории, связанные с биосинтезом и метаболизмом аминокислот, представлены в основном активируемыми генами. Исключение представляют категории, связанные с метаболизмом серосодержащих аминокислот, которые находились в репрессии: цистеина, поддерживающего пространственную структуру белка, улучшающего энергообмен, и метионина, необходимого для синтеза цистеина. А также

гистидина, участвующего во многих ферментативных реакциях, выступая в роли доноров или акцепторов электронов, лизина, участвующего в производстве гормонов и энергии, необходимого для усвоения кальция и триптофана, входящего в состав белков всех организмов. В клетках плодовых тел в сравнении с примордиями биосинтез и метаболизм аминокислот в основном находится в репрессии, однако больше половины генов в разных функциональных категориях дифференциально не экспрессируются (Таблица 14, рисунок 39).



Группы сравнения: 1 – коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессированные отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 39 – Метаболические пути «Биосинтез и метаболизм аминокислот», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию «Биосинтез и метаболизм липидов»

В функциональных категориях, попадающих под определение «Биосинтез и метаболизм липидов», прослеживаются изменения в биосинтезе, деградации и элонгации жирных кислот, важных источников метаболической энергии и строительных блоков мембранных липидов, поскольку входят в состав фосфолипидов, также они могут служить резервуаром энергии в виде триацилглицеринов и стерильных эфиров, хранящихся в каплях липидов. Существует две группы жирных кислот: насыщенные и ненасыщенные, их соотношение влияет на текучесть мембраны. Вязкость мембраны может влиять на диффузию и движение белков и других биомолекул, влияя на их активность. Наиболее распространенной жирной кислотой в грибах

является стеариновая кислота (насыщенная), она превращается в олеиновую, а затем в линолевую и α -линоленовую кислоту (ненасыщенные) с помощью десатураз (Los and Murata 2004). Наличие эссенциальных жирных кислот – линолевой и линоленовой, сближает грибы с растениями. Особенно много линолевой кислоты в липидах Basidiomycota, содержание которой может достигать более 70% от суммы жирных кислот. Этим базидиомицеты отличаются от аскомицетов и мукоровых грибов (Феофилова и др., 2013).

На стадиях примордий и плодовых тел данная категория насыщена активированными генами (Таблица 15, рисунок 40). Жирные кислоты могут влиять на рост грибов, например ненасыщенные (линолевая и линоленовая) жирные кислоты изменяют рост мицелия грибов, которые растут в различных физиологических и пищевых условиях, требующих непрерывной адаптации мембранных липидов. Липид-модифицирующие ферменты регулируют пространственную и временную продукцию липидных метаболитов, участвующих в передаче сигналов и пролиферации мембран. Эта пространственно-временная модуляция необходима для создания внутриклеточных компартментов или изменения состава липидных бислоев (Agoramoorthy *et al.*, 2007).

Таблица 15 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Биосинтез и метаболизм липидов» с использованием базы данных KEGG

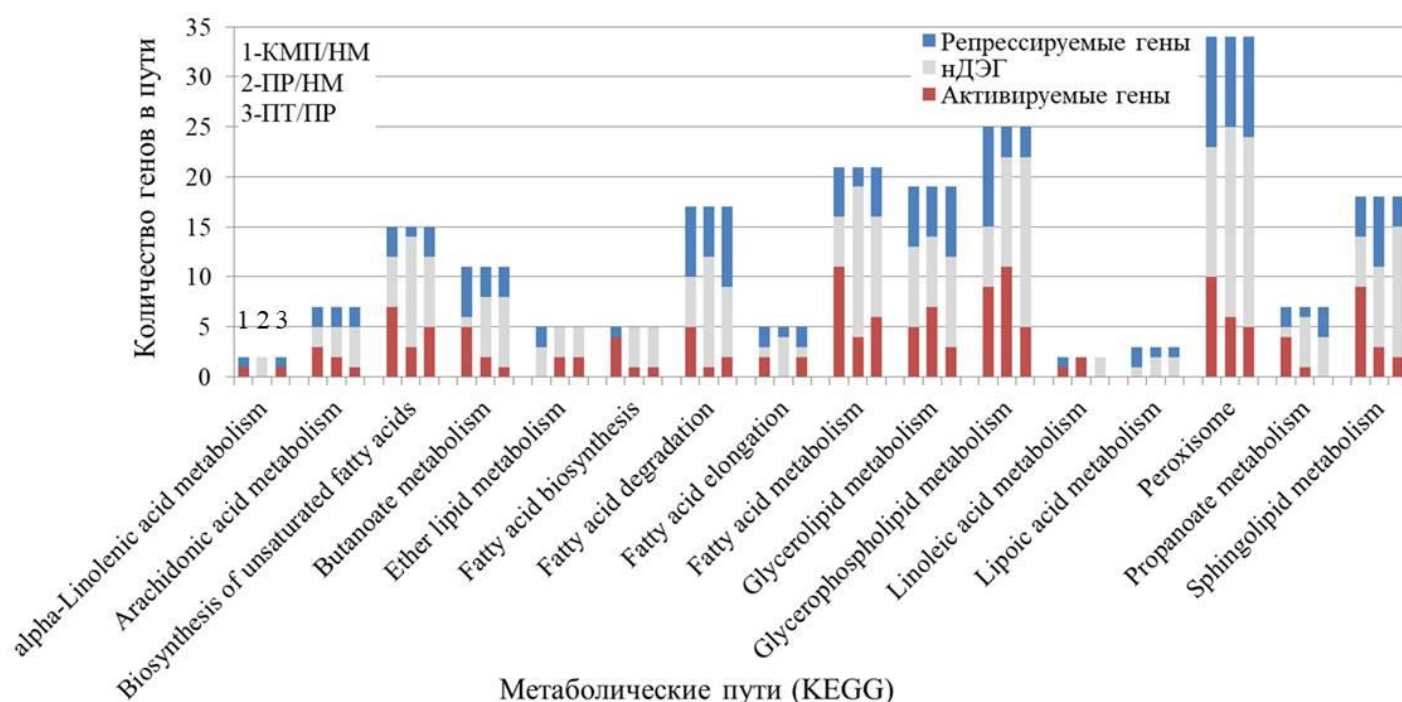
Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
alpha-Linolenic acid metabolism	2		2		0		2
Arachidonic acid metabolism	9	0,302	6		4		3
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	17	0,587	10	0,461	4	0,461	8
Butanoate metabolism	16	0,628	10	0,373	5	-0,457	4
Ether lipid metabolism	5	-0,420	2		2		2
Fatty acid biosynthesis	10	0,410	8	-0,444	2		1
Fatty acid degradation	23	-0,318	12	-0,429	6	-0,685	10
Fatty acid elongation	5		4		1		3
Fatty acid metabolism	27	0,547	16	0,296	6	0,340	11
Glycerolipid metabolism	27	0,247	11	0,322	12	-0,603	10
Glycerophospholipid metabolism	36	0,337	19	0,414	14	0,404	8
Linoleic acid metabolism	2		2		2		0
Lipoic acid metabolism	3		2		1		1
Peroxisome	49	0,255	21	-0,439	15	-0,256	15
Propanoate metabolism	16	0,432	6	0,225	2	-0,540	3
Sphingolipid metabolism	23	0,565	13	-0,499	10	-0,436	5

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Выделяют два семейства ненасыщенных жирных кислот: омега-3 и омега-6-кислот. К омега-3-жирным кислотам относятся α -линоленовая кислота, эйкозапентаеновая кислота и докозагексаеновая кислота. К омега-6-кислотам относится линолевая и арахидоновая кислоты.

Известно, что представители классов *Basidiomycetes* и *Ascomycetes* образуют ненасыщенные кислоты только ω -3-типа, тогда как представители *Phycomycetes* (подклассы *Oomycetes* и *Zygomycetes*) синтезируют преимущественно ω -6-полиненасыщенные жирные кислоты, и в настоящее время мицелиальные грибы считаются наиболее перспективными продуцентами арахидоновой кислоты (Dedyukhina *et al.*, 2011). Тем не менее, ДЭГ, отвечающих за метаболизм арахидоновой кислоты, была обнаружена на всех стадиях онтогенеза гриба, наибольшее количество активированных генов данной категории представлено в клетках мицелиальной пленки и примордия. Липиды встречаются в грибах в качестве основных составляющих мембранных систем и второстепенного компонента клеточной стенки, они могут накапливать энергию в липидных телах и действовать как внутриклеточные сигнальные молекулы для передачи сигналов и реакции на стресс. Грибы содержат различный набор липидов, включая жирные кислоты, оксипипиды, сфинголипиды, фосфолипиды, гликолипиды и стерин. В категориях метаболизм глицеролипидов и глицерофосфолипидов на всех стадиях онтогенеза базидиомицета *L. edodes* большее количество генов находятся в активированном состоянии, что говорит о важности данных биомолекул и в широком спектре процессов, в которых они участвуют (Таблица 15, рисунок 40).



Группы сравнения: 1 – коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 40 – Метаболические пути и функциональные категории «Биосинтез и метаболизм липидов», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Одна из отличительных групп липидов, сфинголипиды, которые играют множество важных сигнальных ролей в грибах, например, регулируют эндоцитоз, убиквитинзависимый протеолиз, динамику цитоскелета, клеточный цикл, трансляцию, посттрансляционную модификацию белков и реакцию на тепловой стресс. Также сфинголипиды защищают поверхность клетки от различных вредных воздействий, формируя липидный слой плазматической мембраны, играют важную роль в делении грибных клеток, прорастании спор, эндоцитозе, апоптозе, патогенезе и вирулентности (Вессассиоли *et al.*, 2019). В примордиях и плодовых телах наблюдается репрессия генов, относящихся к категории сфинголипиды, а также работе пероксисом – мембраносвязанных окислительных органелл, которым принадлежит ключевая роль в липидном обмене (в катаболизме длинноцепочечных жирных кислот, с разветвленной цепью, D-аминокислот и полиаминов, в биосинтезе эфирных фосфолипидов) и восстановлении активных форм кислорода. В мицелиальной пленке напротив эти категории были насыщены активированными генами (Таблица 15, рисунок 40).

*Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию
«Межклеточный транспорт веществ и клеточный цикл»*

Функциональная категория «клеточный цикл» на всех стадиях онтогенеза насыщена активированными генами, отмечено большое количество нДЭГ относительно непигментированного мицелия, что указывает на сходство в данных процессах на всех стадиях развития базидиомицета (Таблица 16, рисунок 41Б).

Таблица 16 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Межклеточный транспорт веществ и клеточный цикл» с использованием базы данных KEGG

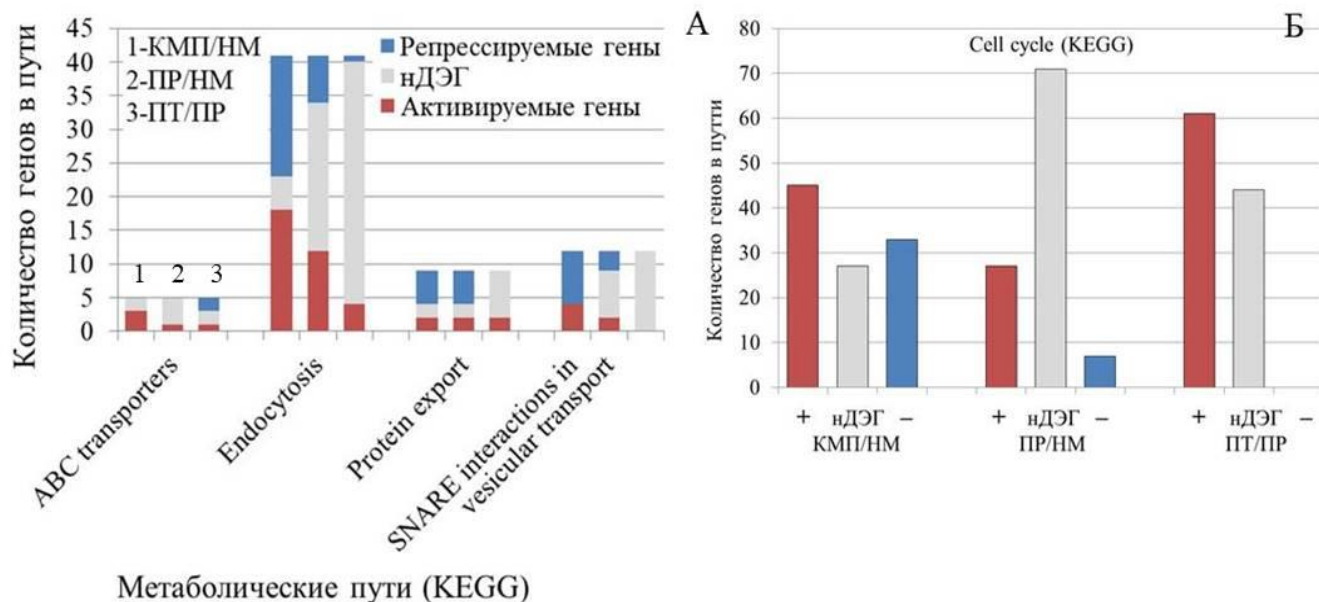
Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
ABC transporters	10	0,652	7	0,731	6	-0,307	4
Cell cycle	53	0,286	30	0,255	12	0,774	26
Cell cycle - yeast	76	0,409	48	0,493	22	0,779	35
Endocytosis	55	-0,426	36	0,271	19	0,302	5
Protein export	20	-0,472	7	-0,467	7	0,484	2
SNARE interactions in vesicular transport	16	-0,457	12	-0,424	5	0,341	0

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Категория АТФ-синтаза-связывающие кассетные транспортеры, которые представляют собой надсемейство генов связанных с транспортными системами, активна в мицелиальной пленке и примордиях. Продуктами таких генов являются белки транспортеры ABC

(транслоказы). Помимо участия в процессах трансляции и репарации ДНК, они катализируют перемещение различных субстратов, молекул и ионов через клеточную мембрану или их разделение внутри мембран (Jones and George, 2007; Kovalchuk and Driessen, 2010). В клетках плодового тела это единственная категория, находящаяся в репрессии.



Группы сравнения: 1 – коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессированные отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 41 – Метаболические пути и функциональные категории «Межклеточный транспорт веществ (А) и клеточный цикл (Б)», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Также в базидиомах, в отличие от мицелиальной пленки, активна категория эндоцитоз – это процесс поглощения клеткой каких-либо объектов, которые не способны проникать через плазматическую мембрану. Межклеточный транспорт веществ, представленный категориями транспорт белков (активный транспорт белков из цитоплазмы на поверхность клетки или в периплазматический компартмент) и SNARE-белками, отвечающими за слияния везикул с мембраной-мишенью (например, лизосомой, плазмалеммой клеточной стенки), на стадиях пленки и примордия, но не в плодовых телах, находятся в репрессии (Рисунок 41А).

Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию «Сигнальные процессы и реакция на стресс»

Было установлено, что по сравнению с непигментированным мицелием в коричневой мицелиальной пленке, примордиях и плодовых телах активируются пути, ответственные за

сигнальные процессы и реакцию на стрессовые раздражители (Таблица 17, рисунок 42). Была установлена активация таких категорий как АМФ-активируемая протеинкиназа (AMPK signaling pathway), регулирующая энергетический гомеостаз клетки, а также являющаяся ключевым элементом в различных путях передачи сигналов, регулировании роста и перепрограммировании метаболизма, аутофагии, клеточной полярности и ориентации в пространстве. Она играет жизненно важную регулируемую роль в клеточном старении (Ge *et al.*, 2022). Протеинкиназа в грибах функционирует как энергетический сенсор и обеспечивает надлежащую реакцию и адаптацию к стрессовым раздражителям окружающей среды. АМФК считается основным регулятором клеточного метаболизма, включающим катаболические пути, которые генерируют АТФ и выключающим анаболические пути, которые потребляют АТФ. Она активируется при низком соотношении АТФ/АМФ, позволяет адаптироваться к ограничениям по доступности глюкозы и побуждает использовать другие альтернативные источники углерода, такие как сахароза, галактоза (Roustan *et al.*, 2016).

Таблица 17 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Сигнальные процессы и реакция на стресс» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
AMPK signaling pathway	24	0,722	18	0,643	10	0,398	2
Calcium signaling pathway	14	0,505	13	0,470	7	0,629	4
cAMP signaling pathway	17	0,499	11	0,691	11	0,212	1
cGMP-PKG signaling pathway	18	0,475	15	0,594	11	0,450	4
FoxO signaling pathway	21	0,616	10	0,609	10	0,416	8
Glutathione metabolism	29	-0,266	20	0,353	16	0,320	8
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis	17	0,435	11	-0,692	3	-0,406	3
HIF-1 signaling pathway	20	-0,483	12	0,403	11	-0,210	3
Inositol phosphate metabolism	20	0,344	8	-0,346	8	0,374	3
MAPK signaling pathway	25	0,589	18	0,663	14	0,373	3
MAPK signaling pathway - yeast	61	0,766	48	0,720	34	0,507	11
mTOR signaling pathway	35	0,417	24	0,449	15	0,215	4
Phosphatidylinositol signaling system	14	-0,458	8	0,342	4	0,545	2
Phospholipase D signaling pathway	17	0,664	10	0,567	7	-0,199	1
PI3K-Akt signaling pathway	35	0,581	24	0,614	16	0,464	8
PPAR signaling pathway	16	0,410	9	0,209	1	0,470	5
Rap1 signaling pathway	16	0,738	11	0,632	8	-0,313	1
Ras signaling pathway	24	0,447	16	0,591	10	0,157	1
Sphingolipid signaling pathway	28	0,720	19	0,535	13	0,326	2
Two-component system	14	0,711	10	0,587	4	0,628	2

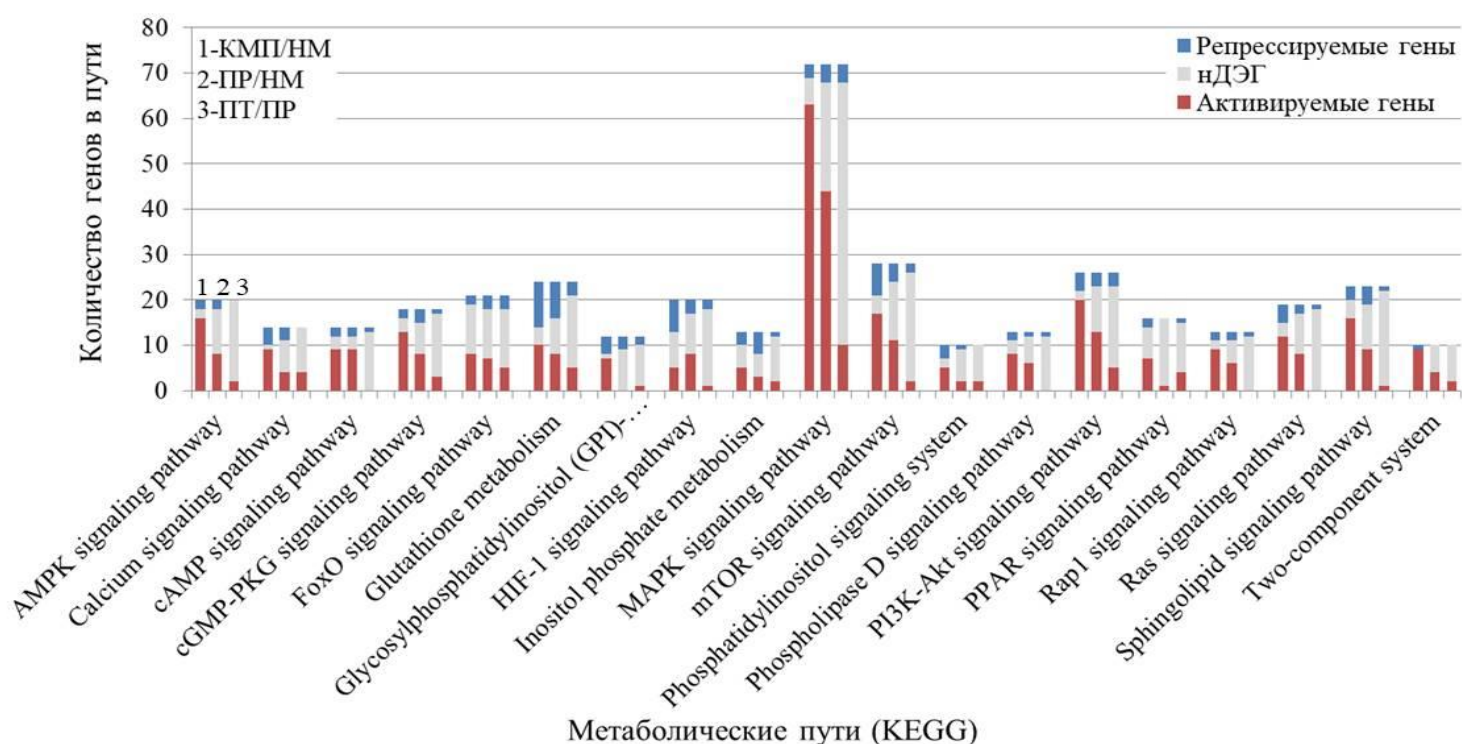
Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Также происходит значительная активация в функционировании метаболических путей, связанных с митоген-активированными протеинкиназами (MAPK signaling pathway), которые регулируют такие функции клеток как дифференцировка, выживаемость, участвуют в управлении клеточного ответа и адаптации на стрессовые раздражители (ультрафиолетовое

облучение, тепловой, осмотический шок, действие патогенов) (Pearson *et al.*, 2001). Известно, например, что у дрожжей MAP-киназы ответственны за остановку клеточного цикла и спаривание клеток, то есть инициируют процесс полового размножения (Gustin *et al.*, 1998; Good *et al.*, 2009).

Метаболические пути, связанные с ионами кальция (Ca^{2+}) для коммуникации и управления внутриклеточными процессами, а также использующие его в качестве этапа передачи сигнала, на стадии примордия и плодового тела также находились в активации. Ca^{2+} может выступать напрямую в процессах передачи сигнала, возникающих в результате активации ионных каналов, или в качестве второго посредника, в путях передачи сигнала, сопряженных с G-белками, важными молекулами, преобразующими сигналы в клетках (Zhang *et al.*, 2019).



Группы сравнения: 1– коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 42 – Метаболические пути и функциональные категории «Сигнальные процессы и реакция на стресс», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Все живые организмы общаются со своей окружающей средой, и часть этого диалога опосредуется вторичными мессенджерами, такими как циклический гуанозинмонофосфат (cGMP-PKG signaling pathway) (Isner and Maathuis, 2018). Сфинголипиды играют важную роль в клеточном цикле и динамике цитоскелета, передачи сигналов и реакции на стресс, трансляции и посттрансляционной модификации белка (Beccaccioli *et al.*, 2019). Данные метаболические

пути, также как и ряд других функциональных категорий, связанных с сигнальными процессами, на стадии коричневой мицелиальной пленки и в базидиомах находились в активации (Таблица 17, рисунок 42). Например, сигнальный путь FoxO, включающий в себя множество клеточных физиологических событий, таких как апоптоз, контроль клеточного цикла, метаболизм глюкозы, антиоксидантный стресс. Путь FoxO активирует экспрессию антиоксидантных ферментных систем, что приводит к удалению избыточных свободных радикалов и предотвращению окислительного повреждения (Tang *et al.*, 2022).

В репрессии в клетках примордия и плодового тела находились метаболические пути, связанные с инозитолфосфатами, которые играют решающую роль в различных путях передачи сигналов. Они ответственны за рост и дифференцировку клеток, апоптоз, репарацию ДНК, экспорт РНК, регенерацию АТФ и многое другое. Также гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренные белки (GPI-APs), повсеместно присутствующие на поверхности клеток у всех эукариот, играют решающую роль во взаимодействии клетки с внешней средой, позволяя ей получать сигналы, реагировать на вызовы и опосредуют адгезию. У грибов они также участвуют в структурной целостности клеточной стенки и часто необходимы для выживания (Komath *et al.*, 2018). Активными данные категории представлены в клетках вегетативного мицелия и коричневой мицелиальной пленки, несмотря на небольшое число репрессированных генов в примордиях и плодовых телах, подавляющее большинство генов на данных стадиях онтогенеза нДЭГ, что указывает на активность продуктов данных генов на всех стадиях базидиомицета (Рисунок 42).

*Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию
«Программируемая клеточная смерть»*

На генеративных стадиях онтогенеза, в примордиях и плодовых телах, а также на стадии коричневой мицелиальной пленки, относительно вегетативного непигментированного мицелия наблюдается активация категорий, отвечающих за программируемую клеточную смерть (Таблица 18, рисунок 43). Клетки всех живых организмов запрограммированы на самоуничтожение при определенных условиях, наиболее известной формой запрограммированной клеточной смерти является апоптоз, который необходим для правильного развития эукариот. У грибов апоптозоподобная гибель клеток происходит естественным образом во время старения и размножения, а также может быть вызвана стрессами окружающей среды и воздействием токсичных метаболитов (Sharon *et al.*, 2009).

Категории, связанные с регулируемым клеткой механизмом аутофагии, процессом при котором внутренние ненужные или дисфункциональные компоненты клетки доставляются внутрь ее лизосом или вакуолей и подвергаются в них деградации; процессами клеточного старения, ферроптоза – программируемой окислительной некротической гибели клетки,

характерной особенностью которого является железо-зависимое перекисное окисление липидов, а также селективное разрушение митохондрий (митофагия), находились на генеративных стадиях развития базидиомицета в активации (Рисунок 43).

Таблица 18 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе морфогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Программируемая клеточная смерть» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
Apoptosis	20	0,719	14	0,605	10	0,340	2
Autophagy - other	20	0,441	12	0,357	6	0,283	2
Autophagy - yeast	51	0,491	34	0,344	14	0,286	5
Cellular senescence	27		22		16		7
Ferroptosis	6		5		2		3
Lysosome	36	0,546	20	-0,437	15	0,407	6
Mitophagy	26	0,601	15	0,602	8	0,360	1
Necroptosis	19		15		7		7
Phagosome	38	0,335	25	-0,259	13	0,450	3
Proteasome	35	-0,765	24	0,156	5	0,532	1
Ubiquitin mediated proteolysis	58	0,356	41	0,476	19	0,354	5

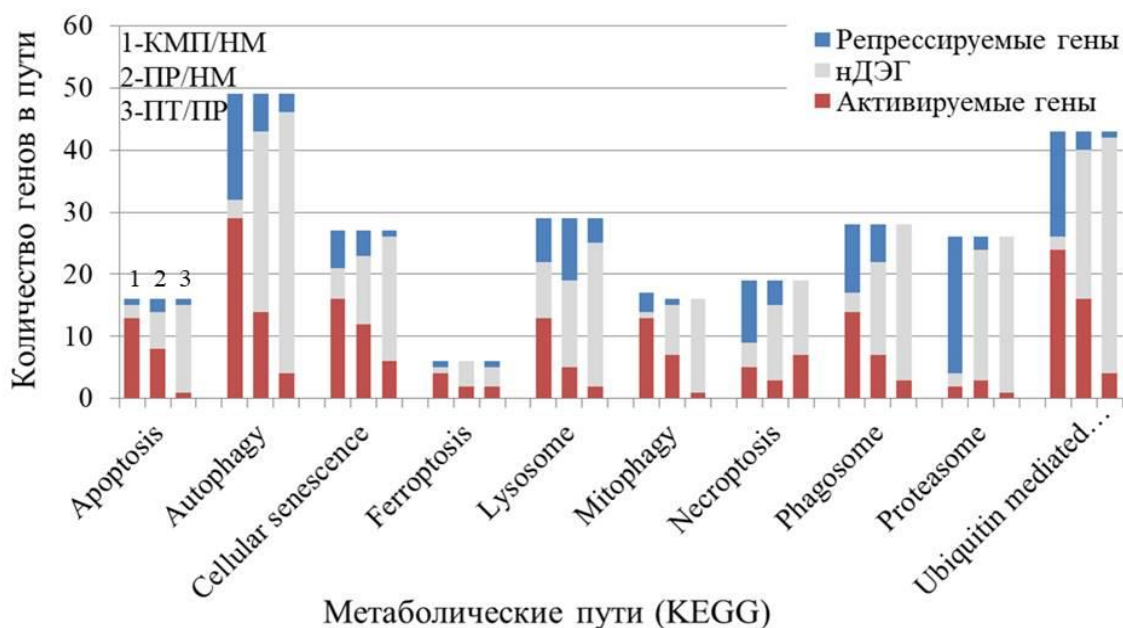
Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Метаболические пути, ответственные за работу мультибелкового комплекса протеасомы, необходимы для разрушения ненужных или дефектных белков при помощи протеолиза и убиквитина, участвующего в регуляции процессов внутриклеточной деградации других белков, а также в модификации их функций. В клетках коричневой мицелиальной пленки, примордия и плодового тела, относительно непигментированного мицелия, данные категории были представлены небольшим числом активированных генов, подавляющее количество генов в базидиомах дифференциально не экспрессировалось, а в мицелиальной пленке находилось в репрессии (Таблица 18, рисунок 43).

Сигнальная система на основе убиквитина участвует в регуляции основных клеточных процессов, среди которых клеточный цикл, апоптоз, репарация, транскрипция, внутриклеточная передача сигнала, иммунный ответ и другие. На всех стадиях морфогенеза, относительно непигментированного мицелия, данная категория находилась в активации. Особая роль этой системы заключается в поддержании белкового гомеостаза в клетке, которое осуществляется за счет направленной деградации дефектных или короткоживущих внутриклеточных белков, помеченных убиквитином, в протеасоме (Ciechanover *et al.*, 2000).

В репрессии в клетках примордий находились метаболические пути, связанные с работой мембранно-связанных органелл лизосом, содержащих гидролитические ферменты, которые переваривают многие виды биомолекул. Помимо деградации полимеров, лизосома



Группы сравнения: 1 – коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 43 – Метаболические пути и функциональные категории «Программируемая клеточная смерть», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

участвует в процессах секреции клеток, восстановления плазматических мембран, апоптоза, клеточной сигнализации и энергетического обмена. А также фагосом, вакуолей образующихся путем слияния клеточной мембраны вокруг стареющей или апоптотической клетки, подлежащей перевариванию. В плодовом теле все функциональные категории и метаболические пути, попадающие под определение «программируемая клеточная смерть», находились в активации (Таблица 18, рисунок 43).

Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию «Вторичные метаболиты»

Базидиомицеты продуцируют большое количество низкомолекулярных соединений различного химического состава, таких как терпеноиды, хиноны, катехолы, цереброзиды, изофлавоны, амины, стероиды, поликетиды, алкалоиды и нерибосомальные пептиды (Sum *et al.*, 2023). Низкомолекулярные соединения являются вторичными метаболитами, которые не включены в первичный метаболический механизм грибов, т. е. производство энергии и генерацию элементарной единицы нуклеиновых кислот, клеточных мембран и белков. Конкретные вторичные метаболиты возникают как переход первичных метаболических продуктов и классифицируются на четыре главных метаболических источника: пути

аминокислотного происхождения, включающие нерибосомальные белки; путь шикимовой кислоты, производящий ароматические соединения; путь ацетата-малоната, ведущий к поликетидам; и путь мевалоновой кислоты, для биосинтеза терпеноидов (Wang *et al.*, 2021).

Было обнаружено 17 генов, участвующих в регуляции терпеноидов, на стадии коричневой мицелиальной пленки и в плодовом теле данная категория находилась в активации. Также на этих стадиях онтогенеза категории биосинтеза стероидов и стероидных гормонов были представлены 18 активированными генами. Тритерпеноиды и стероиды являются одним из крупнейших классов природных продуктов с широким спектром биологической активности, и грибы служат важным источником данных соединений. Грибные тритерпеновые соединения играют решающую роль во многих биологических функциях, например, они могут ингибировать пролиферацию ряда раковых клеток. Проявляют сильную антиоксидантную активность, значительно увеличивая активность супероксиддисмутазы и каталазы, что в конечном итоге устраняет деструктивные активные формы кислорода (Smina *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021; Zheng *et al.*, 2021). У *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза обнаружены активные гены, участвующие в регуляции терпенов, что является предпосылкой к противоопухолевому эффекту у данного базидиомицета на генетическом уровне. Стероиды в грибах обладают широким спектром биологической активности, например, являются важными компонентами клеточных мембран, эргостерол изменяет текучесть грибных мембран, поддерживает ее целостность и активность. Также стероидные гормоны выступают в качестве сигнальных молекул и участвуют в росте и морфогенезе грибов (Vanden Bossche and Marichal, 1993; Zhabinskii *et al.*, 2022).

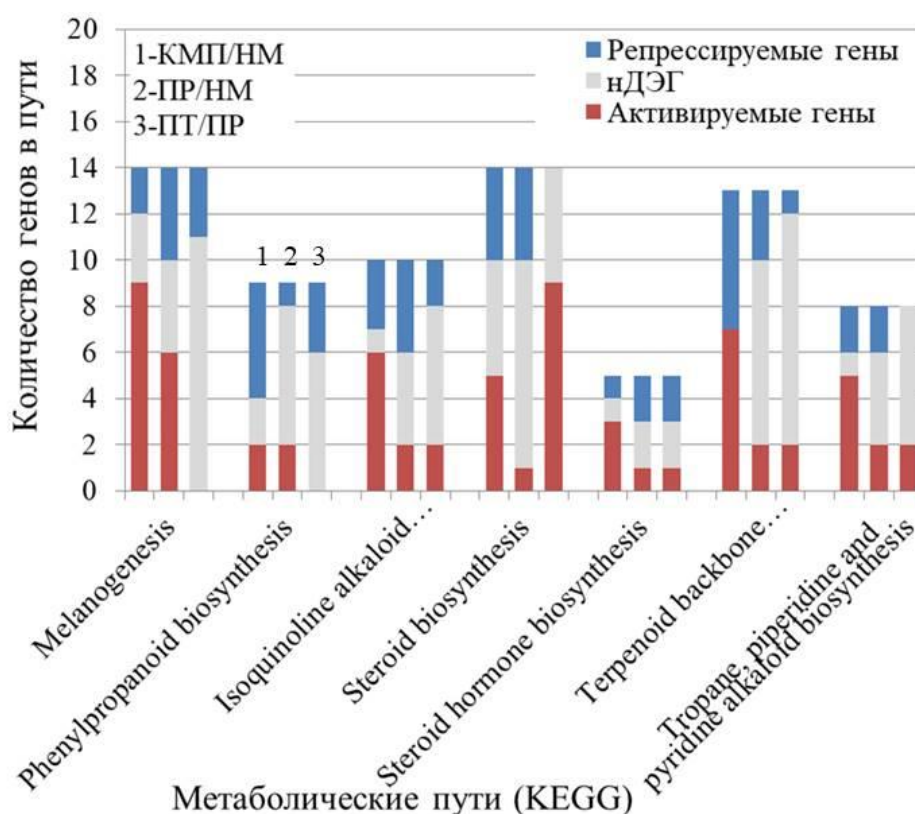
Практически все категории, относящиеся к биосинтезу вторичных метаболитов, в коричневой мицелиальной пленке находились в активации относительно непигментированного мицелия. Категории, включающие биосинтез алкалоидов, антибиотиков, стероидов, терпеноидов, а также метаболический путь «меланогенез» были насыщены транскриптами активированных генов. В клетках примордия, относительно непигментированного мицелия, активированными были категории общего биосинтеза вторичных метаболитов, антибиотиков и пигментов. В плодовом теле большинство генов, отвечающих за синтез вторичных метаболитов, дифференциально не экспрессировались или находились в репрессии, относительно примордия, биосинтез антибиотиков, стероидов и терпеноидов находился в активации. Категория биосинтеза алкалоидов тропана, пиперидина и пиридина находилась в активированном состоянии во всех трех группах сравнения, напротив, большинство генов, вовлеченных в биосинтез ароматических соединений фенилпропаноидов, необходимых для защиты от патогенов, ультрафиолета, выступающих в роли сигнальных молекул, в мицелиальной пленке и базидиомах находились в репрессии (Таблица 19, рисунок 44).

Таблица 19 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Вторичные метаболиты» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
Biosynthesis of antibiotics	216	0,411	117	0,332	73	0,231	46
Biosynthesis of secondary metabolites	295	0,401	157	0,329	101	-0,281	60
Melanogenesis	14	0,577	11	0,531	10	-0,715	3
Phenylpropanoid biosynthesis	10	-0,581	7	-0,379	3	-0,713	3
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	10	0,544	9	-0,316	6	-0,633	4
Steroid biosynthesis	15	0,423	9	-0,596	5	0,709	9
Steroid hormone biosynthesis	5		4		3		3
Terpenoid backbone biosynthesis	17	0,291	13	-0,432	5	0,325	3
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	8		7		4		2

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

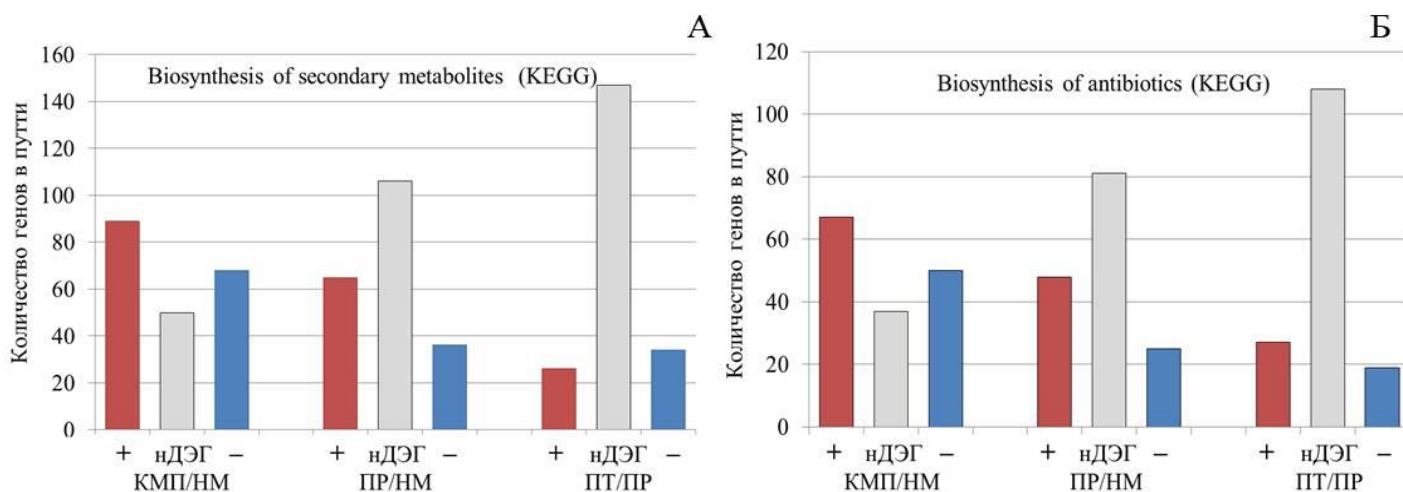
ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.



Группы сравнения: 1– коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия, 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 44 – Метаболические пути и функциональные категории «Вторичные метаболиты», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Если сравнивать общие категории биосинтеза вторичных метаболитов и антибиотиков, то коричневая мицелиальная пленка представлена наибольшим количеством активированных генов в обеих категориях, среди всех представленных морфоструктур. В примордии данные категории также находились в активированном состоянии относительно непигментированного мицелия, однако, большинство генов в данной паре сравнения дифференциально не экспрессировалось. В плодовом теле отмечено наименьшее содержание активированных генов, большая часть которых дифференциально не экспрессировалась в обеих категориях (Таблица 19, рисунок 45А и Б).



Группы сравнения: 1 – коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия, 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР);

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены («+» активируемые отмечены красным цветом, «-» репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 45 – Метаболические пути «Биосинтез вторичных метаболитов» (А) и «Биосинтез антибиотиков» (Б), насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию «Витамины»

Большинство функциональных категорий, отвечающих за биосинтез витаминов, на всех стадиях онтогенеза относительно непигментированного мицелия находились в репрессии. Так, метаболизм аскорбата (аскорбиновая кислота) и альдарата (полигидроксидикарбоновые кислоты), важный путь метаболизма углеводов, защищающий клетки от окислительного повреждения, находился в репрессии во всех группах сравнения. Аскорбат, как мощный водорастворимый антиоксидант, оказывает различные биохимические эффекты, защищает ткани от продуктов окисления и поддерживает восстановленное состояние некоторых ферментов, а также удаляет свободные радикалы и мономерный кислород (Peng *et al.*, 2023). В клетках непигментированного вегетативного мицелия большинство генов данной категории находятся в активном состоянии (Таблица 20, рисунок 46).

В коричневой мицелиальной пленке и примордии активны были гены, связанные с метаболизмом таких биологически активных соединений как витамина группы В, биотина, необходимых для роста и развития, а также биосинтезом фолата, необходимого организму для производства ДНК и РНК и метаболизма аминокислот (Таблица 20, рисунок 46). Биотин (витамин В7), участвует в широком спектре метаболических процессов, в первую очередь связанных с утилизацией жиров, углеводов и аминокислот, является коферментом для пяти ферментов карбоксилазы, которые участвуют в катаболизме аминокислот и жирных кислот, синтезе жирных кислот и глюконеогенезе. Биотинилирование белков-гистонов в ядерном хроматине играет роль в стабильности хроматина и экспрессии генов. Большинство грибов способны синтезировать биотин *de novo* (Sprenger *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021).

Фолаты (витамин В9), необходимы в метаболизме аминокислот, производные фолиевой кислоты участвуют в биосинтезе пуринов и пиримидинов. Все грибы могут синтезировать фолиевую кислоту *de novo* (Cossins and Chen, 1997). Основной функцией тетрагидрофолата в метаболизме является транспортировка одноуглеродных групп (то есть метильной группы, метиленовой группы или формильной группы). Эти группы углерода могут переноситься на другие молекулы в рамках модификации или биосинтеза различных биологических молекул. Фолаты необходимы как для синтеза ДНК, так и для модификации ДНК и РНК, синтеза метионина из гомоцистеина и различных других химических реакций, участвующих в клеточном метаболизме. Эти реакции в совокупности известны как фолат-опосредованный одноуглеродный метаболизм (Lan *et al.*, 2018).

Таблица 20 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Витамины» с использованием базы данных KEGG

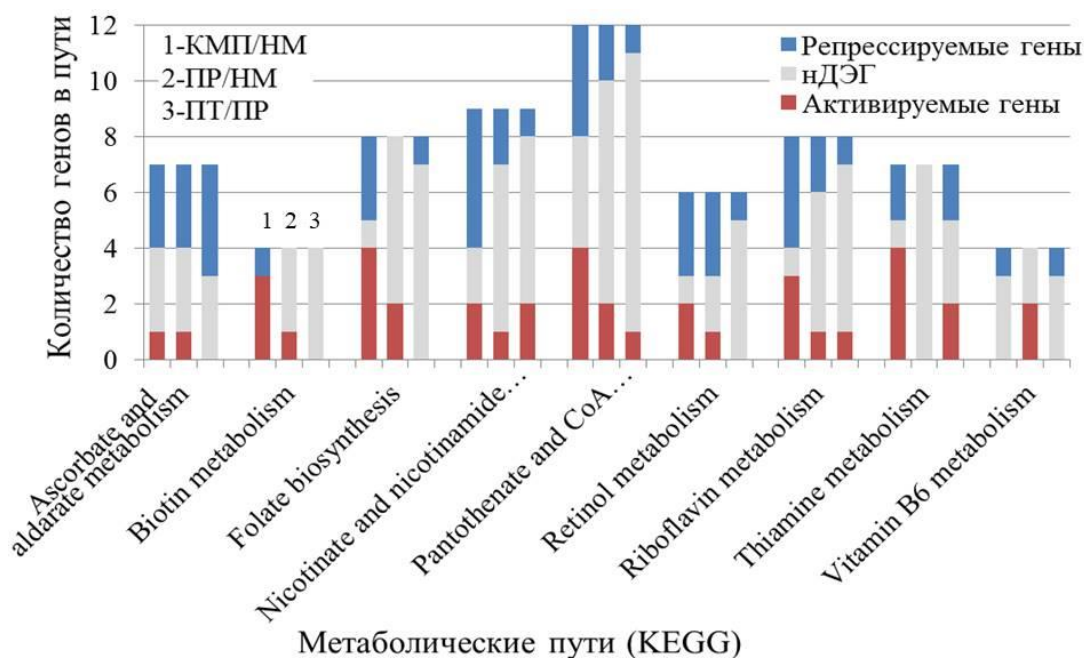
Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
Ascorbate and aldarate metabolism	10	-0,435	4	-0,628	4	-0,915	4
Biotin metabolism	7	0,268	5		1		0
Folate biosynthesis	12	0,366	7	0,477	2	-0,615	1
Nicotinate and nicotinamide metabolism	14	-0,537	7	-0,358	3	0,683	3
Pantothenate and CoA biosynthesis	14		10		6		4
Retinol metabolism	6		5		4		1
Riboflavin metabolism	11	-0,726	7	0,328	3	-0,504	2
Thiamine metabolism	10	-0,480	6	0,397	0	-0,388	4
Vitamin B6 metabolism	5	-0,786	1		2		1

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

В клетках примордия также были активны функциональные категории представляющие метаболизм витаминов тиамин (В1), рибофлавина (В2) и пиридоксина (В6), критически важные микроэлементы необходимые для нормального роста и развития человека и животных,

биосинтез которых происходит в бактериях, растениях и грибах. Фосфорилированные формы тиамин необходимы для некоторых метаболических реакций, включая расщепление глюкозы и аминокислот. Рибофлавин, участвует в метаболизме углеводов, белков и жиров. Он необходим для образования двух основных коферментов, флавиномононуклеотида (FMN) и флавинадениндинуклеотида (FAD). Эти коферменты участвуют в энергетическом обмене, клеточном дыхании, а также в нормальном росте и развитии. FAD способствует превращению триптофана в ниацин (витамин B3), а FMN участвует в превращении витамина B6 в коэнзим пиридоксаль-5'-фосфат. FAD также необходим для активности глутатионредуктазы, важного фермента для образования эндогенного антиоксиданта глутатиона, который в свою очередь способен предотвращать повреждение клеточных компонентов, вызванное такими источниками, как активные формы кислорода, свободные радикалы, перекиси, перекиси липидов и тяжелые металлы (Macheroux *et al.*, 2011).



Группы сравнения: 1 – коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 46 – Метаболические пути и функциональные категории «Витамины», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Пиридоксин также является очень важным соединением для общего клеточного метаболизма, его активная форма, пиридоксаль-5'-фосфат, служит коферментом в более чем 140 ферментных реакциях в метаболизме аминокислот, глюкозы и липидов, включая декарбоксилирование, трансаминирование, является важным компонентом ферментов,

способствующих биосинтезу сфинголипидов. Является коферментом гликогенфосфорилазы, необходимой для гликогенолиза. Также катализирует реакции трансаминирования, которые необходимы для обеспечения аминокислот в качестве субстрата для глюконеогенеза, биосинтеза глюкозы. Пиридоксин синтезируется в качестве средства защиты от ультрафиолетового излучения у грибов и растений (Parra *et al.*, 2018).

В плодовом теле относительно примордия все категории, относящиеся к биосинтезу и метаболизму витаминов, были насыщены транскриптами репрессированных генов, кроме нескольких активированных генов, отвечающих за метаболизм никотината и никотинамида. Никотинат (никотинамид), витамины B3, вырабатываются из аминокислоты триптофана и являются незаменимыми питательными веществами для человека. Никотинамид, входящий в состав кофактора никотинамидадениндинуклеотида (НАДН/НАД⁺), имеет решающее значение в широком спектре ферментативных окислительно-восстановительных реакций, в первую очередь гликолиза, цикла лимонной кислоты и электронно-транспортной цепи (Lu *et al.*, 2009). В плодовом теле гены, отвечающие за метаболизм никотината, находились в активации. Однако подавляющее большинство генов, отвечающих за синтез и метаболизм витаминов, в паре сравнения примордий/плодовое тело дифференциально не экспрессировалось.

Метаболические пути, связанные с биосинтезом и метаболизмом пантотената (витамин B5) и ретинола (витамин A1), на стадиях мицелиальной пленки, примордия и плодового тела находились в репрессии, хотя большое количество генов относительно непигментированного мицелия дифференциально не экспрессировалось, что указывает на необходимость работы транскриптов данных генов на всех стадиях развития базидиомицета (Таблица 20, рисунок 46). Ретинол, жирорастворимый витамин, синтезируется в результате расщепления β -каротина, пигмента присутствующего в том числе и в грибах. Пантотенат является ключевым предшественником для биосинтеза коэнзима А (КоА), универсального и незаменимого кофактора, участвующего во множестве метаболических реакций, включая синтез фосфолипидов, синтез и деградацию жирных кислот, а также функционировании ЦТК. Синтез КоА дополнительно связывается с другими витамин-ассоциированными путями, такими как тиамин и фолиевая кислота (Leonardi and Jackowski, 2007).

*Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию
«Биодеградация ароматических соединений и ксенобиотиков»*

Половина функциональных категорий, относящихся к биодеградации ароматических соединений и ксенобиотиков, на двух стадиях онтогенеза (в коричневой мицелиальной пленке и примордии) находились в репрессии относительно непигментированного вегетативного мицелия. В плодовом теле все представленные метаболические пути были насыщены транскриптами репрессированных генов. Метаболические пути, связанные с деградацией

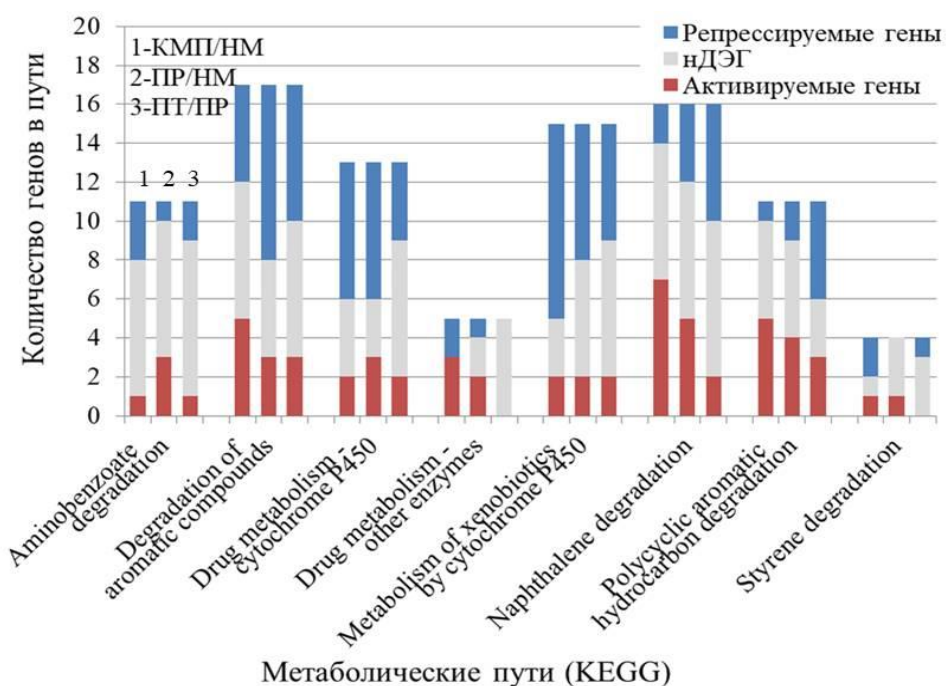
ароматических соединений, в том числе полициклических ароматических углеводородов, нафталина и метаболитом лекарственных соединений, в клетках коричневой мицелиальной пленки находились в активации.

Таблица 21 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Биодеградация ароматических соединений и ксенобиотиков» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
Aminobenzoate degradation	11	-0,313	4	0,508	4	-0,594	3
Degradation of aromatic compounds	20	0,556	10	-0,388	12	-0,577	10
Drug metabolism - cytochrome P450	13	-0,708	9	-0,402	10	-0,559	6
Drug metabolism - other enzymes	5		5		3		0
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	15	-0,719	12	-0,408	9	-0,572	8
Naphthalene degradation	16	0,591	9	0,422	9	-0,510	9
Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	11	0,734	6	0,585	6	-0,534	8
Styrene degradation	4		3		1		1

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.



Группы сравнения: 1– коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия, 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 47 – Метаболические пути и функциональные категории «Биодеградация ароматических соединений и ксенобиотиков», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

В примордии активны также были гены, участвующие в биодegradации стирола и аминокислот, все группы генов, входящие в категорию «биодegradация ароматических соединений и ксенобиотиков», в клетках плодового тела находились в репрессии (Таблица 21, рисунок 47). Гены, продукты которых представляют собой изоферменты цитохрома P450, гемсодержащие ферменты, принимающие участие в дegradации лекарственных соединений, были активны только в клетках непигментированного мицелия. Анализ секвенирования генома разных видов грибов выявил наличие большого количества монооксигеназ цитохрома P450, где они необходимы и в первичных, и во вторичных метаболических процессах, а также в дegradации ксенобиотических соединений, древесины и ее производных компонентов (Jawallapersand *et al.*, 2014). Стоит также отметить, что большое количество генов дифференциально не экспрессировалось относительно непигментированного мицелия, что указывает на способность клеточных метаболитов всех морфоструктур *L. edodes* к биодegradации ароматических соединений и ксенобиотиков, хотя, основная роль в данных процессах принадлежит внеклеточным ферментам непигментированного вегетативного мицелия базидиомицета.

Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, входящих в категорию «Метаболизм азота и серы»

Азот и сера являются незаменимыми элементами для жизнедеятельности всех живых организмов, включая грибы. Азот необходим для роста и развития, помимо этого, качество и количество азота также влияют на формирование вторичных метаболитов, и мицелиальные грибы могут адаптировать свой метаболизм для использования широкого спектра азотных питательных веществ. Транскрипционный ответ на изменения в доступности азота был описан для нескольких видов грибов, эти исследования показали, что грибы реагируют на изменения физиологически и морфологически. У всех изученных видов грибов основной фактор транскрипции GATA AreA и его ко-репрессор Nmr являются центральными игроками регулирования метаболизма азота (Todd, 2016).

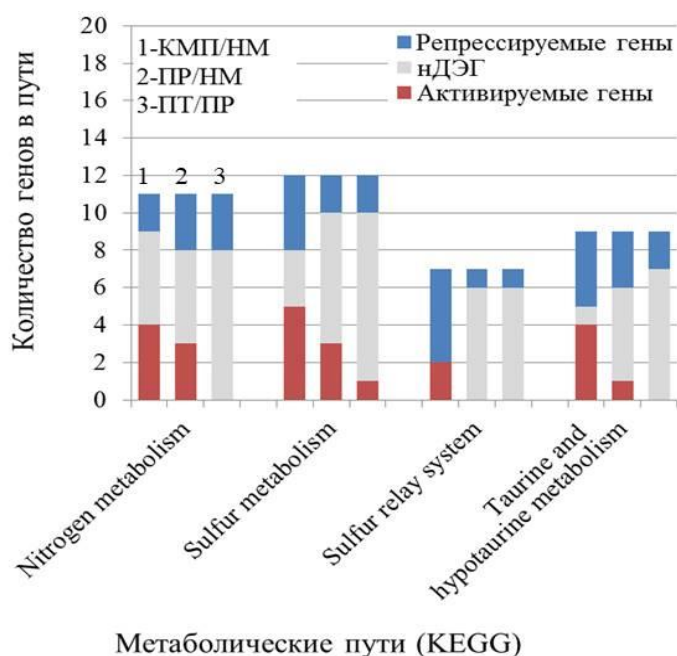
Таблица 22 – Анализ активации/репрессии функциональных групп генов, в процессе онтогенеза *L. edodes*, входящих в категорию «Метаболизм азота и серы» с использованием базы данных KEGG

Название метаболического пути	Всего генов в пути	КМП / НМ		ПР / НМ		ПТ / ПР	
		Score	ДЭГ	Score	ДЭГ	Score	ДЭГ
Nitrogen metabolism	10	0,738	6	0,299	6	-0,798	3
Sulfur metabolism	16	0,398	9	0,299	5	0,280	3
Sulfur relay system	7	0,534	7		1		1
Taurine and hypotaurine metabolism	9	0,624	9		4		2

Примечание: Score – показатель насыщенности метаболического пути генами (от -1 до 1); положительное значение – активируемыми генами (отмечено красным цветом), негативное значение – репрессируемыми генами (отмечено синим цветом).

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; КМП – коричневая мицелиальная пленка; НМ – непигментированный мицелий, ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Сера является важным элементом, который входит в состав различных клеточных метаболитов и используется для множества метаболических процессов в грибах. Этот элемент присутствует в белках, сульфатных эфирах полисахаридов, стероидах, фенолах, серосодержащих коферментах. Она является составной частью содержащих S протеиногенных аминокислот цистеина и метионина, а также основных органических молекул, таких как кофермент-A, кластеры железа и серы (Fe-S) и S-аденозилметионин (который отдает метильную группу в процессе метилирования), выполняет защиту от окислительного стресса (глутатион и эрготионеин), необходима для биосинтез токсинов (например, глиотоксин) (Struck *et al.*, 2012). Метаболические пути, ответственные за метаболизм данных элементов, были представлены активированными генами на стадиях мицелия, мицелиальной пленки и примордия. В клетках плодового тела данные категории находились в репрессии, однако, большинство генов по сравнению с примордием дифференциально не экспрессировалось (Рисунок 48).



Группы сравнения: 1– коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия, 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессированные отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 48 – Метаболические пути и функциональные категории «Метаболизм азота и серы», насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

Также на стадиях непигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки были обнаружены гены, продукты которых ответственны за метаболизм таурина и гипотаурина. Таурин является конечным продуктом метаболизма серосодержащих аминокислот и их производных (глутатиона, метионина, цистеина, цистина), гипотаурин (сульфиновая кислота) является, в свою очередь, промежуточным продуктом в биосинтезе таурина. Было

показано, что данные соединения обладают радиопротекторным, антиоксидантным, мембран-стабилизирующим свойствами (Widiastuti *et al.*, 2018).

5.7.5 Общий анализ активации/репрессии функциональных групп генов с использованием базы данных KOG

Помимо базы данных KEGG дифференциально экспрессирующиеся гены были классифицированы в функциональные категории и метаболические пути с использованием базы данных Eukaryotic Orthology Groups (KOG) families. Около 4500 ДЭГ на разных стадиях онтогенеза были распределены по функциональным категориям, насыщенным активируемыми и репрессируемыми генами. KOG группы были выделены на основе присутствия доменов, связанных с определенной функцией, в транскрипте. Домен может быть связан как с одной функцией (например, Amino acid transport and metabolism), так и с комплексом функций (например, Amino acid transport and metabolism + Signal transduction mechanisms). Данные, полученные из базы KEGG, были дополнены категориями KOG. Мы удалили некоторые глобальные категории, анализируя которые трудно сделать вывод о конкретных процессах, протекающих в клетке, а затем отобрали и классифицировали более «специализированные» категории, которые потенциально могут участвовать при смене стадий онтогенеза базидиомицета *L. edodes*. Было найдено 140 категорий, более половины из которых, насыщены активируемыми генами шиитакэ (Таблица 23).

Затем собрали функциональные категории в более крупные метаболические пути, отражающие физиологические процессы и перестройку метаболизма в клетках разных морфоструктур базидиомицета. ДЭГ были распределены в 13 и 10 категорий, насыщенных активируемыми и репрессируемыми генами, соответственно (Таблица 24). Так, на стадии мицелиальной пленки и примордия относительно непигментированного мицелия обнаружили активацию категорий, связанных с транспортом и метаболизмом углеводов, контролем клеточного цикла, деления клеток и разделения хромосом, цитоскелетом и защитными механизмами, транспортом и метаболизмом неорганических ионов, структурой ядра, транспортом и метаболизмом нуклеотидов, транскрипцией и механизмами передачи сигнала. Общими категориями для примордия и плодового тела, насыщенными активированными генами, были метаболические пути контроля клеточного цикла, деления клеток и разделения хромосом, цитоскелета, внеклеточных структур, ядерных структур, транскрипции, трансляции, рибосомальной структуры и биогенеза, механизмов передачи сигналов. Помимо этого, в плодовом теле к активированным относились механизмы внутриклеточного транспорта, секреции и везикулярного транспорта, структуры и динамики хроматина, посттрансляционной модификации белков, шапероны, репликация, рекомбинация и репарация, обработка и модификация РНК (Таблица 24).

Таблица 23 – Общий анализ активации/репрессии функциональных групп генов в процессе онтогенеза *L. edodes*, с использованием базы данных KOG

Название метаболического пути (KOG)	Всего генов в пути	КМП / НМ	ПР / НМ	ПТ / ПР
		"+" /ндЭГ/ "-"	"+" /ндЭГ/ "-"	"+" /ндЭГ/ "-"
Amino acid transport and metabolism	102	36/26/40	16/65/21	14/68/20
Carbohydrate transport and metabolism	2	0/0/2	0/2/0	1/1/0
Coenzyme transport and metabolism	1	0/1/0	0/1/0	0/0/1
Lipid transport and metabolism	3	0/2/1	1/1/1	0/2/1
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2	1/0/1	0/1/1	0/2/0
Signal transduction mechanisms	2	1/0/1	0/1/1	0/2/0
Translation, ribosomal structure and biogenesis	11	3/5/3	2/8/1	4/7/0
Carbohydrate transport and metabolism	257	125/72/60	82/116/59	41/153/63
Amino acid transport and metabolism	4	3/1/0	2/1/1	1/3/0
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3	0/3/0	1/2/0	0/1/2
Energy production and conversion	6	2/0/4	1/2/3	2/4/0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	7	2/2/3	3/1/3	2/4/1
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	5	4/1/0	2/2/1	0/4/1
Signal transduction mechanisms	4	2/1/1	2/2/0	1/3/0
Secondary metabolites biosynthesis, transport, catabolism	5	1/2/2	0/1/4	0/3/2
Signal transduction mechanisms	3	0/0/3	0/2/1	0/3/0
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	294	146/70/78	94/153/47	82/200/12
Cytoskeleton	6	1/0/5	1/4/1	2/4/0
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	6	6/0/0	4/2/0	0/6/0
General function prediction only	5	2/0/3	2/2/1	1/4/0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	24	8/8/8	4/13/7	6/18/0
Replication, recombination and repair	2	0/2/0	1/1/0	1/1/0
Signal transduction mechanisms	17	10/3/4	5/10/2	2/13/2
Signal transduction mechanisms; Cytoskeleton	5	5/0/0	3/2/0	0/5/0
Transcription	15	6/5/4	2/9/4	5/10/0
Transcription; Replication, recombination and repair	36	22/8/6	14/17/5	13/22/1
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	46	16/7/23	14/17/15	4/30/12
Extracellular structures	2	1/1/0	1/0/1	0/2/0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones;	4	4/0/0	2/2/0	0/4/0
Signal transduction mechanisms				
Chromatin structure and dynamics	187	48/65/74	39/103/45	68/108/11
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	5	0/4/1	2/3/0	3/2/0
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning;	2	0/2/0	1/1/0	2/0/0
Replication, recombination and repair				
Replication, recombination and repair	12	4/4/4	3/4/5	3/9/0
Signal transduction mechanisms	1	0/0/1	0/0/1	0/1/0
Transcription	68	17/18/33	13/33/22	17/45/6
Coenzyme transport and metabolism	24	7/7/10	3/12/9	4/15/5
Energy production and conversion	9	4/2/3	2/5/2	0/7/2
Cytoskeleton	167	74/31/62	52/78/37	51/106/10
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	5	0/0/5	0/2/3	0/5/0
General function prediction only	3	1/1/1	1/2/0	2/1/0
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport;	1	1/0/0	0/1/0	0/1/0
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning				
Signal transduction mechanisms	1	1/0/0	0/1/0	0/1/0
Defense mechanisms	87	41/21/25	26/46/15	18/50/19
Energy production and conversion	139	41/36/62	35/85/19	11/92/36
General function prediction only	39	11/10/18	11/20/8	3/21/15
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	1	0/0/1	0/1/0	0/1/0
Extracellular structures	9	2/2/5	1/8/0	2/7/0
Signal transduction mechanisms	1	0/0/1	0/1/0	0/1/0
General function prediction only	70	47/11/12	25/36/9	18/47/5
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	1	0/0/1	0/0/1	0/0/1
Defense mechanisms	3	1/1/1	0/2/1	0/2/1
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1	1/0/0	1/0/0	0/1/0
Signal transduction mechanisms	62	44/10/8	24/32/6	18/41/3
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2	1/1/0	0/2/0	0/1/1
Transcription	3	1/0/2	0/2/1	0/3/0
Inorganic ion transport and metabolism	138	71/27/40	40/68/30	15/90/33
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	9	6/0/3	1/7/1	0/8/1
Signal transduction mechanisms	25	8/2/15	5/10/10	1/17/7
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	232	100/44/88	53/119/60	40/178/14
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	2	1/0/1	1/0/1	0/2/0
Cytoskeleton	8	0/1/7	0/4/4	0/7/1
General function prediction only	5	4/0/1	3/2/0	0/4/1
Lipid transport and metabolism	1	0/1/0	0/0/1	0/1/0
Nuclear structure	1	1/0/0	1/0/0	0/1/0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1	0/0/1	0/0/1	0/1/0
Signal transduction mechanisms	28	16/6/6	10/13/5	10/18/0

Lipid transport and metabolism	278	86/79/113	52/158/68	35/176/67
Amino acid transport and metabolism	12	1/4/7	1/6/5	1/7/4
General function prediction only	50	18/20/12	10/34/6	6/32/12
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2	1/1/0	0/2/0	1/1/0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones;	2	1/0/1	0/1/1	0/2/0
Defense mechanisms; Amino acid transport and metabolism				
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	6	1/4/1	1/4/1	3/2/1
Signal transduction mechanisms	9	2/4/3	3/4/2	2/7/0
Nuclear structure	15	0/0/1	0/1/0	0/1/0
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	14	8/4/2	5/7/2	6/8/0
Nucleotide transport and metabolism	54	25/8/21	13/36/5	4/40/10
Coenzyme transport and metabolism	7	3/1/3	1/5/1	0/4/3
General function prediction only	1	0/0/1	0/1/0	0/1/0
Inorganic ion transport and metabolism	2	1/0/1	1/1/0	0/2/0
Posttranslational modification,protein turnover,chaperones	405	141/76/188	95/213/97	67/285/53
Amino acid transport and metabolism	7	2/2/3	0/4/3	0/5/2
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning;	9	2/3/4	4/3/2	1/8/0
General function prediction only				
Energy production and conversion	2	0/0/2	0/2/0	0/2/0
General function prediction only	8	1/2/5	1/3/4	0/7/1
Inorganic ion transport and metabolism	4	3/1/0	1/3/0	0/3/1
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	61	41/12/8	23/31/7	19/40/2
Signal transduction mechanisms	33	7/3/23	6/15/12	0/25/8
Transcription	1	0/1/0	0/1/0	1/0/0
Transcription; Signal transduction mechanisms	1	0/1/0	0/1/0	1/0/0
Translation, ribosomal structure and biogenesis	1	1/0/0	1/0/0	0/1/0
Replication, recombination and repair	105	25/25/55	20/58/27	34/67/4
Chromatin structure and dynamics	1	0/0/1	0/0/1	0/1/0
Signal transduction mechanisms	1	0/0/1	0/1/0	0/1/0
Transcription	1	1/0/0	0/1/0	0/1/0
RNA processing and modification	222	71/54/97	47/125/50	61/150/11
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	6	1/0/5	0/4/2	2/4/0
Chromatin structure and dynamics;Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	7	3/2/2	1/4/2	2/5/0
General function prediction only	6	4/0/2	3/3/0	0/6/0
Transcription	1	0/1/0	1/0/0	0/1/0
Translation, ribosomal structure and biogenesis	27	12/4/11	8/13/6	8/19/0
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	408	134/114/160	90/204/114	31/226/151
General function prediction only	38	6/11/21	5/21/12	0/23/15
Lipid transport and metabolism	96	35/33/28	27/39/30	7/47/42
Signal transduction mechanisms	508	290/81/137	183/247/78	95/379/34
Carbohydrate transport and metabolism	7	6/1/0	0/6/1	2/3/2
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; Transcription	16	10/1/5	6/6/4	3/13/0
Cytoskeleton	26	18/1/7	17/6/3	4/21/1
Cytoskeleton; General function prediction only	3	3/0/0	2/1/0	0/3/0
Defense mechanisms	2	1/1/0	0/2/0	1/1/0
Extracellular structures	1	1/0/0	1/0/0	1/0/0
General function prediction only	62	38/13/11	24/30/8	19/41/2
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	47	26/7/14	17/25/5	4/42/1
Intracellular trafficking, secretion, vesicular transport; Cytoskeleton	3	2/1/0	3/0/0	0/3/0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1	1/0/0	1/0/0	0/1/0
RNA processing and modification	2	2/0/0	2/0/0	0/2/0
Transcription	310	132/68/110	80/174/56	85/208/17
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	1	1/0/0	1/0/0	0/1/0
Energy production and conversion	9	4/1/4	3/4/2	0/7/2
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	1	0/0/1	0/1/0	0/1/0
Lipid transport and metabolism; Signal transduction mechanisms	5	2/1/2	1/1/3	0/5/0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1	0/0/1	0/1/0	0/0/1
Replication, recombination and repair	29	9/10/10	7/17/5	15/14/0
Replication, recombination, repair; Chromatin structure, dynamics	2	1/0/1	1/1/0	2/0/0
Replication, recombination and repair; Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	6	1/1/4	1/3/2	1/4/1
RNA processing and modification	1	1/0/0	0/1/0	0/1/0
Signal transduction mechanisms; Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; Replication, recombination and repair	2	1/0/1	1/1/0	1/1/0
Translation, ribosomal structure and biogenesis	145	50/28/67	35/78/32	40/97/8
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	1	0/0/1	0/1/0	0/1/0
Lipid transport and metabolism; Signal transduction mechanisms	4	1/2/1	2/2/0	1/1/2
Signal transduction mechanisms	12	6/3/3	4/6/2	3/9/0
Transcription	1	1/0/0	1/0/0	1/0/0

Примечание: «+» – активируемые гены, «-» – репрессируемые гены; нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены; НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка; ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Среди репрессированных на стадии примордия были метаболические пути, связанные со структурой и динамикой хроматина, репликацией, рекомбинацией и репарацией, обработкой и модификацией РНК, транспортом и метаболизмом коферментов. Метаболические пути, ответственные за транспорт и метаболизм аминокислот, посттрансляционную модификацию белков, шапероны, внутриклеточный транспорт, секрецию и везикулярный транспорт, транспорт и метаболизм липидов, были насыщены активированными/репрессированными генами практически в равном соотношении, с преобладанием нДЭГ относительно непигментированного мицелия. Среди репрессированных на стадии плодового тела были метаболические пути, связанные с транспортом и метаболизмом аминокислот, углеводов, коферментов, липидов, неорганических ионов, биосинтезом, транспортом и катаболизмом вторичных метаболитов (Таблица 24, рисунок 49А–В). Применение базы данных KOG, с одной стороны, позволило подтвердить информацию, полученную с помощью базы данных KEGG, с другой стороны, выявить отсутствующие функциональные категории.

Таблица 24 – Анализ активации/репрессии основных функциональных групп генов в процессе онтогенеза *L. edodes*, с использованием базы данных KOG

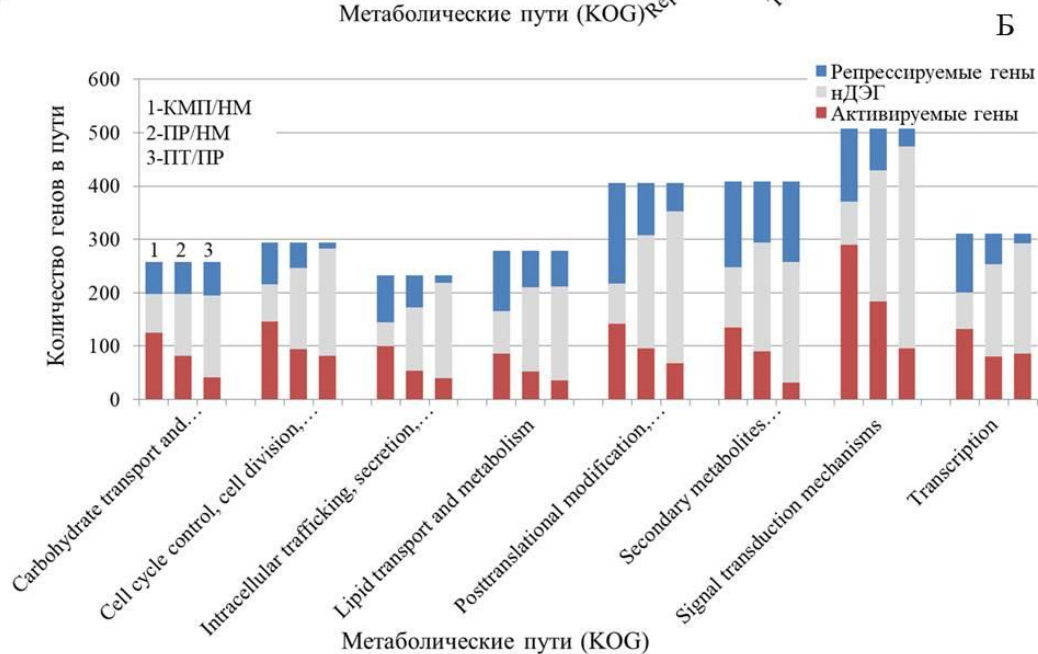
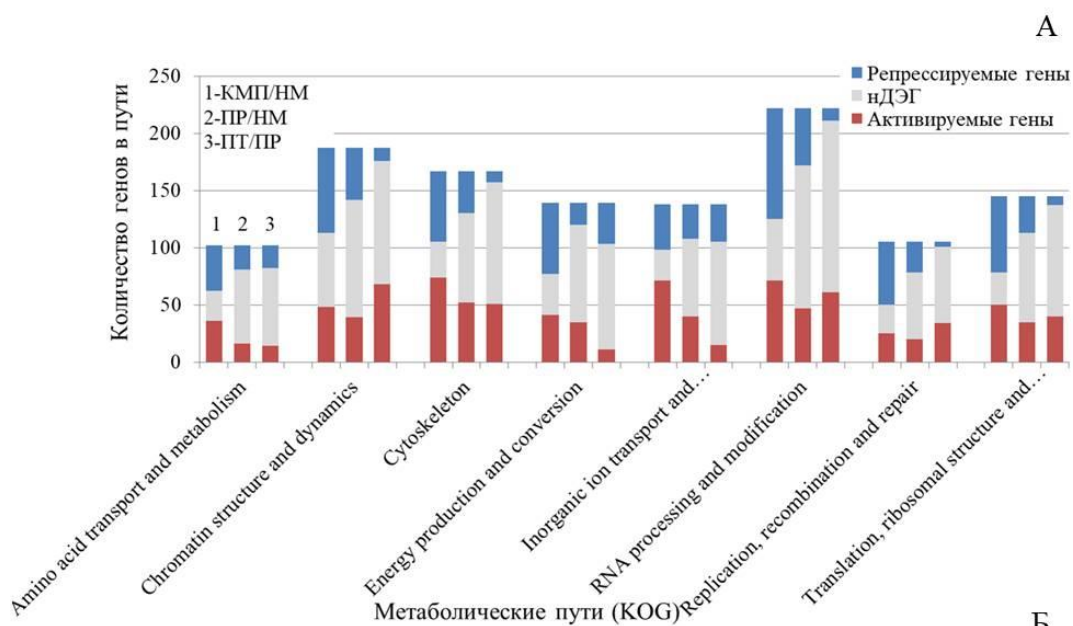
Название метаболического пути (KOG)	Всего генов в пути	ДЭГ	ДЭГ	ДЭГ
		КМП/НМ	ПР/НМ	ПТ/ПР
Amino acid transport and metabolism	102	76	37	34
Carbohydrate transport and metabolism	257	185	141	104
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	294	224	141	94
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	46	39	29	16
Chromatin structure and dynamics	187	122	84	79
Coenzyme transport and metabolism	24	17	12	9
Cytoskeleton	167	136	89	61
Defense mechanisms	87	66	41	37
Energy production and conversion	139	103	54	37
Extracellular structures	9	7	1	2
General function prediction only	70	59	34	23
Inorganic ion transport and metabolism	138	111	70	48
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	232	188	113	54
Lipid transport and metabolism	278	199	120	102
Nuclear structure	15	11	7	6
Nucleotide transport and metabolism	54	46	18	14
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	405	329	192	120
Replication, recombination and repair	105	80	47	38
RNA processing and modification	222	168	97	72
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	408	294	204	182
Signal transduction mechanisms	508	427	261	129
Transcription	310	242	136	102
Translation, ribosomal structure and biogenesis	145	117	67	48

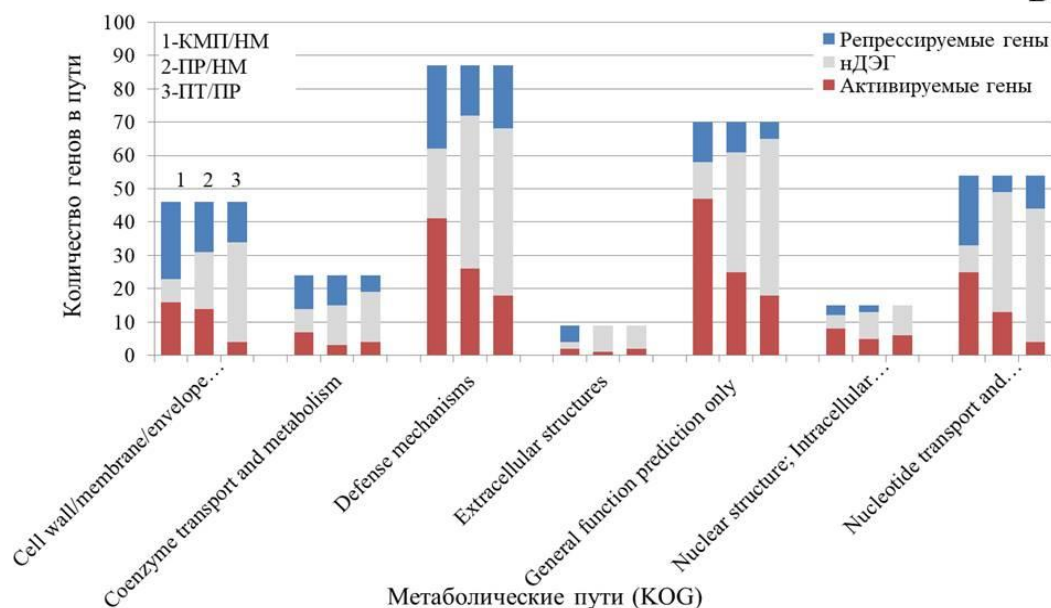
Примечание: активируемые гены отмечены красным цветом, репрессуемые гены отмечено синим цветом. ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка; ПР – примордий; ПТ – плодовое тело.

Таким образом, помощью баз данных KEGG и KOG мы обнаружили, что в коричневой мицелиальной пленке по сравнению с непигментированным мицелием происходит репрессия клеточных процессов, связанных с хранением, передачей и реализацией генетической

информации (DNA replication, Purine metabolism, Mismatch repair, Nucleotide excision repair, RNA polymerase, Ribosome biogenesis in eukaryotes, Spliceosome, Ribosome, Non-homologous end-joining), с метаболизмом аминокислот (Cysteine and methionine metabolism, Histidine metabolism, Lysine biosynthesis, Tryptophan metabolism), с межклеточным транспортом веществ (Protein export, SNARE interactions in vesicular transport, Endocytosis). Снижение пролиферации, дыхательной активности, перестройка информационных путей, свидетельствует о снижении общей метаболической активности, и указывает на то, что пленка, в отличие от непигментированного мицелия, менее динамична, и одной из ее функций является защита клеток от неблагоприятных воздействий, особенно перед образованием базидиом.

Однако, помимо этого, в коричневой мицелиальной пленке происходят процессы, дающие основание полагать, что это не мертвая, неактивная структура, выполняющая только «каркасную» защитную функцию, а живая метаболически активная система, несущая полифункциональную нагрузку, активно взаимодействующая с ниже расположенным мицелием и окружающей средой и выполняющая важнейшие регуляторные функции в процессе онтогенеза.





База данных Eukaryotic Orthology Groups (KOG) families;

Группы сравнения: 1– коричневая мицелиальная пленка (КМП) относительно непигментированного мицелия (НМ), 2 – примордий (ПР) относительно непигментированного мицелия (НМ), 3 – плодовое тело (ПТ) относительно примордия (ПР); ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены (активируемые отмечены красным цветом, репрессируемые отмечены синим цветом); нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены (отмечены серым цветом).

Рисунок 49 – Метаболические пути и функциональные категории, насыщенные транскриптами ДЭГ *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза

По сравнению с непигментированным мицелием здесь активируются пути, ответственные за сигнальные процессы (MAPK signaling pathway, AMPK signaling pathway, sphingolipid signaling pathway), программируемую клеточную смерть (phagosome, ubiquitin mediated proteolysis, mitophagy, apoptosis), межклеточные контакты и цитоскелет (gap junction, regulation of actin cytoskeleton, focal adhesion), биосинтез липидов и пигментов (fatty acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, melanogenesis) (Таблица 25).

Также, охарактеризованы особенности основного метаболизма грибных клеток в генеративных образованиях (примордии и плодовом теле) относительно вегетативного мицелия базидиомицета *L. edodes*. В базидиомах относительно вегетативного мицелия было обнаружено более 100 активируемых и 50 репрессируемых путей. Категории, ответственные за передачу сигналов и межклеточное взаимодействие, реструктуризацию цитоскелета, регуляцию защитных механизмов, апоптоза, биосинтеза и транспорта аминокислот и углеводов, насыщены активируемыми генами. В репрессии находятся метаболические пути, связанные с хранением, передачей и реализацией генетической информации, посттрансляционной модификацией белков, транспортом и метаболизмом коферментов, деградацией ароматических соединений, жирных и аминокислот. Таким образом, сравнительный анализ транскриптомов вегетативного

мицелия и генеративных структур базидиомицета *L. edodes* позволил выявить различия в профиле экспрессии групп генов, входящих в целый ряд функциональных категорий и охарактеризовать особенности физиологических процессов, связанных с онтогенетической перестройкой метаболических путей в грибных клетках и инициацией образования базидиом у высших грибов.

Таблица 25 – Функциональные категории KEGG и KOG, насыщенные транскриптами генов *L. edodes*, активируемых/репрессируемых на стадии коричневой мицелиальной пленки по сравнению с непигментированным мицелием

№ пути в KEGG	Название пути в KEGG	Общее кол-во генов в пути	Кол-во активируемых/репрессируемых генов в пути	Отношение шансов	р-уровень
Активируемые					
abv04011	MAPK signaling pathway	91	71	5.9	0
abv01212	Fatty acid metabolism	29	18	2.65	0.01
abv00620	Pyruvate metabolism	47	26	2.01	0.01
abv00515	Mannose type O-glycan biosynthesis	4	4	Inf	0.02
abv01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	19	12	2.77	0.02
abv03013	RNA transport	118	56	1.47	0.02
abv04145	Phagosome	43	23	1.86	0.03
abv04120	Ubiquitin mediated proteolysis	75	37	1.58	0.03
abv04139	Mitophagy	40	21	1.79	0.05
map04011	MAPK signaling pathway– yeast	93	72	4.28	0
map04540	Gap junction	28	22	4.54	0
map04152	AMPK signaling pathway	32	23	3.16	0
map04210	Apoptosis	23	17	3.5	0
map04916	Melanogenesis	25	18	3.18	0.01
map04071	Sphingolipid signaling pathway	40	26	2.3	0.01
map04810	Regulation of actin cytoskeleton	32	21	2.36	0.01
map04510	Focal adhesion	21	14	2.47	0.04
Репрессируемые					
abv03050	Proteasome	42	30	3.9	0
abv03010	Ribosome	71	42	2.26	0
abv00040	Pentose and glucuronate interconversions	25	18	3.99	0
abv03060	Protein export	15	11	4.26	0.01
abv03030	DNA replication	43	24	1.96	0.02
abv03420	Nucleotide excision repair	56	30	1.79	0.02
abv00340	Histidine metabolism	27	16	2.25	0.03
abv03450	Non-homologous end-joining	20	12	2.32	0.05

map01100	Metabolic pathways	913	384	1.43	0
map00040	Pentose and glucuronate interconversions	28	22	6.99	0
map03010	Ribosome	78	47	2.9	0
map03050	Proteasome	40	28	4.45	0
map03040	Spliceosome	88	45	2	0
map03450	Non-homologous end-joining	12	9	5.7	0.01
map04623	Cytosolic DNA-sensing pathway	12	9	5.7	0.01
map03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	87	42	1.78	0.005
map03060	Protein export	16	11	4.18	0.01
map04144	Endocytosis	70	34	1.8	0.01
map04130	SNARE interactions in vesicular transport	15	10	3.8	0.01
map00340	Histidine metabolism	28	16	2.54	0.01
map03420	Nucleotide excision repair	54	27	1.9	0.01
map03430	Mismatch repair	31	17	2.31	0.02
map03020	RNA polymerase	25	14	2.42	0.02
map04217	Necroptosis	28	15	2.19	0.03
map03030	DNA replication	45	22	1.82	0.03
map03022	Basal transcription factors	26	14	2.22	0.03
map00230	Purine metabolism	91	40	1.49	0.04
map00785	Lipoic acid metabolism	3	3	Inf	0.04

Примечание: номера путей *A. bisporus* обозначены префиксом abv, номера всех известных путей KEGG обозначены префиксом map.

(Gubaev *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1134/S0026893318040076>)

5.7.6 Классификация ДЭГ по функциональным категориям с использованием базы данных Gene Ontology (GO) на стадиях непигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки *L. edodes*

Помимо баз данных KEGG и KOG ДЭГ были классифицированы в функциональные категории базы данных GO. С помощью программы Blast2Go собранным транскриптам были присвоены идентификационные GO-номера. Затем с помощью Blast2Go ДЭГ были распределены в 36 и 97 категорий, насыщенных активируемыми и репрессируемыми генами, соответственно, с q-уровнем значимости меньше 0.05. Кроме того, было найдено 158 и 299 категорий, насыщенных активируемыми и репрессируемыми генами *L. edodes*, соответственно, с p-уровнем значимости меньше 0.05 (Gubaev *et al.*, 2018).

Поскольку функциональные категории GO имеют иерархическую структуру, были удалены некоторые глобальные категории, например: Cellular component, Membrane, анализируя которые, трудно сделать вывод о конкретных процессах, протекающих в клетке. Затем мы отобрали и классифицировали более «специализированные» категории, которые потенциально могут участвовать при смене стадий онтогенеза *L. edodes* (Таблица 26).

Таблица 26 – Функциональные категории Blast2Go, насыщенные транскриптами генов *L. edodes*, активируемых/репрессируемых на стадии коричневой мицелиальной пленки по сравнению с непигментированным мицелием

Активируемые					
	GO ID	GO Category	GO Name	P-Value	FDR
G-белки	GO:0007266	BIOLOGICAL_PROCESS	Rho protein signal transduction	3,62E-05	0,007287
G-белки	GO:0005834	CELLULAR_COMPONENT	heterotrimeric G-protein complex	0,033136	1
G-белки	GO:1905360	CELLULAR_COMPONENT	GTPase complex	0,033136	1
G-белки	GO:0005088	MOLECULAR_FUNCTION	Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity	1,44E-05	0,003349
G-белки	GO:0005089	MOLECULAR_FUNCTION	Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	1,44E-05	0,003349
G-белки	GO:0004930	MOLECULAR_FUNCTION	G-protein coupled receptor activity	0,006679	0,484275
G-белки	GO:0008528	MOLECULAR_FUNCTION	G-protein coupled peptide receptor activity	0,014744	0,789945
G-белки	GO:0001664	MOLECULAR_FUNCTION	G-protein coupled receptor binding	0,033136	1
Биосинтез клеточных стенок	GO:0046349	BIOLOGICAL_PROCESS	amino sugar biosynthetic process	0,039528	1
Биосинтез клеточных стенок	GO:0042546	BIOLOGICAL_PROCESS	cell wall biogenesis	0,033136	1
Биосинтез клеточных стенок	GO:0006031	BIOLOGICAL_PROCESS	chitin biosynthetic process	0,039528	1
Биосинтез клеточных стенок	GO:1901073	BIOLOGICAL_PROCESS	glucosamine-containing compound biosynthetic process	0,039528	1
Биосинтез клеточных стенок	GO:0006030	BIOLOGICAL_PROCESS	chitin metabolic process	0,039528	1
Биосинтез клеточных стенок	GO:0004100	MOLECULAR_FUNCTION	chitin synthase activity	0,039528	1
транспорт ионов	GO:0030001	BIOLOGICAL_PROCESS	metal ion transport	0,014744	0,789945
транспорт ионов	GO:0006812	BIOLOGICAL_PROCESS	cation transport	0,022522	1
транспорт ионов	GO:0006811	BIOLOGICAL_PROCESS	ion transport	0,043798	1
транспорт ионов	GO:0015075	MOLECULAR_FUNCTION	ion transmembrane transporter activity	4,88E-05	0,009384
транспорт ионов	GO:0005381	MOLECULAR_FUNCTION	iron ion transmembrane transporter activity	0,010636	0,742451
транспорт ионов	GO:0015085	MOLECULAR_FUNCTION	calcium ion transmembrane transporter activity	0,010636	0,742451
транспорт ионов	GO:0015077	MOLECULAR_FUNCTION	monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	0,046465	1
транспорт ионов	GO:0008509	MOLECULAR_FUNCTION	anion transmembrane transporter activity	0,04304	1
транспорт ионов	GO:0072509	MOLECULAR_FUNCTION	divalent inorganic cation transmembrane transporter activity	0,031505	1
транспорт ионов	GO:0005507	MOLECULAR_FUNCTION	copper ion binding	0,024299	1
транспорт ионов	GO:0046872	MOLECULAR_FUNCTION	metal ion binding	0,027078	1
Репрессируемые					
	GO ID	GO Category	GO Name	P-Value	FDR
Биосинтез белка	GO:0016072	BIOLOGICAL_PROCESS	rRNA metabolic process	0,014543	0,347702
Биосинтез белка	GO:0006364	BIOLOGICAL_PROCESS	rRNA processing	0,007923	0,2768
Биосинтез белка	GO:0006399	BIOLOGICAL_PROCESS	tRNA metabolic process	0,00673	0,242
Биосинтез белка	GO:0034227	BIOLOGICAL_PROCESS	tRNA thio-modification	0,013488	0,334841
Биосинтез белка	GO:0002098	BIOLOGICAL_PROCESS	tRNA wobble uridine modification	0,001038	0,05425
Биосинтез белка	GO:0005840	CELLULAR_COMPONENT	ribosome	0,000134	0,013156
Биосинтез белка	GO:0003735	MOLECULAR_FUNCTION	structural constituent of ribosome	0,000961	0,05312
Дыхание	GO:0022900	BIOLOGICAL_PROCESS	electron transport chain	0,019613	0,444855
Дыхание	GO:1901663	BIOLOGICAL_PROCESS	quinone biosynthetic process	0,045586	0,661076
Дыхание	GO:1901661	BIOLOGICAL_PROCESS	quinone metabolic process	0,045586	0,661076
Дыхание	GO:0006744	BIOLOGICAL_PROCESS	ubiquinone biosynthetic process	0,045586	0,661076
Клеточное деление	GO:0000910	BIOLOGICAL_PROCESS	cytokinesis	0,008134	0,278877
Клеточное деление	GO:0061640	BIOLOGICAL_PROCESS	cytoskeleton-dependent cytokinesis	0,010793	0,334841
Клеточное деление	GO:0000278	BIOLOGICAL_PROCESS	mitotic cell cycle	0,00759	0,270734
Клеточное деление	GO:0000281	BIOLOGICAL_PROCESS	mitotic cytokinesis	0,003848	0,153313
Клеточное деление	GO:0044774	BIOLOGICAL_PROCESS	mitotic DNA integrity checkpoint	0,0139	0,334841
Клеточное деление	GO:0045787	BIOLOGICAL_PROCESS	positive regulation of cell cycle	0,032768	0,614124
Клеточное деление	GO:0045931	BIOLOGICAL_PROCESS	positive regulation of mitotic cell cycle	0,013488	0,334841
Клеточное деление	GO:0051726	BIOLOGICAL_PROCESS	regulation of cell cycle	0,019149	0,438835
Клеточное деление	GO:0051302	BIOLOGICAL_PROCESS	regulation of cell division	0,013488	0,334841
Клеточное деление	GO:0007346	BIOLOGICAL_PROCESS	regulation of mitotic cell cycle	0,010938	0,334841
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0006281	BIOLOGICAL_PROCESS	DNA repair	0,006318	0,229041
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0045005	BIOLOGICAL_PROCESS	DNA-dependent DNA replication maintenance of fidelity	0,0139	0,334841
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0009451	BIOLOGICAL_PROCESS	RNA modification	5,06E-05	0,005895
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0006396	BIOLOGICAL_PROCESS	RNA processing	2,35E-06	0,000611
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0006397	BIOLOGICAL_PROCESS	mRNA processing	0,005327	0,197989
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0000398	BIOLOGICAL_PROCESS	mRNA splicing, via spliceosome	0,00013	0,013102
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0034660	BIOLOGICAL_PROCESS	ncRNA metabolic process	0,000995	0,05425
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0000428	CELLULAR_COMPONENT	DNA-directed RNA polymerase complex	0,000864	0,048981
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0055029	CELLULAR_COMPONENT	nuclear DNA-directed RNA polymerase complex	0,000864	0,048981
Метаболизм ДНК и РНК	GO:0030880	CELLULAR_COMPONENT	RNA polymerase complex	0,000864	0,048981
Протеасомы	GO:0010499	BIOLOGICAL_PROCESS	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	0,003339	0,140642
Протеасомы	GO:0043161	BIOLOGICAL_PROCESS	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	0,004336	0,166778
Протеасомы	GO:0006508	BIOLOGICAL_PROCESS	proteolysis	0,000208	0,016681
Протеасомы	GO:0006511	BIOLOGICAL_PROCESS	ubiquitin-dependent protein catabolic process	0,000767	0,047123
Протеасомы	GO:0022624	CELLULAR_COMPONENT	proteasome accessory complex	0,000308	0,022736
Протеасомы	GO:0000502	CELLULAR_COMPONENT	proteasome complex	1,67E-06	0,000498
Протеасомы	GO:0005839	CELLULAR_COMPONENT	proteasome core complex	2,63E-05	0,003425
Протеасомы	GO:0019773	CELLULAR_COMPONENT	proteasome core complex, alpha-subunit complex	0,010793	0,334841
Протеасомы	GO:0019774	CELLULAR_COMPONENT	proteasome core complex, beta-subunit complex	0,003339	0,140642
Протеасомы	GO:0005838	CELLULAR_COMPONENT	proteasome regulatory particle	0,001038	0,05425

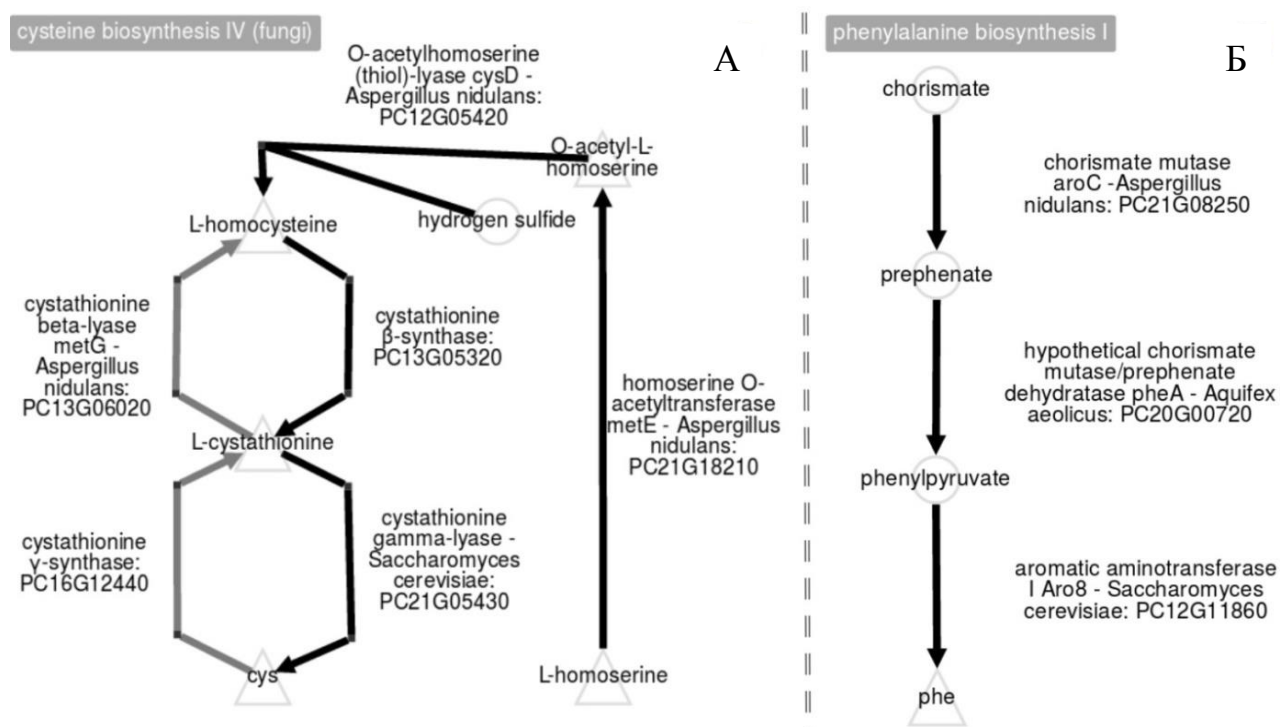
Применение этой базы данных, с одной стороны, позволило подтвердить информацию, полученную с помощью KEGG. Так, на стадии коричневой мицелиальной пленки мы обнаружили активацию категорий, связанных с G-белками (Rho protein signal transduction, heterotrimeric G-protein complex, G-protein coupled receptor activity, Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity) – важными компонентами сигнальных сетей, необходимых для передачи сигналов и регуляции внутриклеточных процессов. Также происходит значительная активация в функционировании метаболических путей, связанных с митоген-активированными протеинкиназами (МАР-киназы), которые регулируют такие функции клеток как дифференцировка, выживаемость, участвуют в управлении клеточного ответа и адаптации на стрессовые раздражители (ультрафиолетовое облучение, тепловой, осмотический шок, действие патогенов). Известно, например, что у дрожжей МАР-киназы ответственны за остановку клеточного цикла и спаривание клеток, то есть инициируют процесс полового размножения. Активацию МАР-киназ мы обнаружили также с помощью базы данных KEGG. Была идентифицирована репрессия клеточных процессов, связанных с биогенезом рибосом и метаболизмом ДНК и РНК, то есть группы генов, продукты которых участвуют в метаболизме нуклеиновых кислот и белков (DNA-dependent DNA replication maintenance of fidelity, DNA repair, RNA polymerase complex, mRNA processing, ribosome, rRNA processing, tRNA metabolic process), репрессировались на этой стадии (Gubaev *et al.*, 2018).

С другой стороны, с помощью базы Blast2Go выявлены отсутствующие в базе данных KEGG категории. При формировании мицелиальной пленки происходила активация генов, составляющих GO-термины, связанные с транспортом ионов, в том числе металлов (metal ion transport, copper ion binding, iron ion transmembrane transporter activity, calcium ion transmembrane transporter activity), биогенезом клеточных стенок (chitin biosynthetic process, cell wall biogenesis). К GO-терминам, насыщенным репрессированными генами, относились категории, связанные с клеточным делением (mitotic cell cycle cytoskeleton-dependent cytokinesis, regulation of cell cycle, mitotic cytokinesis), протеасомозависимой деградацией биополимеров (proteasome accessory complex, proteasome core complex, proteasome regulatory particle), дыханием, а именно транспортом электронов по электротранспортной цепи (electron transport chain, ubiquinone biosynthetic process). Среди активированных были обнаружены процессы, участвующие в биогенезе клеточных стенок (биосинтез глюкозаминов, хитина), транспорте ионов внутрь клетки (транспортеры железа, меди) (кофакторами фенол оксидаз являются металлы). Обращает на себя внимание изменения в функционировании путей, связанных с метаболизмом жирных кислот, меланогенезом, работой пируватдегидрогеназного комплекса, различными транспортными и секреторными системами и регуляцией межклеточных сигналов, процессами, связанными с дифференцировкой клеток, регулированием в изменениях цитоскелета, реакцией на стресс. На стадии мицелиальной пленки была обнаружена активация категорий связанных с работой регуляторного белка убиквитина, который регулирует такие важные процессы, как развитие и

дифференцировка клеток, реакция на стресс и патогены. Маркирование убиквитином на этой стадии развития может быть связано также с процессами посттрансляционной модификации белков, в результате чего изменяться их активность и клеточное расположение, а кроме того, убиквитин может участвовать в стимуляции и предотвращении белковых взаимодействий. Особое внимание обращает на себя активация процессов, связанных с везикулярным транспортом, фокальной адгезией и щелевыми контактами (gap junction). Активация генов данных категорий хорошо согласуется с индукцией генов категории «цитоскелет», работа которого необходима для формирования межклеточных контактов. Эти данные свидетельствуют в пользу не только протекторной, но и сенсорно-регуляторной функции мицелиальной пленки.

5.7.7 Классификация ДЭГ по функциональным категориям с использованием web-ресурса BioСус на стадиях непигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки *L. edodes*

Помимо функциональной классификации ДЭГ *L. edodes* с применением баз данных KEGG, KOG и GO, информацию об активируемых/репрессируемых путях дополнили с помощью web-ресурса BioСус, позволяющего визуализировать метаболические пути в виде схем, на которых выделяются активируемые/репрессируемые гены, а также произвести поиск перепредставленных путей (Рисунок 50).



На метаболических схемах ресурса BioСус; слева (А) и справа (Б) приведены примеры выявленных активируемого и репрессируемого метаболических путей, соответственно; черными стрелками выделены реакции, осуществляемые белками, кодируемыми ДЭГ.

Рисунок 50 – Визуализация генов *L. edodes*, экспрессирующихся дифференциально на стадиях непигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки (Gubaev et al., 2018 <https://doi.org/10.1134/S0026893318040076>)

С помощью BioCyc в коричневой мицелиальной пленке обнаружено 4 и 13 путей, представленных репрессируемыми и активируемыми генами, соответственно. Категории BioCyc, связанные с биосинтезом цистеина, лизина и триптофана (cysteine biosynthesis, lysine biosynthesis, tryptophan biosynthesis), фенольных соединений (chorismate biosynthesis, tryptophan biosynthesis), а также с дыханием (TCA cycle, glycolysis), представлены активируемыми генами. К категориям BioCyc, насыщенным репрессируемыми генами, относились биосинтез фенилаланина, компоненты NADH-дегидрогеназного комплекса, а также α -кетоглутарат дегидрогеназный комплекс (Таблица 27).

Таблица 27 – Метаболические пути BioCyc, насыщенные транскриптами генов *L. edodes* активируемых/репрессируемых на стадии коричневой мицелиальной пленки по сравнению с непигментированным мицелием

Идентификатор пути в BioCyc	Название пути в BioCyc	Р-уровень
Активируемые		
Biosynthesis	Biosynthesis	0
Carbohydrates-Biosynthesis	Carbohydrates Biosynthesis	0
ANARESP1-PWY	respiration (anaerobic)	0.02
PWY-2161	folate polyglutamylation I	0.02
TRPSYN-PWY	tryptophan biosynthesis	0.02
IND-AMINO-ACID-SYN	Proteinogenic Amino Acids Biosynthesis	0.02
GLUCONEO-PWY-PCHRY	gluconeogenesis	0.02
PWY-5690	TCA cycle variation III (eukaryotic)	0.03
Amino-Acid-Biosynthesis	Amino Acids Biosynthesis	0.04
PWY-6293	cysteine biosynthesis IV (fungi)	0.04
ANAGLYCOLYSIS-PWY	glycolysis III	0.04
ARO-PWY	chorismate biosynthesis I	0.04
LYSINE-AMINOAD-PWY	lysine biosynthesis IV	0.04
Репрессируемые		
PHENYLALANINE-SYN	L-phenylalanine Biosynthesis	0.02
PWY-5084	2-ketoglutarate dehydrogenase complex	0.02
PWY0-1335	NADH to cytochrome bo oxidase electron transfer	0.04
PWY0-1334	NADH to cytochrome bd oxidase electron transfer	0.04

(Gubaev *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1134/S0026893318040076>)

Таким образом, исходя из полученных данных по BioCyc и Blast2Go, можно сделать выводы, что в коричневой мицелиальной пленке прослеживается торможение клеточного деления, биогенеза рибосом и это происходит потому, что она является постоянной структурой, которая защищает нижележащие слои мицелия, следовательно, эта структура должна синтезировать защитные покровы, а именно клеточную стенку и фенольные соединения. Это согласуется с тем, что происходит активация категорий, связанных с транспортом ионов

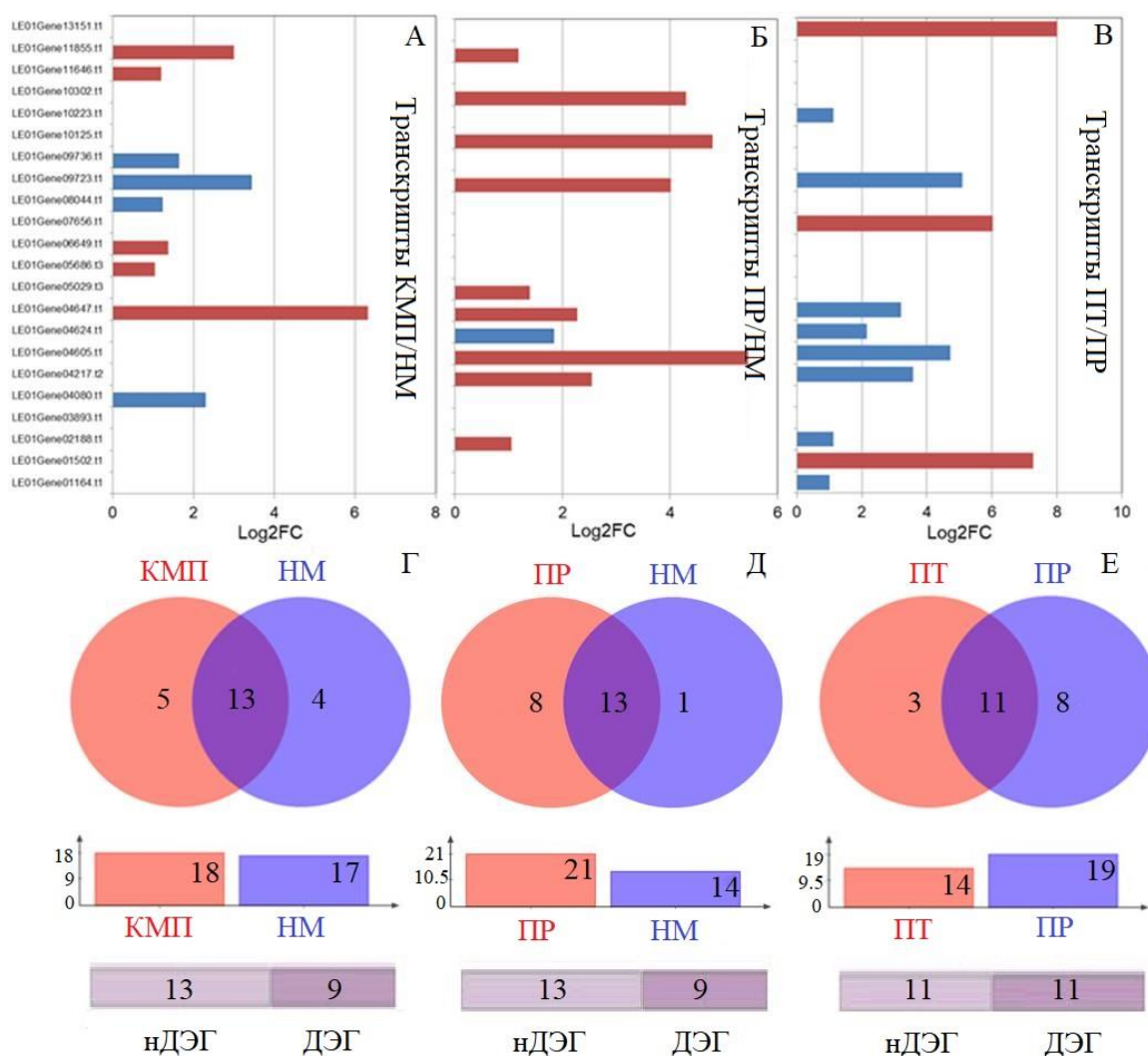
металлов (медь, железо), которые являются кофакторами ферментов фенолоксидаз, участвующих в биосинтезе меланина, а также ароматики (триптофан, хориновая кислота). При этом на данной стадии онтогенеза ограничена пролиферация клеток, это согласуется также с данными электронной микроскопии по ультраструктуре клеток мицелиальной пленки имеющей очень толстую клеточную стенку. Также, по всей видимости, в клетках данной морфоструктуры может идти перестройка процесса дыхания. На поверхности коричневой мицелиальной пленки содержится большое количество фенолов, которые не пропускают кислород, следовательно, клетка должна перестроить энергетический метаболизм с аэробного на анаэробный (это видно по BioCyc и Blast2Go). Активно пролифилируют и расходуют субстрат, необходимый для жизнедеятельности, нижележащие слои непигментированного мицелия, из которых позже образуются примордии и развиваются плодовые тела, в определенное время в зависимости от готовности транскрипционного профиля базидиомицета к началу плодоношения, а также, в том числе, и от внешних факторов. Что подтверждается активация категорий связанных с МАР-киназами и G-белками, поскольку это основные компоненты сигнальных сетей, участвующих в передачи внешних сигналов, что указывает на регуляторную роль коричневой мицелиальной пленки, которая является своего рода сенсорной мембраной, интерфейсом между внешней средой и нижележащими слоями мицелия базидиомицета.

5.8 Верификация данных транскриптомного профилирования

5.8.1 ДЭГ, кодирующие ферменты хитиназы, хитинсинтазы, эндоглюканазы и глюкансинтазы в зависимости от стадии онтогенеза *L. edodes*

Проведенные эксперименты демонстрируют, что формирование коричневой мицелиальной пленки сопряжено с глобальными транскриптомными перестройками. При этом происходит модуляция групп генов, связанных с различными метаболическими и сигнальными процессами. Так, исходя из результатов транскриптомного профилирования, в мицелиальной пленке индуцируются процессы биогенеза клеточных стенок, а именно биосинтез глюкозаминов, хитина, а также связанного с клеточными стенками пигмента меланина. Внутренние слои клеточной стенки базидиомицетов преимущественно состоят из фибрилл хитина и β -глюканов, и модель ее роста предусматривает определенную роль литических ферментов (хитиназ, хитинсинтаз и глюканаз) в поддержании баланса между синтезом и лизисом компонентов, что является необходимым для постоянной перестройки полисахаридов данного компартмента. Синтез хитина *de novo* катализируется ассоциированными с мембранами синтазами (Lenardon *et al.*, 2010; Roncero, 2002). Число генов хитинсинтазы в грибах может варьировать от одного у *Schizosaccharomyces pombe* до восьми у мицелиальных аскомицетов *Aspergillus fumigatus* и *A. nidulans* или у базидиомицетов *Cryptococcus neoformans* и *Ustilago maydis* (Lenardon *et al.*, 2010). Хитинсинтазы участвуют в осуществлении таких процессов, как образование клеточной

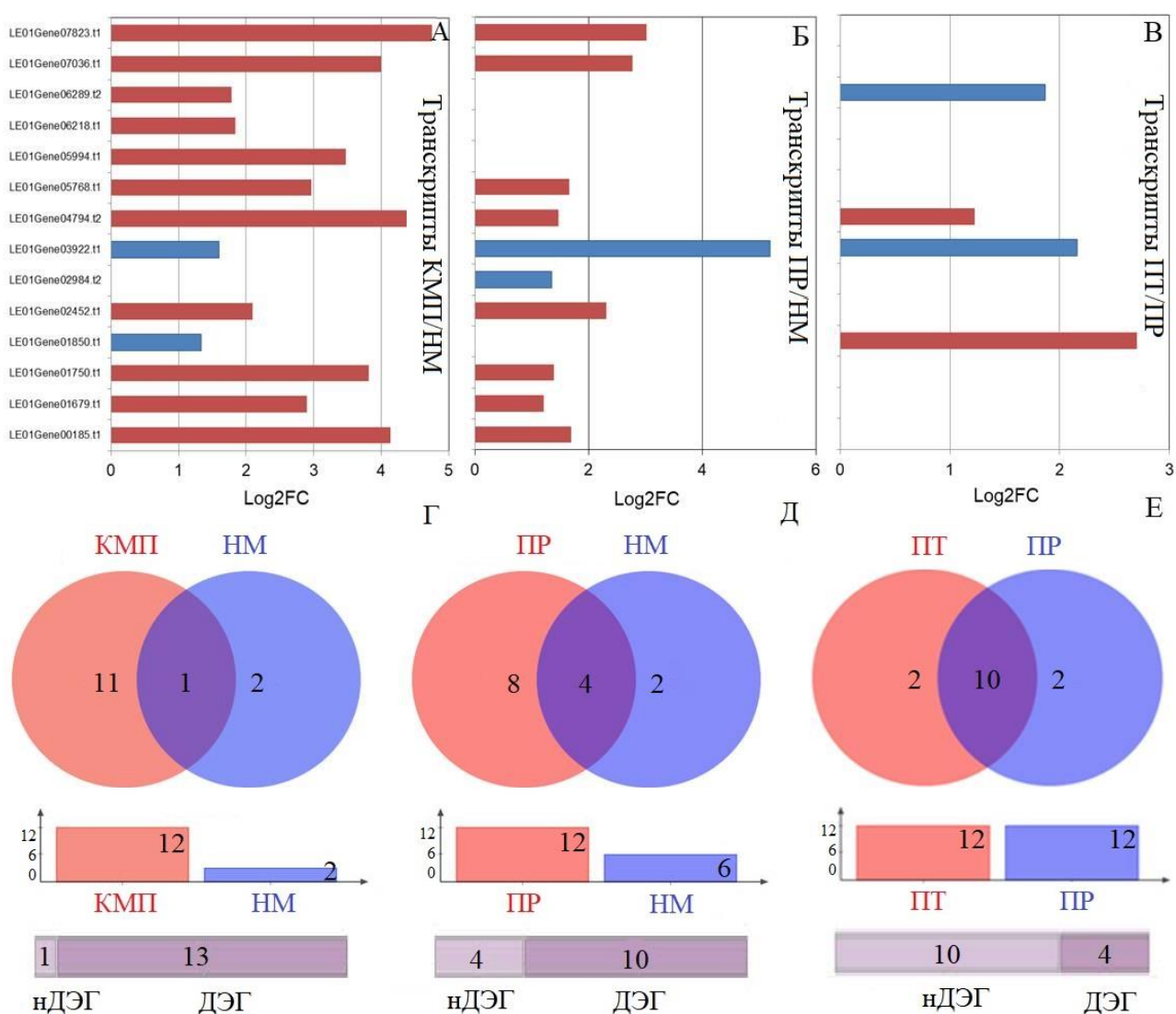
перегородки, деление клеток, поляризованный (апикальный) рост, реакция на стресс или в отношениях «хозяин–патоген» (Sánchez-Vallet *et al.*, 2014; Ichinomiya *et al.*, 2005; Silverman *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2006; Treitschke *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2013). Хитинсинтазы локализируются на плазматической мембране в местах апикального роста, где они далее преобразуются в свою активную форму (Durán *et al.*, 1975; Bowen *et al.*, 1992; Valdivia and Schekman, 2003; Starr *et al.*, 2012). Будучи связанными с плазматической мембраной, хитинсинтазы катализируют векторный синтез хитиновых цепей из активированных мономеров UDP-GlcNAc, высвобождая образующийся полимер во внеклеточное пространство. Там отдельные хитиновые цепи связываются друг с другом посредством внутримолекулярных взаимодействий, образуя хитиновые микрофибриллы, и происходит ковалентное сшивание с глюканами клеточной стенки (Cabib *et al.*, 2007; Cabib and Arroyo, 2013; Teparić and Mrša, 2013).



ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР. НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 51 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих хитиназы

Нами было установлено, что в категории хитиназы заметная активация происходила в примордии относительно непигментированного мицелия; транскрипционная активность значительной части генов возрастала от 2 до 44 раз. Более половины генов хитиназы дифференциально не экспрессировалась на данных стадиях развития, также как и на стадии коричневой мицелиальной пленки относительно непигментированного мицелия. Однако на данном этапе развития присутствовали гены с относительной величиной экспрессии в 10–40 раз выше, чем в мицелии. В плодовом теле большая группа генов, ответственных за работу ферментов хитиназ находилась в репрессии или не экспрессировалась дифференциально, однако активация отдельных генов возрастала до 65–256 раз (Рисунок 51).



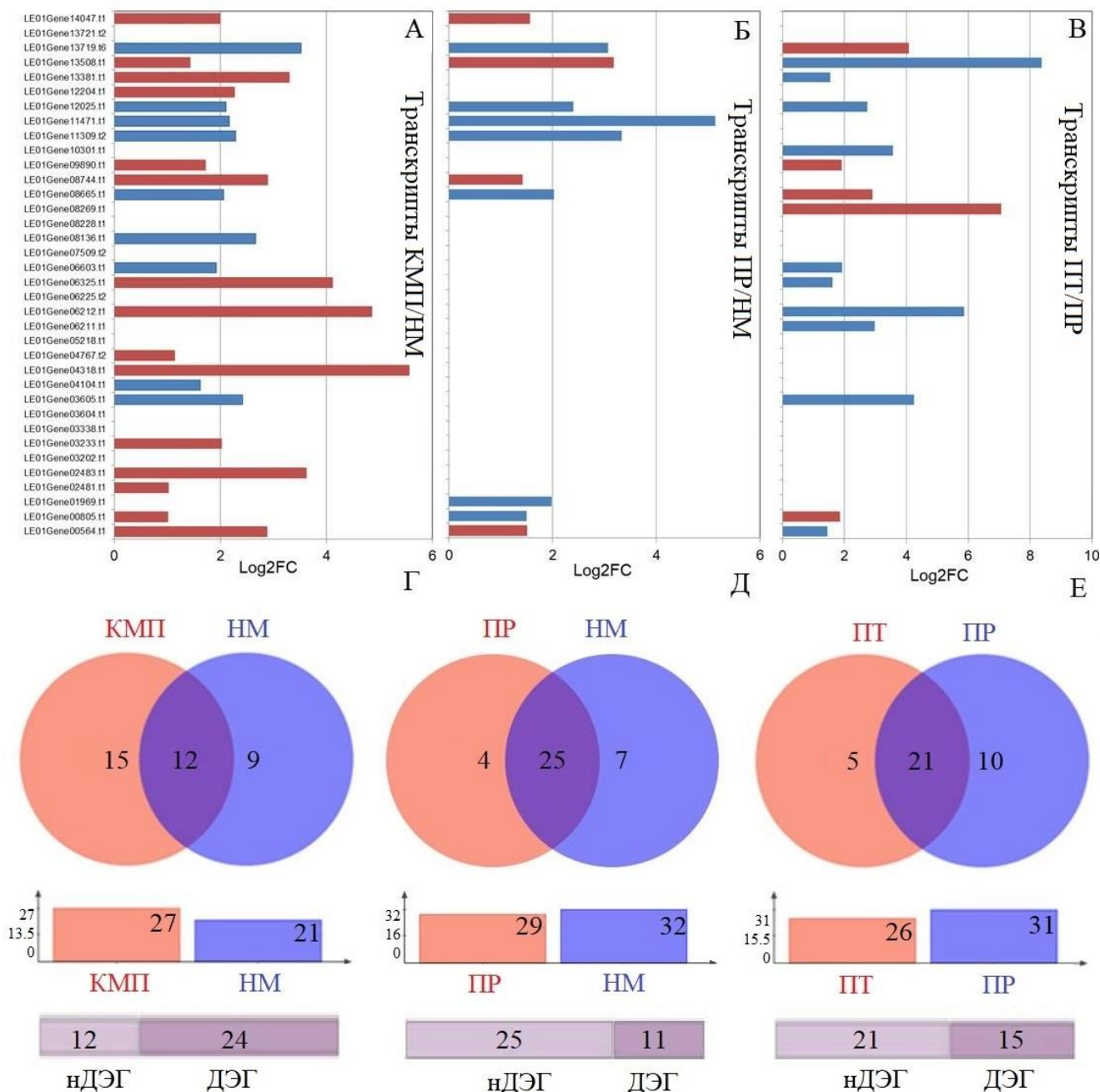
ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР.

НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,

ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 52 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих хитинсинтазы

Большая часть генов, кодирующих хитинсинтазы на начальных этапах формирования базидиом, активировалась в 2.5–8 раз. В зрелых плодовых телах эта группа генов дифференциально не экспрессировалась, а часть генов данной категории находилась в репрессии. На стадии мицелиальной пленки происходила значительная активация транскриптов в данной категории, подавляющее число генов были активированы, транскрипты хитинсинтазы в 2–30 раз сильнее экспрессировались по сравнению с непигментированным мицелием (Рисунок 52).



ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР.

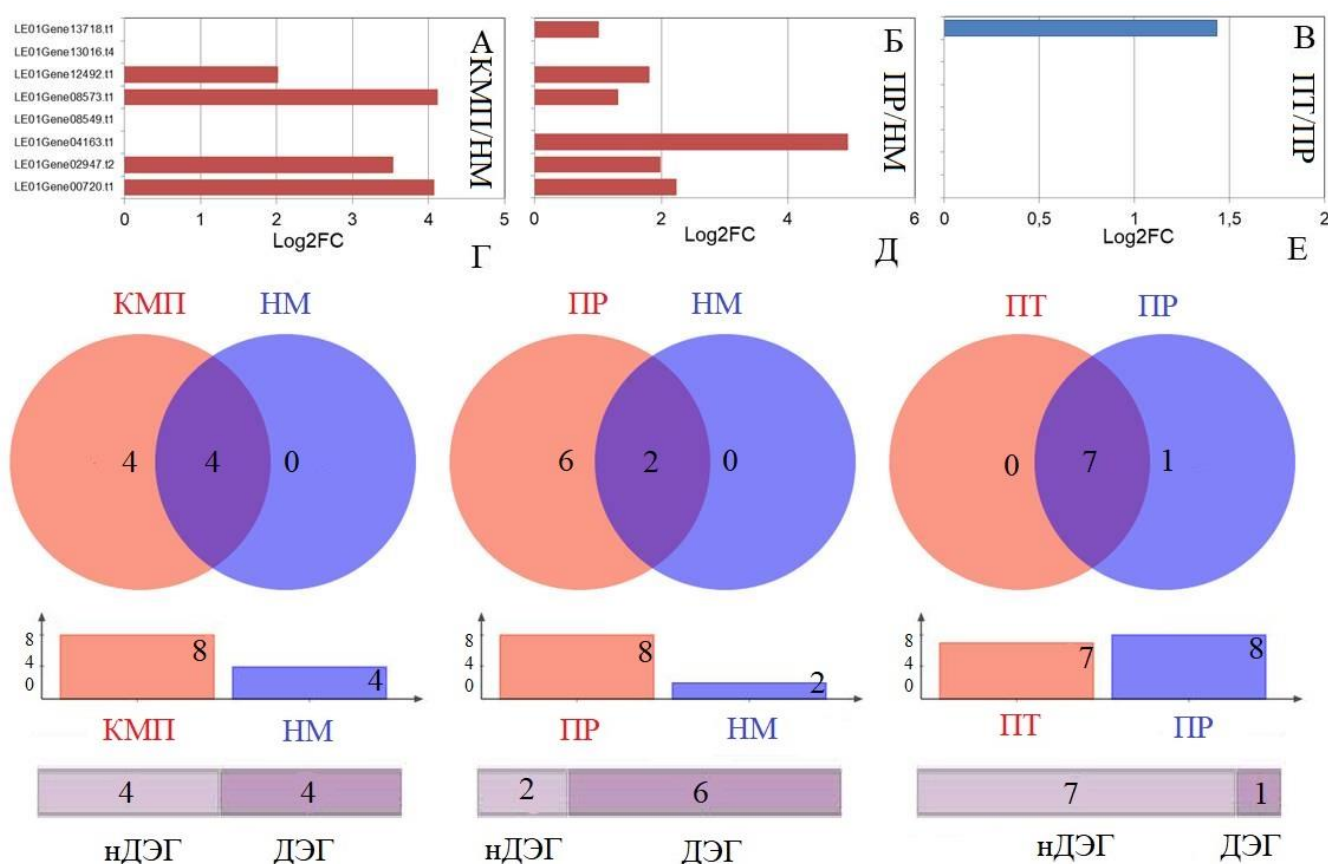
НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,

ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 53 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих эндоглюканазы

В дифференциальной экспрессии группы генов, кодирующих глюканазы, наблюдалась как активация, так и репрессия генов. Заметны различия в экспрессии в сторону увеличения между стадиями примордиев и плодовых тел. Активация генов в примордиях составляла от 2.7 до 9 раз, репрессия – 2.8–35 раз, в плодовых телах – гены активировались от 2.5 до 133 раз, репрессировались – от 2.7 до 332 раз. Подавляющее число генов на данных стадиях нДЭГ. В мицелиальной пленки наоборот, большая часть генов находилась в активации по сравнению с мицелием, с максимумом активности более чем 50 раз (Рисунок 53).

Глюкансинтазы были представлены активными транскриптами на стадиях мицелиальной пленки и примордий относительно непигментированного мицелия. В плодовых телах один ген находился в репрессии по сравнению примордием, остальные – нДЭГ. Таким образом, группы генов, кодирующих глюкансинтазы, также как и ферменты хитинсинтазы, были насыщены высокоактивными транскриптами на стадиях коричневой мицелиальной пленки и при образовании примордиев у базидиомицета *L. edodes* (Рисунок 54).



ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР.

НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,

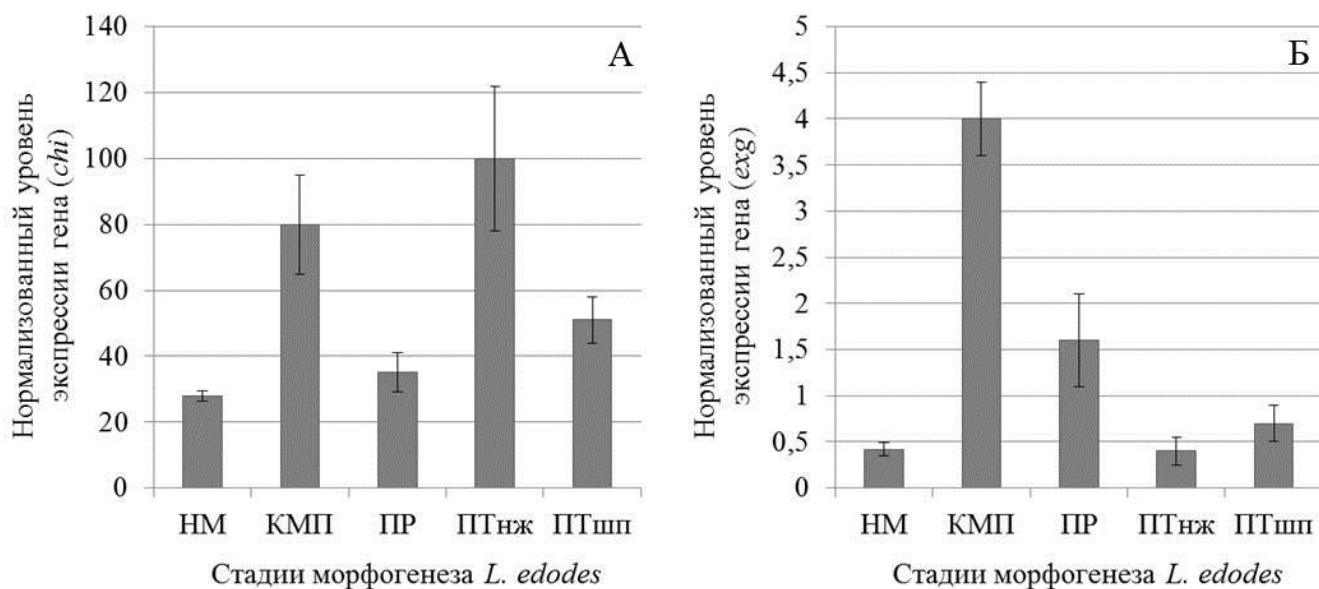
ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 54 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих глюкансинтазы

При формировании морфогенных структур, происходит сильное утолщение и растяжение клеточной стенки, в отличие от тонкостенных гиф непиgmentированного мицелия, появляется большое количество толстостенных «опорных» гиф, отмечается усиление гифальной агрегации. Данные ферменты необходимы в процессе автолиза субапикальных клеток грибов, принимая, таким образом, участие в процессе ветвления и роста гиф. Экспериментальные данные показывают высокий уровень транскрипционной активности генов хитиназ, хитинсинтаз, глюканаз и глюкансинтаз необходимых для морфогенеза клеточной стенки при апикальном росте, прорастании и высвобождении спор, клеточном делении и ветвлении мицелия, механических повреждениях базидиомицета.

5.8.2 Динамика экспрессии генов хитиназы (*chi*) и глюканазы (*exg*)

Нами была проведена верификация данных высокопроизводительного секвенирования с помощью ПЦР в реальном времени и установлено, что транскрипты генов *chi* и *exg*, кодирующих ферменты хитиназы и глюканазы, необходимые в процессах синтеза и лизиса компонентов клеточной стенки при росте гиф и морфогенезе базидиомицетов, детектировали на всех стадиях развития. Уровень экспрессии генов зависел от конкретной стадии онтогенеза и был наиболее высоким на стадии коричневой мицелиальной пленки (Рисунок 55).



Данные нормализованы по транскрипционной активности гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gpd*);

НМ – непиgmentированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело (нж – ножка, шп – шляпка).

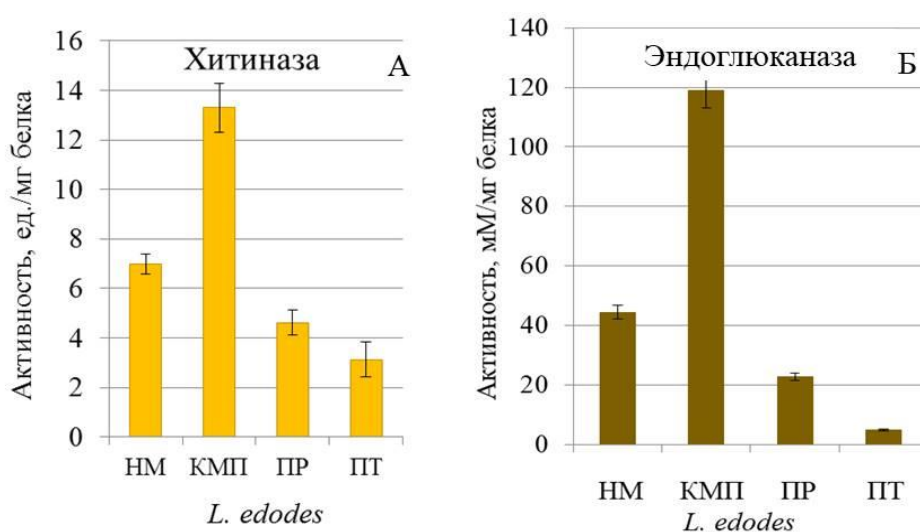
Рисунок 55 – Уровень экспрессии генов хитиназы (*chi*) (А) и эндоглюканазы (*exg*) (Б) у базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза (Vetchinkina et al., 2015 <https://doi.org/10.1134/S0026261715010166>)

При формировании мицелиальной пленки и базидиом происходит сильное утолщение и растяжение клеточных стенок, в отличие от тонкостенных гиф непигментированного мицелия. Уровень экспрессии гена *chi* на стадии мицелиальной пленки был наиболее высоким, повышался в 3 раз (Рисунок 55А), а гена глюканазы *exg* в 10 раз, по сравнению с вегетативным непигментированным мицелием (Рисунок 55Б). Также высокая активность гена, кодирующего хитиназу, была отмечена в плодовом теле базидиомицета, особенно в ножке (Рисунок 55А).

В плотных мицелиальных образованиях (пленках, базидиомах) хитина и глюкана намного больше, чем в непигментированном вегетативно растущем погруженным в субстрат мицелии. И, исходя из экспериментальных данных, мы наблюдаем значительное повышение уровня транскрипционной активности генов *exg* и *chi* и как следствие синтез внутриклеточных ферментов хитиназ и глюканаз, необходимых для морфогенеза клеточной стенки. Кроме того, это говорит в пользу совместной работы данных ферментов в непрерывной перестройке полисахаридов клеточных стенок.

5.8.3 Динамика активности ферментов хитиназ и эндоглюканаз на разных стадиях онтогенеза базидомицета *L. edodes*

Нами было установлено, что активные ферменты хитиназы и эндоглюканы присутствуют в грибных клетках на всех стадиях морфогенеза базидомицета *L. edodes* (Рисунок 56А, Б). Высокая активность данных ферментов была отмечена в непигментированном мицелии. Заметная активация хитиназ и эндоглюканаз происходит на стадии коричневой мицелиальной пленки, в примордиях активность ферментов уменьшается, а наименьшая активность отмечена в плодовых телах *L. edodes* (Рисунок 56А, Б).



НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 56 – Динамика активности ферментов хитиназ и эндоглюканаз на разных стадиях морфогенеза базидомицета *L. edodes*

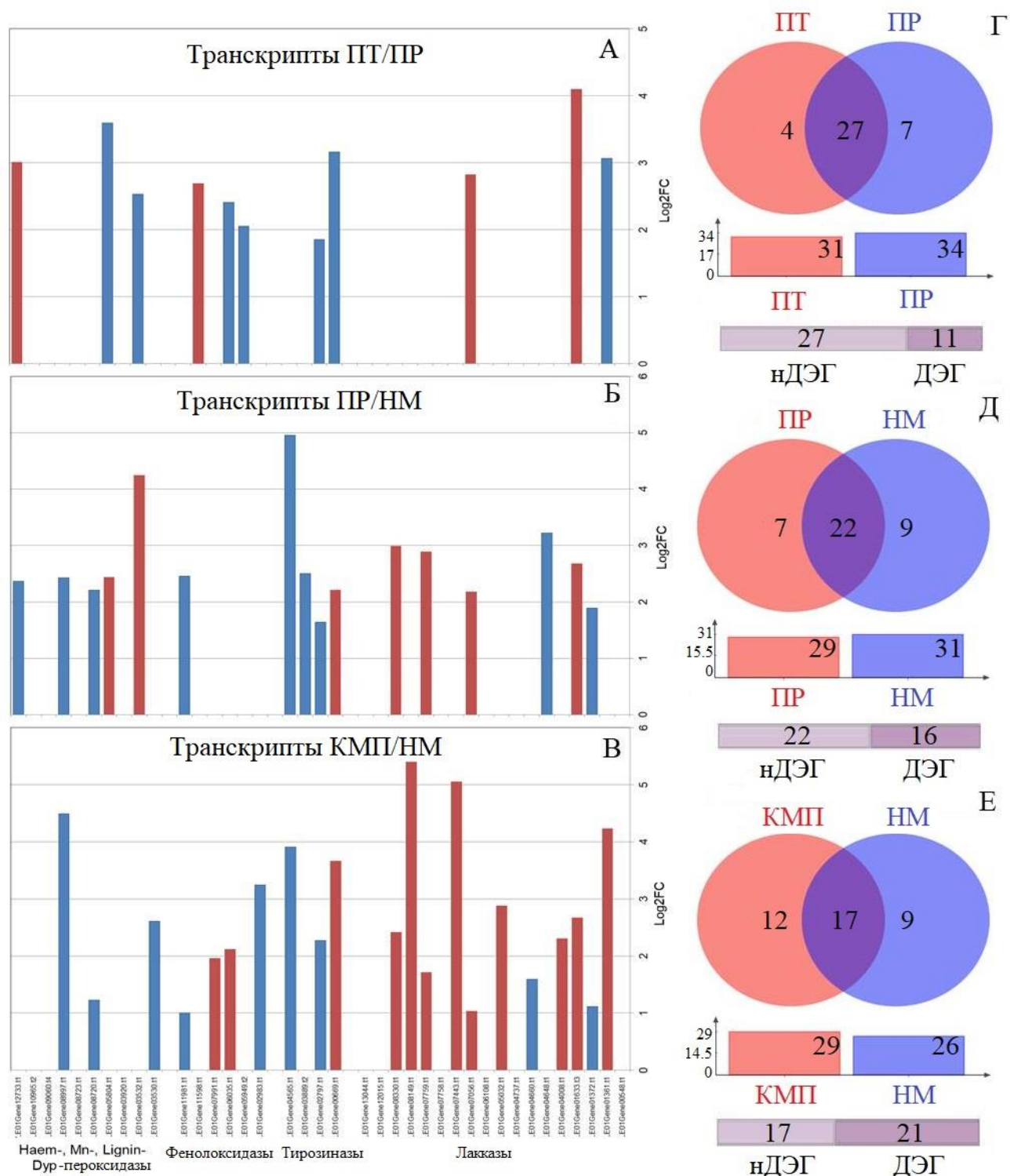
Это согласуется с данными транскриптомного профилирования, заметная активация в категории хитиназы и глюканазы происходила на стадии коричневой мицелиальной пленки, а в плодовых телах большая группа генов, ответственных за работу ферментов хитиназ и глюканаз, находилась в репрессии или не экспрессировалась дифференциально, однако активация отдельных генов многократно возрастала. Высокий уровень транскрипционной активности генов и ферментативной активности хитиназ подтверждает ключевую роль данных ферментов в поддержании баланса между синтезом и лизисом компонентов клеточной стенки в процессе морфогенеза базидиомицета *L. edodes*.

5.8.4 ДЭГ, кодирующие ферменты лигнинолитического комплекса

У ксилотрофных грибов важнейшими ферментами необходимыми для разрушения древесины и обеспечения питательными веществами являются фенолоксиляющие ферменты. Однако, роль ферментов лигнинолитического комплекса в метаболизме грибов неоднозначна. Например, лакказы участвуют в синтезе внеклеточных пигментов, необходимых как связующие элементы при сшивке компонентов клеточных стенок мицелиальных гиф при формировании морфоструктур (Leatham and Stahmann, 1981; Thurston, 1994) или могут выступать в качестве сигнальных молекул, активность которых зависит от этапа и особенностей развития грибной культуры (Wood, 1980; Das *et al.*, 1997). У некоторых штаммов *L. edodes* не способных к формированию коричневой мицелиальной пленки отмечалась низкая фенолоксидазная активность (Vetchinkina *et al.*, 2015). Тирозиназы участвуют в защитной функции в связи с синтезом меланиновых пигментов, оказывающих влияние на устойчивость хитин-глюкан-меланинового комплекса, обладающего устойчивостью к негативным окружающим условиям и ферментам патогенов (Van Gelder *et al.*, 1997).

Было установлено, что в примордиях относительно мицелия происходила активация (в 4.5–8 раз) группы генов, кодирующих лакказу. В плодовых телах, обнаружено два гена с активностью выше в 7–17 раз относительно примордиев, один ген из данной категории находился в репрессии, большинство генов дифференциально не экспрессировались. Мицелиальная пленка была насыщена высоко активными транскриптами генов лакказы, 9 генов активировались, 2 гена находились в репрессии и 6 генов – дифференциально не экспрессировались, относительно непигментированного мицелия. При формировании морфогенных структур отмечается усиление гифальной агрегации, в данных процессах необходимы фенолоксидазы, участвующие в окислительной полимеризации компонентов клеточной оболочки, усиливающих скрепление между клетками. Кроме того, повышается синтез пигментов, выполняющих защитную функцию. Транскрипты генов, кодирующих ферменты тирозиназы на генеративных стадиях развития в основном, находились в репрессии, однако, исключение составляли два гена, активность которых повышалась в 4.5–13 раз. Были

обнаружены по два активных гена на каждой стадии развития и по четыре гена, находящихся в репрессии, входящих в общую функциональную категорию фенолоксидазы. Часть генов дифференциально не экспрессировалась (Рисунок 57).

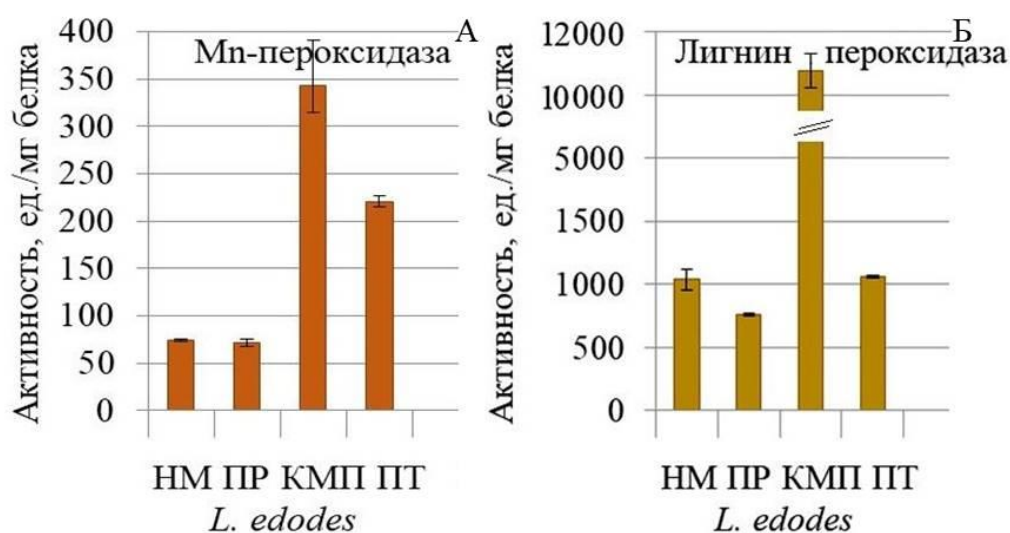


ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – ПТ/ПР, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – КМП/НМ. НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 57 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих ферменты лигнинолитического комплекса

5.8.5 Динамика активности ферментов Мп-пероксидаз и лигнин пероксидаз

Было установлено, что ферменты лигнинолитического комплекса (Мп-пероксидаз и лигнин пероксидаз), ответственные за деградацию лигноцеллюлозных субстратов были активны не только в клетках непигментированного мицелия. Также они проявляли высокую активность на стадии коричневой мицелиальной пленки, где была отмечена максимальная активность данных ферментов, и в клетках плодовых тел базидиомицета *L. edodes* (Рисунок 58А, Б). Активность Мп-пероксидаз была сопоставима в непигментированном мицелии и на стадии примордиев, увеличивалась в пять раз на стадии коричневой мицелиальной пленки и была в три раза выше в сформировавшихся плодовых телах (Рисунок 58А). Также и ферменты лигнин пероксидазы, более чем в десять раз превосходили по активности на стадии мицелиальной пленки по сравнению с непигментированным мицелием и были примерно одинаковы по динамике активности на трех стадиях развития (в примордии, плодовом теле и непигментированном мицелии) (Рисунок 58Б).



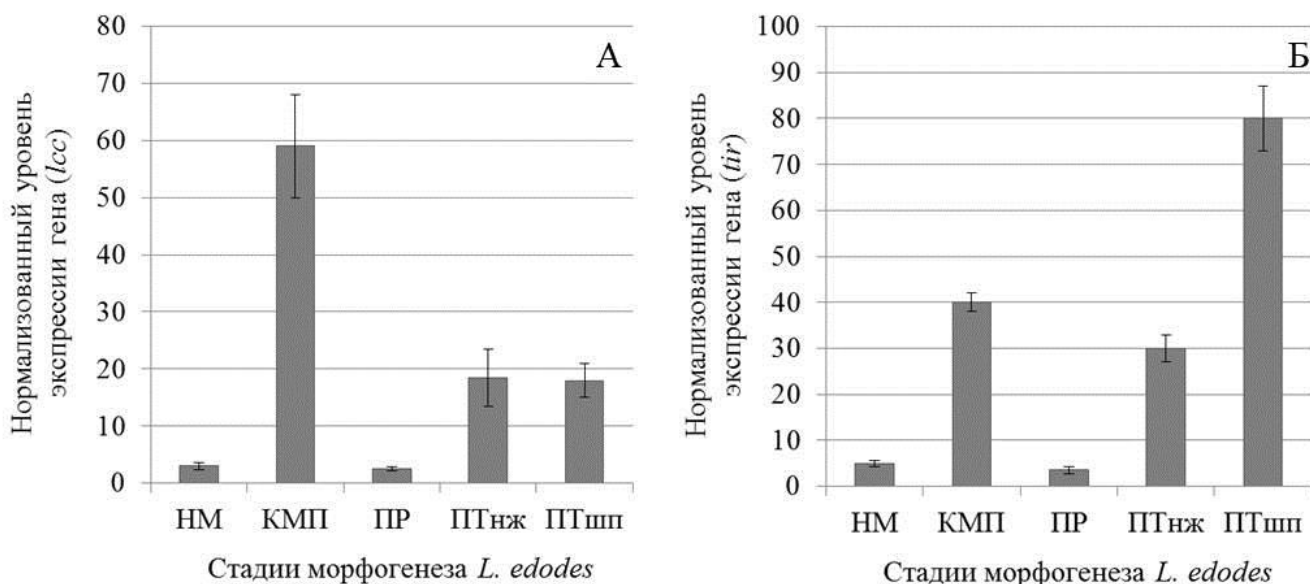
НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 58 – Динамика активности ферментов пероксидаз (Мп-пероксидаз и лигнин пероксидаз) на разных стадиях морфогенеза базидомицета *L. edodes*

5.8.6 Динамика экспрессии генов лакказы (*lcc*) и тирозиназы (*tyr*)

С помощью анализа ПЦР в реальном времени было установлено, что при формировании морфогенных структур относительно вегетативного непигментированного мицелия (этапа активной работы ферментов при освоении субстрата), уровень транскрипционной активности генов кодирующих ферменты лигнинолитического комплекса не только не снижался, но больше активировался. На стадии коричневой мицелиальной пленки уровень экспрессии гена *lcc*, кодирующего лакказу был максимальным, повышался в 20 раз, также более чем в 6 раз, по

сравнению с вегетативным непигментированным мицелием, уровень экспрессии данного гена повышался в базидиомах макромикета (Рисунок 59А). Экспрессия гена *tyr*, кодирующего фермент тирозиназу, увеличивалась в 8 раз по сравнению с непигментированным мицелием. Максимальная активность данного гена была отмечена в плодовом теле, а именно в шляпке базидиомицета, где в клетках в большом количестве, также как и в коричневой мицелиальной пленке, присутствует пигмент меланин (Рисунок 59Б).



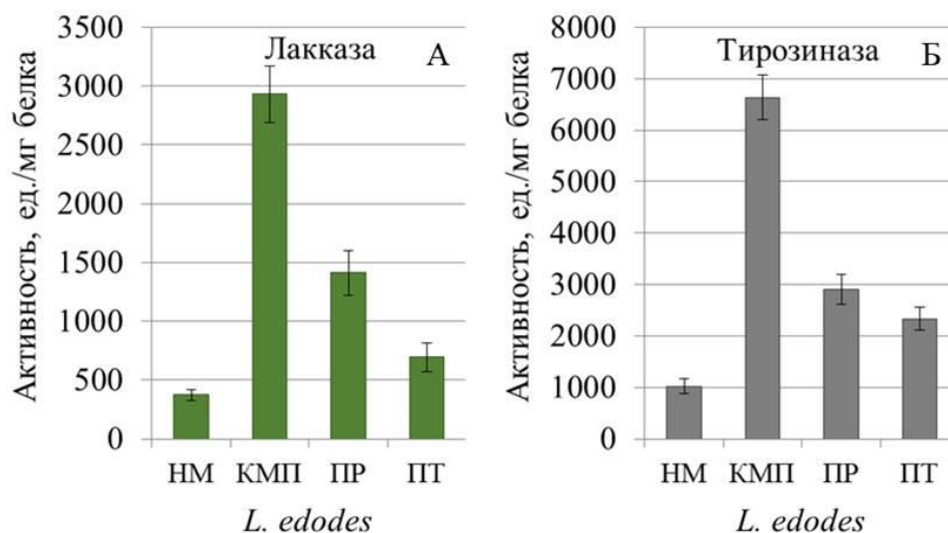
Данные нормализованы по транскрипционной активности гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gpd*);

НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело (нж – ножка, шп – шляпка).

Рисунок 59 – Уровень экспрессии генов лакказы (*lcc*) (А) и тирозиназы (*tyr*) (Б) у базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза (Vetchinkina et al., 2015 <https://doi.org/10.1134/S0026261715010166>)

5.8.7 Динамика активности ферментов фенолоксидаз на разных стадиях онтогенеза базидомицета *L. edodes*

Было установлено, что активность фенолоксидаз (лакказ и тирозиназ) была на высоком уровне на всех стадиях морфогенеза, отмечена максимальная активность на стадии мицелиальной пленки базидиомицета *L. edodes*. Активность лакказы увеличивалась примерно в десять раз в данном мицелиальном образовании, в базидиомах активность фермента была также выше по сравнению с непигментированным мицелием, в примордиях – примерно в четыре раза, в плодовом теле – около двух раз. Также фермент тирозиназа активировался и на генеративных стадиях развития, где в клетках присутствует большое количество пигмента меланина, на стадии коричневой мицелиальной пленки, в примордиях и плодовых телах в семь, три и два раза, соответственно (Рисунок 60А, Б).



НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

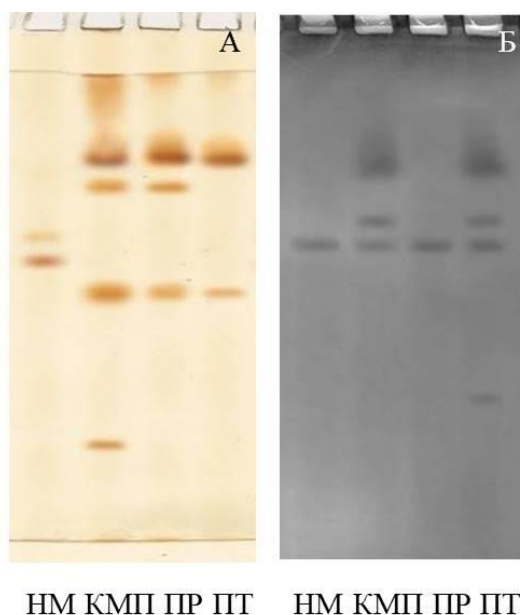
Рисунок 60 – Динамика активности ферментов фенолоксидаз (лакказ и тирозиназ) на разных стадиях морфогенеза базидиомцета *L. edodes* (Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2017024280>)

5.8.8 Состав комплекса фенолоксидаз на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*

Состав фенолоксидазного комплекса в коричневой мицелиальной пленке также заметно отличался, дополнительно визуализировались несколько белковых полос, соответствующих лакказам и тирозиназам, которые не были обнаружены на предыдущей стадии морфогенеза в непигментированном мицелии, также состав фенолоксидаз отличался в примордии и плодовом теле (Рисунок 61А, Б).

На стадиях мицелиальной пленки и плодовых тел гифы базидиомицетов приобретают сильную пигментацию, что подтверждается активацией категорий, связанных с фенолоксилирующими ферментами. Так лакказы и тирозиназы, катализируют синтез меланинов, которые играют важную роль в устойчивости к окружающим условиям. Повышенная концентрация пигментов у грибов отмечается в плотных структурах, которые в неблагоприятных условиях окружающей среды могут выполнять защитную функцию в начале формирования плодового тела. Присутствие меланина обеспечивает резистентность к ультрафиолету и оказывает сильное влияние на устойчивость хитин-глюкан-меланинового комплекса. Также, образование базидиом сопряжено с катализируемым лакказой синтезом внеклеточных пигментов, участвующих в качестве связующих элементов при сшивке компонентов клеточных стенок гиф. Это может говорить о том, что фенолоксидазы принимают участие в ультраструктурной перестройке компонентов клеточных стенок грибов, гифальной агрегации при формировании морфогенных структур, устойчивости к стрессам и смене стадий морфогенеза, что дает основание предполагать регуляторную деятельность этих соединений

или их продуктов в процессе развития макромикетов. Вероятно, данные ферменты, необходимые ксилотрофам для разрушения древесины и обеспечения себя питательными веществами, могут также принимать участие в морфообразовании грибов (Vetchinkina, 2025).



HM – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 61 – Нативный электрофорез и специфическая окраска лакказ (А) и тирозиназ (Б) базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2017024280>)

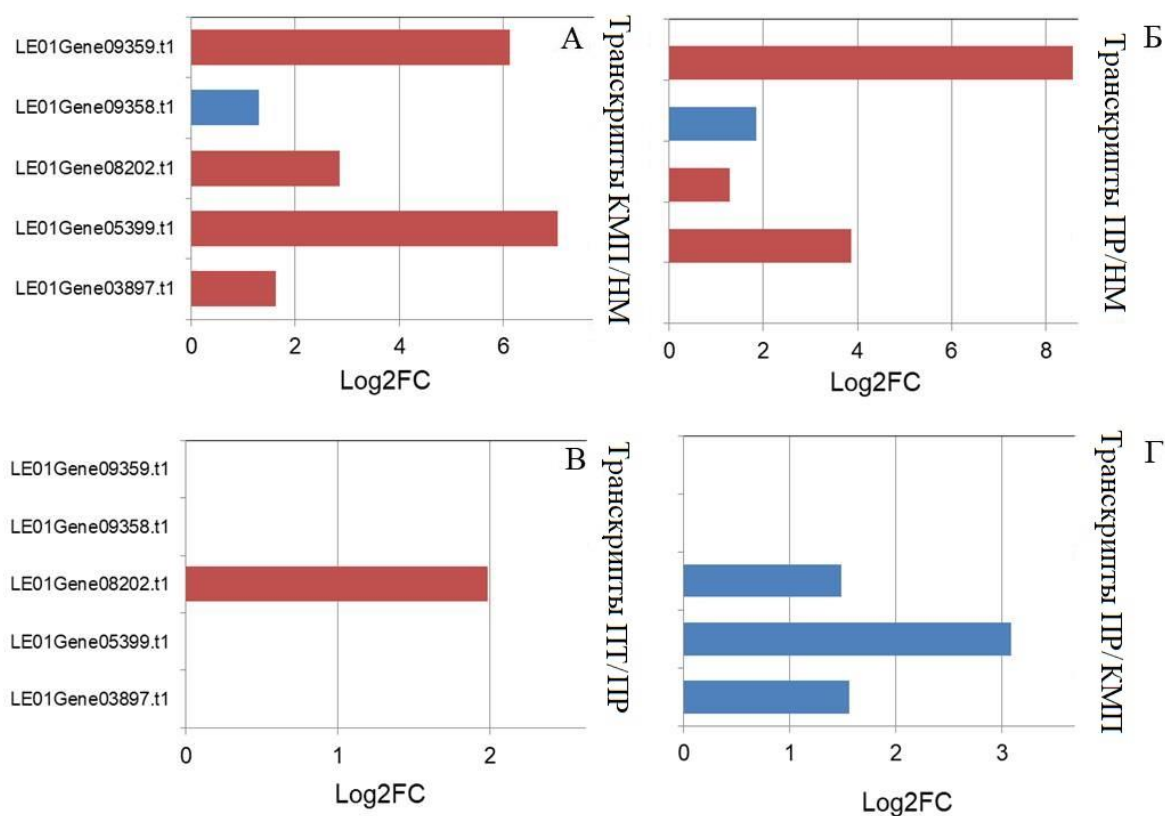
5.8.9 Динамика активности гена специфического фактора транскрипции (*exp*) в процессе цитодифференцировки и плодообразовании *L. edodes*

Гены, детерминирующие процессы роста и дифференцировки, часто называют генами-регуляторами (переключателями) развития. Они кодируют особые белки или белковые комплексы – транскрипционные факторы, контролирующие программы формирования органов и тканей. Специфические факторы транскрипции являются частью системы координирующей передачу генетической информации в клетке, причем они могут способствовать как активации транскрипции, так и ее репрессии, то есть обеспечивать включение или выключение определенных генов в нужный момент развития организма. Именно транскрипционные факторы отвечают за селективность и специфичность генной регуляции в различных клетках и тканях. В процессе клеточной дифференцировки появление нового транскрипционного фактора служит сигналом для активации (или подавления) транскрипции генов на определенной стадии морфогенеза и появления необходимых генных продуктов (Lobe, 1992; Latchman, 1997).

Так, например, у растений факторы транскрипции участвуют в регуляции морфогенеза, развитии, формировании и прорастании семян, росте проростков, формировании различных органов (побегов, цветков и т.п.). Факторы транскрипции задействованы в регуляции

клеточного цикла, они определяют, до какого размера должна вырасти клетка, когда именно она должна вступить в процесс разделения и когда завершить такой процесс, а также они необходимы в регуляции развития многоклеточных организмов – онтогенезе. В ответ на полученный сигнал такие факторы транскрипции включают или выключают транскрипцию генов, что приводит к изменению морфологии клетки, определяет ее дифференциацию, играет определенную роль в росте клетки и апоптозе (Hake and Ori, 2002; Ulker and Somssich, 2004).

При сравнительном анализе транскриптомов базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза были обнаружены четыре гена, кодирующих специфический фактор транскрипции с активностью выше от 4 до 130 раз в коричневой мицелиальной пленке относительно непигментированного мицелия. И три гена в примордиях с максимальной активностью более чем в 350 раз превышающую таковую в мицелии. В плодовых телах, обнаружен только один активированный ген с активностью выше в 4 раза относительно примордиев, остальные гены в базидиомах дифференциально не экспрессировались (Рисунок 62).

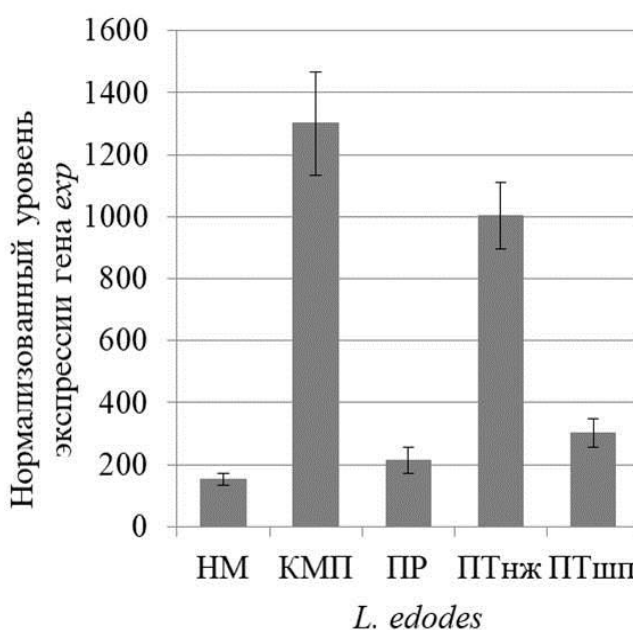


ДЭГ: А – КМП/НМ, Б – ПР/НМ, В – ПТ/ПР, Г – ПР/КМП. НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 62 – Сравнительный анализ транскриптомов базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих специфический фактор транскрипции

В результате анализа ПЦР в реальном времени установлено, что при культивировании ксилотрофного базидиомицета *L. edodes* на древесном субстрате, при переходе от вегетативной

стадии развития к генеративной, активируется экспрессия гена *exr*, кодирующего специфический фактор транскрипции. Особенно это характерно для стадии предшествующей плодоношению и связано с появлением коричневой мицелиальной пленки. Показано, что при образовании данной морфоструктуры транскрипционная активность гена *exr* повышается в 7 раз, в то время как в примордиях и плодовых телах отмечен спад активности данного гена (Рисунок 63). Активация гена *exr* может служить маркером готовности макромицета к плодоношению. Можно предположить, что особенности экспрессии генов, участвующих в процессе цитодифференцировки грибного мицелия, могут являться маркерами той или иной стадии морфогенеза (Ветчинкина и др., 2015).



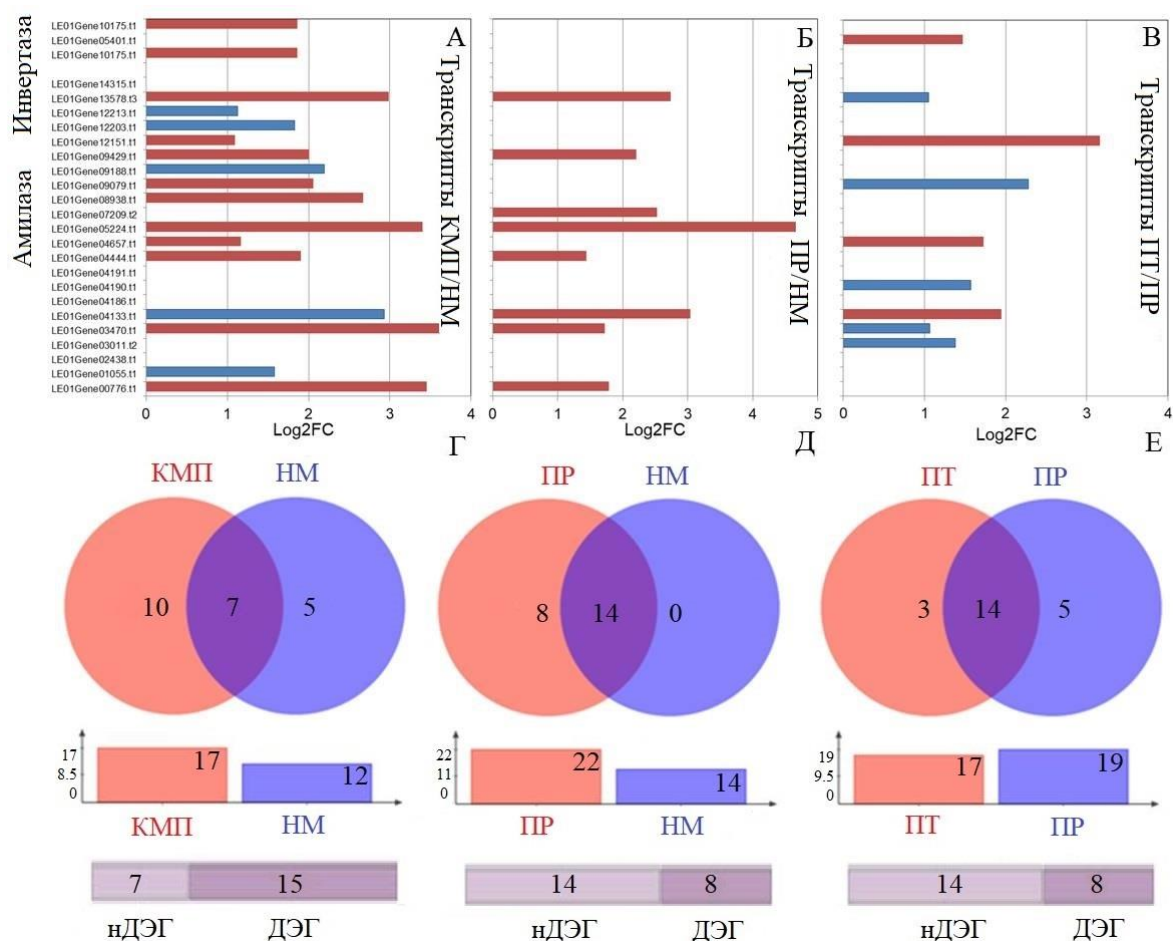
Данные нормализованы по транскрипционной активности гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*gpd*);

НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело (нж – ножка, шп – шляпка).

Рисунок 63 – Уровень экспрессии гена специфического фактора транскрипции (*exr*) у *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза (Ветчинкина и др., 2015 <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2015-15-4-67-74>)

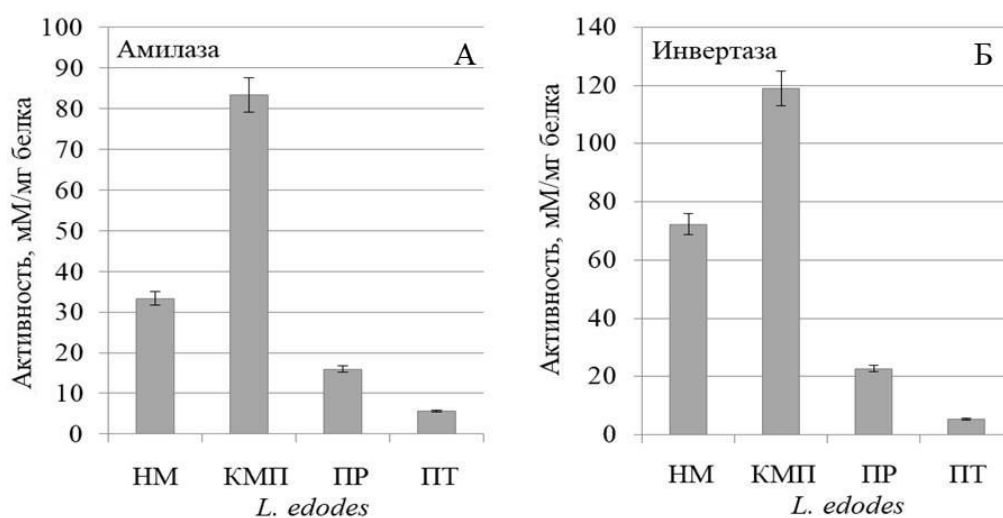
5.8.10 ДЭГ, кодирующие ферменты амилазы и инвертазы

Ферменты амилаза и инвертаза, относящиеся к классу гликозил-гидролаз, расщепляют полисахариды до легкоусвояемых мономеров и необходимы грибам для обеспечения клеток питательными веществами. Нами было обнаружено, что наибольшую активность эти ферменты проявляли на стадии вегетативного мицелия, во время активного роста, пролиферации клеток, освоения субстрата, наращивания биомассы. Высокая активность амилазы и инвертазы характерна, также, для мицелиальной пленки *L. edodes* (Рисунок 64 и 65).



ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР.
 НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
 ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 64 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих амилазы и инвертазы

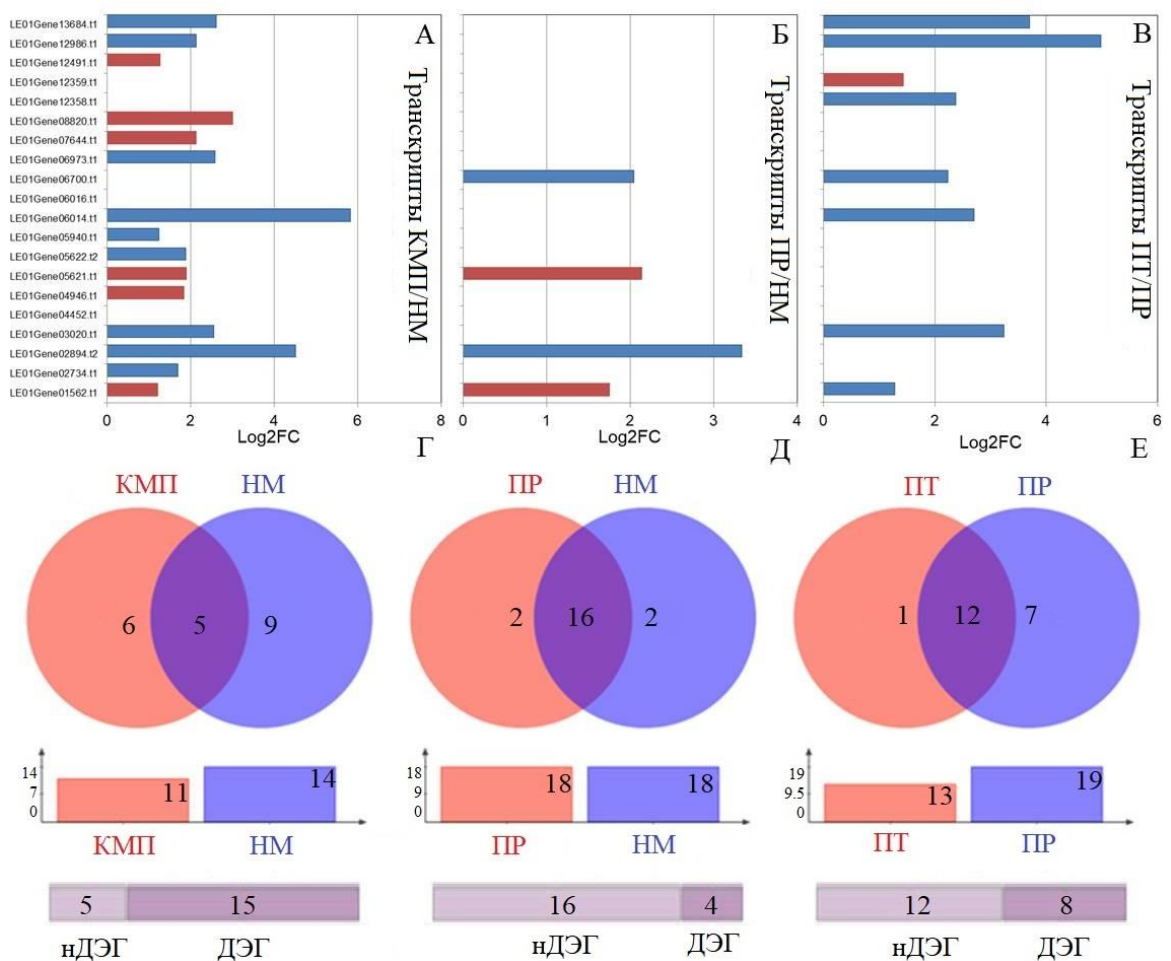


НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
 ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 65 – Динамика активности ферментов амилаз и инвертаз на разных стадиях морфогенеза базидиомицета *L. edodes*

5.8.11 ДЭГ, кодирующие ферменты пектатлиазы и протеазы

Ферменты пектатлиазы участвуют во взаимопревращениях пентозы и глюкуроната и необходимы грибам для разрушения структурных элементов растительных тканей – пектиновых полисахаридов, с образованием олигосахаридов, обеспечивая клетку высокоэнергетическими молекулами. В коричневой мицелиальной пленке было обнаружено шесть активных генов, кодирующих ферменты пектатлиазы, часть транскриптов дифференциально не экспрессировалась по сравнению с непигментированным мицелием. На генеративных стадиях развития также были представлены активные пектатлиазы, однако, подавляющее большинство генов дифференциально не экспрессировалось в примордиях по сравнению с непигментированным мицелием, а в плодовом теле по сравнению с примордием (Рисунок 66). Пектатлиазы базидиомицета *L. edodes* в коричневой мицелиальной пленке проявляли большую активность по сравнению с пектатлиазами непигментированного мицелия, на генеративных стадиях развития, в примордиях и плодовых телах, активность ферментов была сопоставима с таковой непигментированного мицелия (Рисунок 68А).



ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР.

НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,

ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 66 – Сравнительный анализ транскриптомов базидиомицета *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих пектатлиазы

Транскрипты протеолитических ферментов протеиназ, расщепляющих пептидную связь между аминокислотами в белках, в клетках коричневой мицелиальной пленки и плодового тела были представлены большим количеством активированных генов по сравнению с мицелием, 47/34 и 20/11, соответственно, в примордиях соотношение было равным 26/26 (Рисунок 67). Это согласуется с активностью ферментов протеиназ, которые проявляли высокую активность, как в вегетативном мицелии, так и на генеративных стадиях развития, в примордиях и особенно в плодовых телах. Максимум активности внутриклеточных протеиназ приходился на стадию образования мицелиальной пленки у базидиомицета *L. edodes* (Рисунок 68Б).

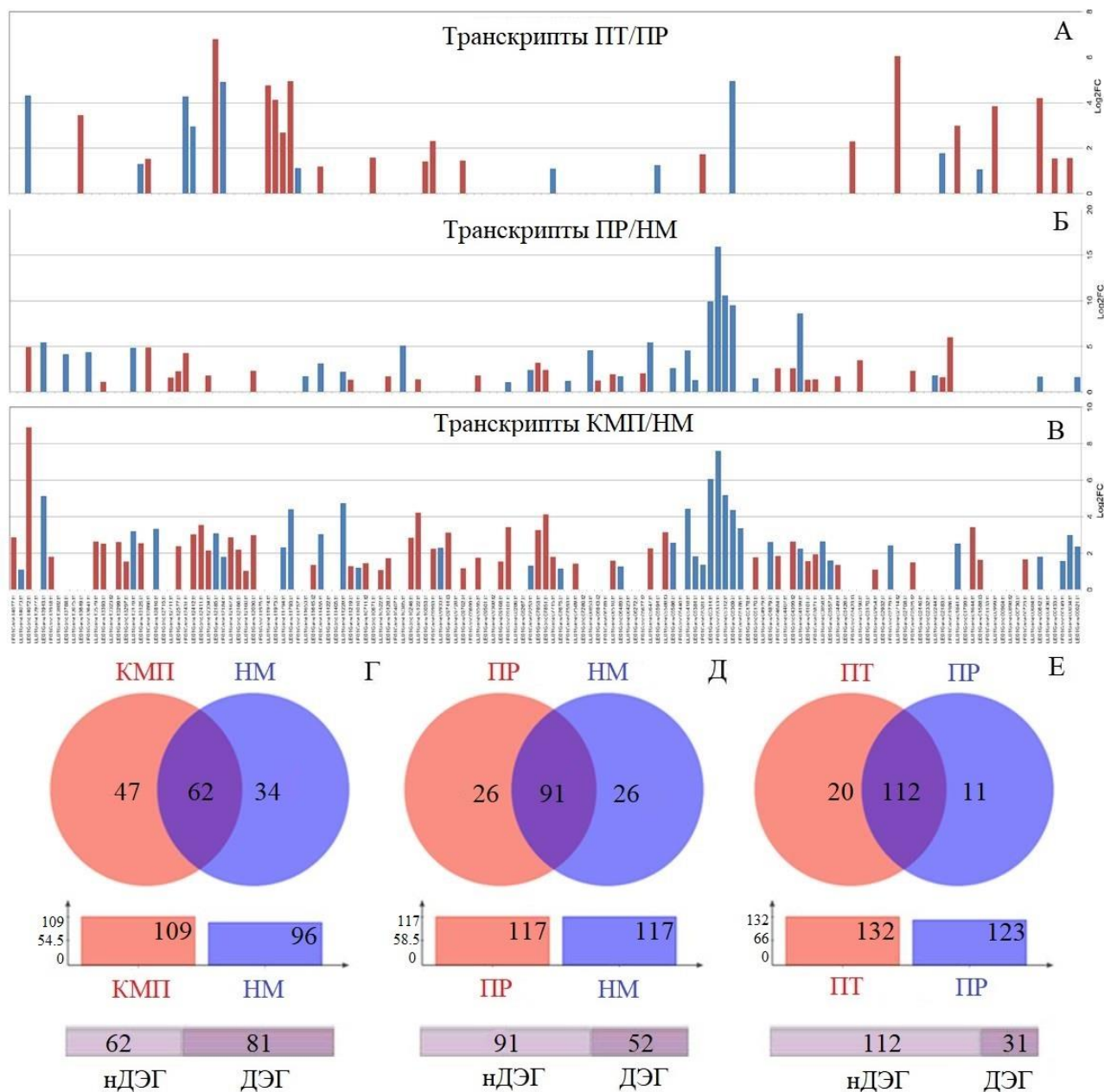
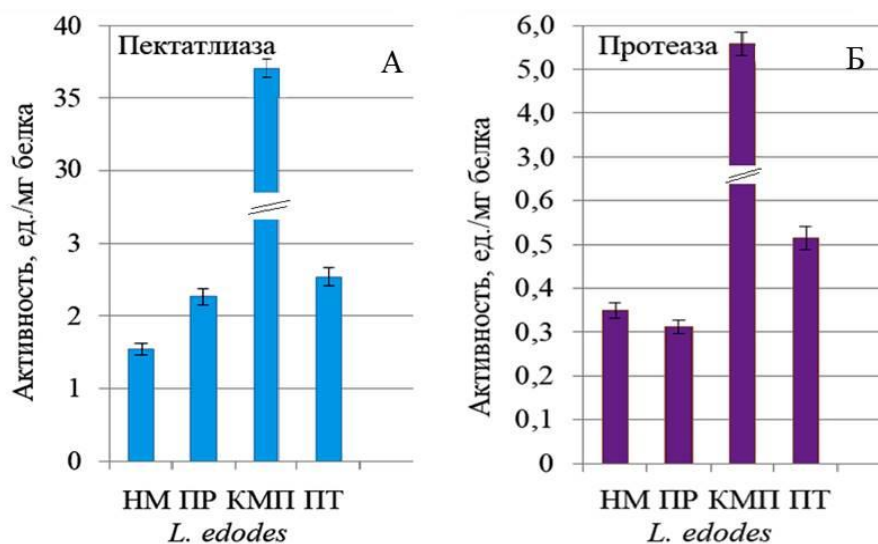
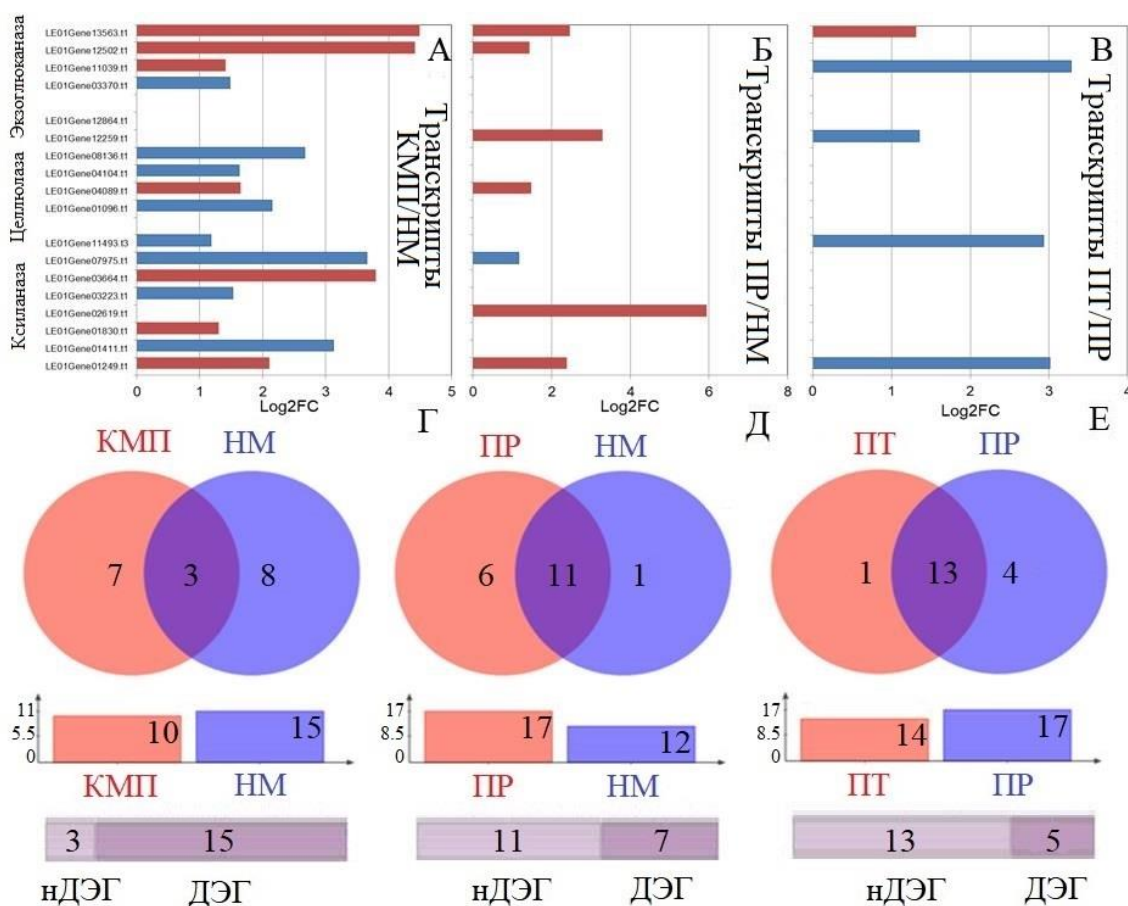


Рисунок 67 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих ферменты протеазы



НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 68 – Динамика активности ферментов пектатлиаз и протеаз на разных стадиях морфогенеза *L. edodes*



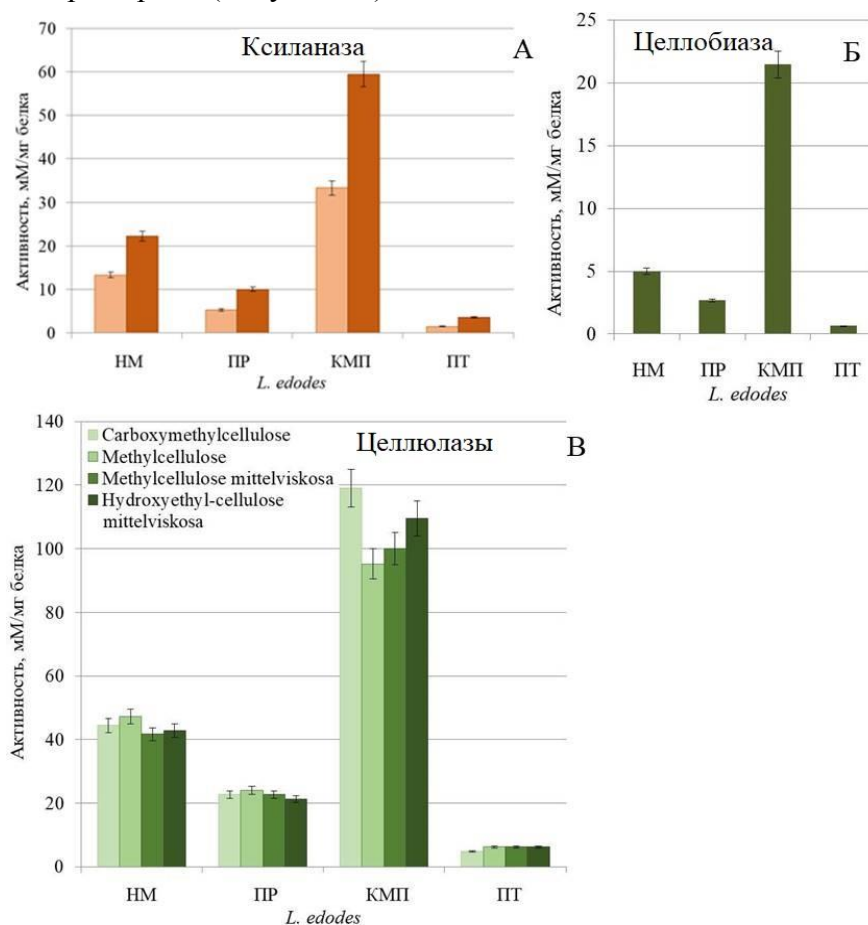
ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР. НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 69 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих ферменты ксиланазы/целлюлазы/экзоглюканазы

Также, эндопротеиназы синтезируются в виде проферментов, активируемых затем при помощи избирательного протеолиза, и расщепляют пептидные связи внутри пептидной цепи. Клетки, секретирующие эти ферменты, таким образом, защищают собственные белки от разрушения.

5.8.12 ДЭГ, кодирующие ферменты ксиланазы/целлюлазы/экзоглюканы

Для ксилотрофных базидиомицетов жизненно необходимо наличие активных ферментов целлюлолитического комплекса, такие как целлюлазы, ксиланазы и целлобиазы, расщепляющие сложные молекулы растительных тканей для обеспечения себя питательными веществами. Данные ферменты действуют совместно в отношении высокоупорядоченных форм целлюлозы и ее производных. Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях морфогенеза показал, что в коричневой мицелиальной пленке базидиомицета были обнаружены высокоактивные транскрипты ферментов целлюлолитического комплекса, часть генов нДЭГ. Примордии были представлены в основном активированными транскриптами, большая часть генов нДЭГ относительно непигментированного мицелия. В клетках плодового тела гены целлюлаз были в основном репрессированы, подавляющее большинство генов нДЭГ относительно таковых примордия (Рисунок 69).



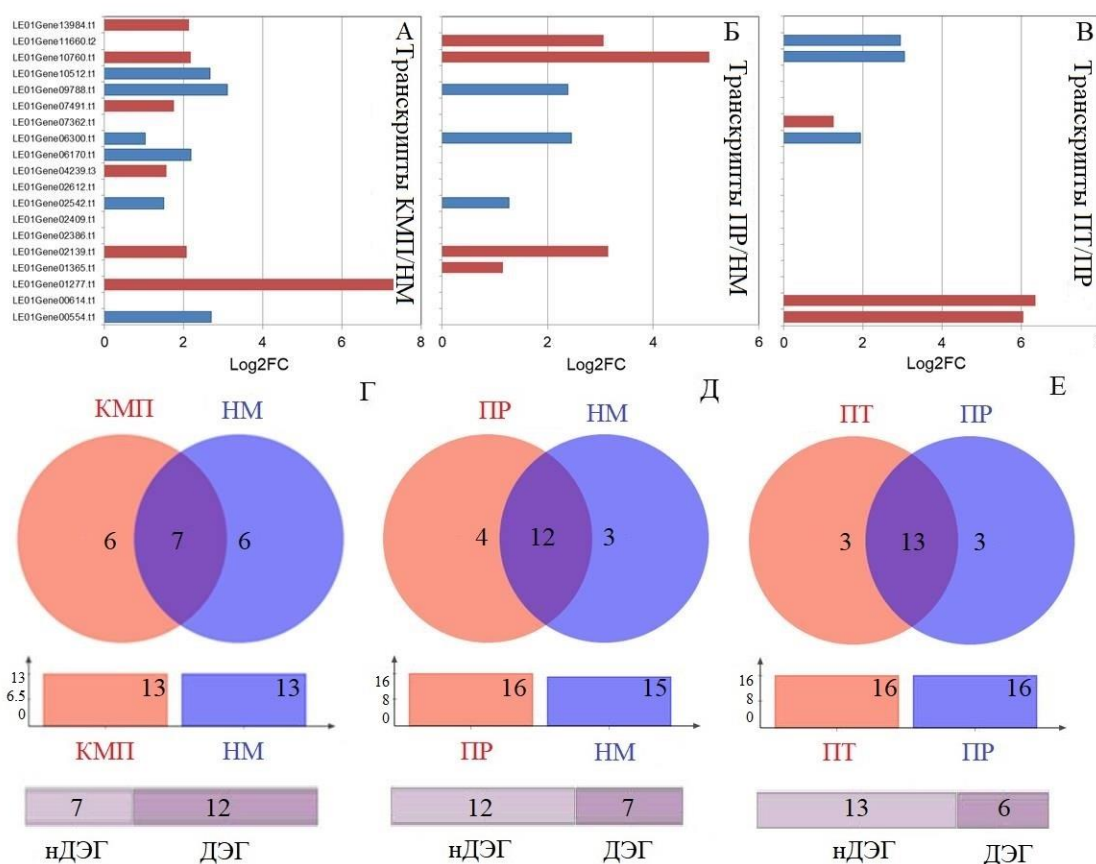
НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 70 – Динамика активности ферментов ксиланаз/целлюлаз/целлобиаз на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*

Данные транскриптомного анализа согласуются с активностью ферментов целлюлозолитического комплекса на разных стадиях морфогенеза *L. edodes*. Высокая активность ксиланаз, целлюлаз и целлюлобиаз была обнаружена в клетках как непигментированного мицелия, активно перерабатывающего и потребляющего субстрат для роста грибной колонии, так и на стадии коричневой мицелиальной пленки, еще раз подтверждая вывод об активном метаболизме данной морфоструктур, в которой происходит множество жизненно важных процессов, для которых необходимо потребление большого количества энергии (Рисунок 70).

5.8.13 ДЭГ, кодирующие ферменты галактозидазы и глюкозидазы

Подобная динамика была отмечена и в отношении глюкозидаз и галактозидаз, гидролизующих соответствующие связи в сложных молекулах, расщепляя различные субстраты олигосахаридов, полисахаридов и гликоконъюгатов (гликолипидов, гликопротеидов) до простых мономеров, являясь, таким образом, ключевым источником углерода и поставщиками энергии. В мицелиальной пленке и базидиомах была обнаружена высокая транскрипционная активность генов, кодирующих ферменты глюкозидазы (Рисунок 71).



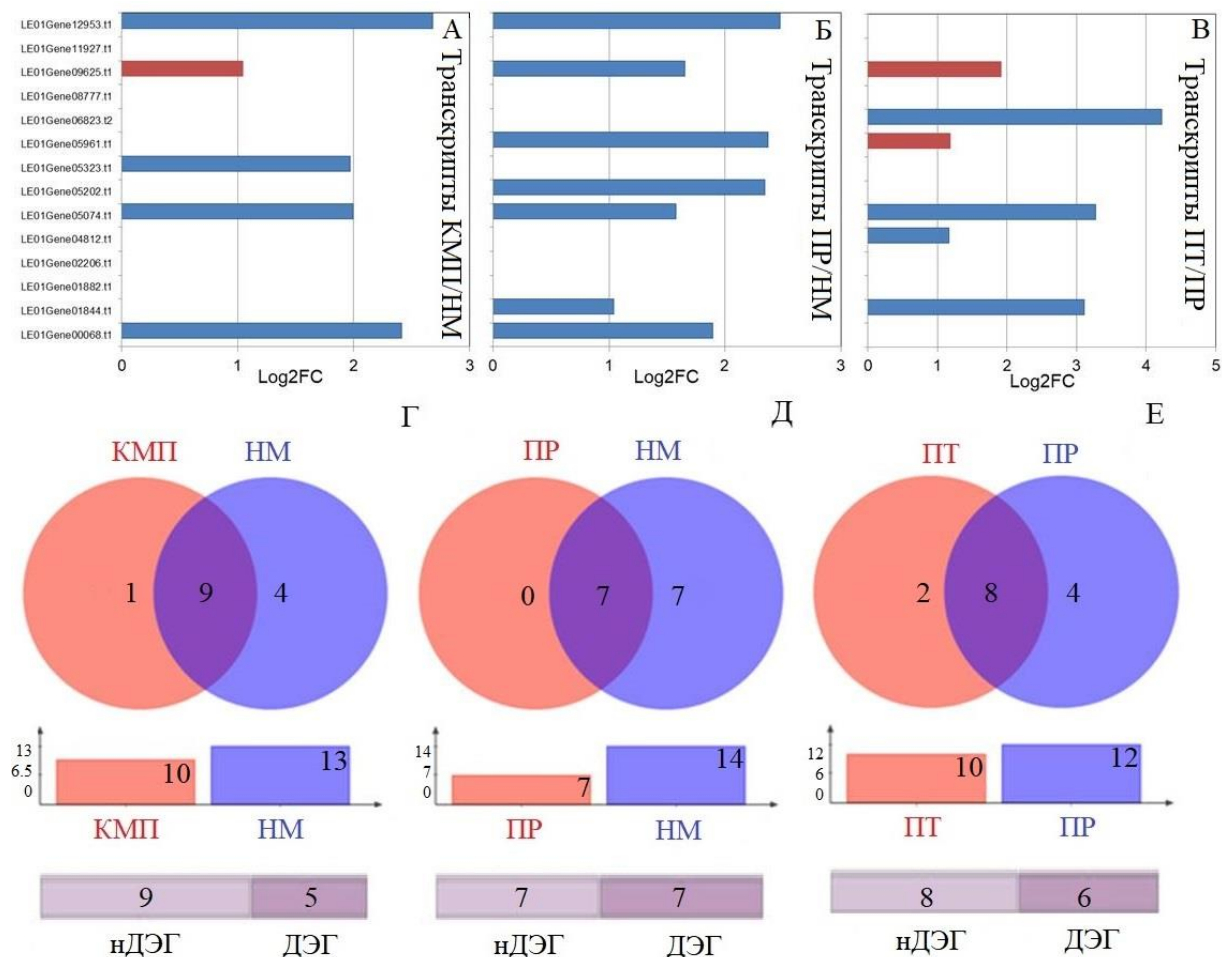
ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР.

НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,

ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 71 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих глюкозидазы

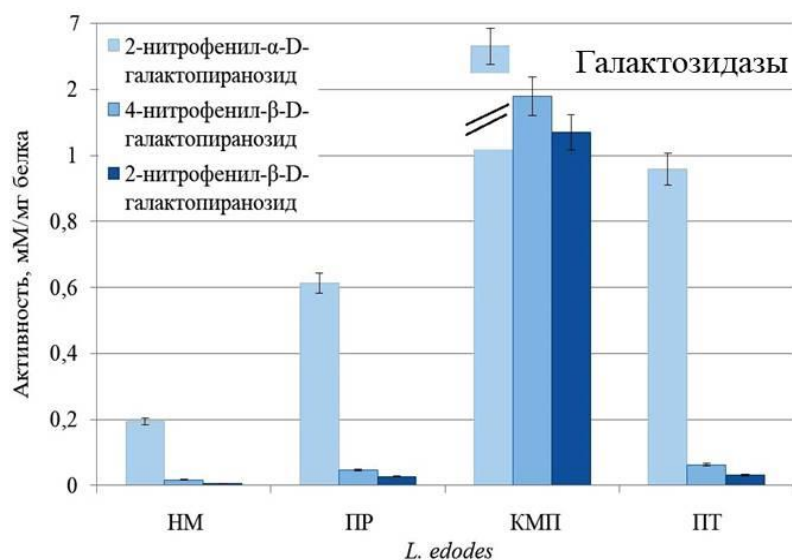
Транскрипционная активность ферментов галактозидаз на разных стадиях морфогенеза была представлена в основном репрессированными генами, но большинство генов дифференциально не экспрессировалась по сравнению с непигментированным мицелием, что указывает на их непрерывную работу в процессе жизненного цикла гриба (Рисунок 72).



ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР. НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

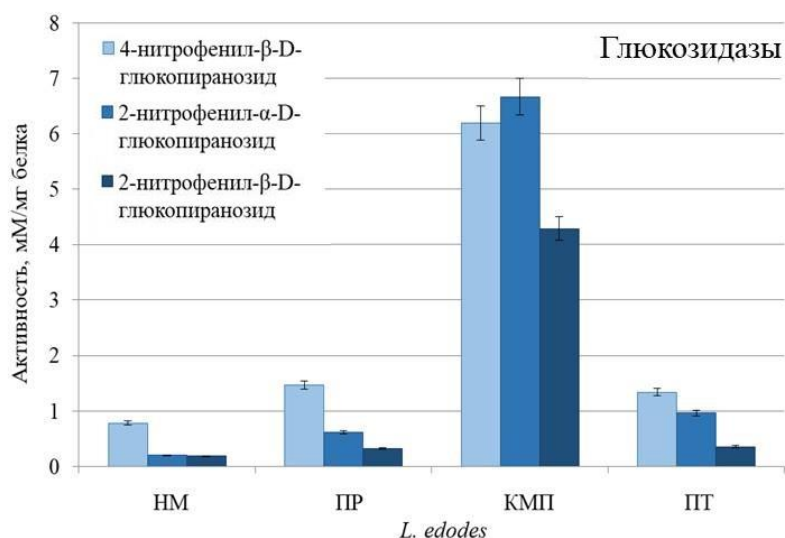
Рисунок 72 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих галактозидазы

В пользу этого предположения говорит высокая активность данных ферментов α -, β -галактозидаз и α -, β -глюкозидаз, которая оценивалась по скорости превращения ряда субстратов. Наиболее активными ферменты были в отношении 2-нитрофенил- α -D-галактопиранозиды, 4-нитрофенил- β -D-глюкопиранозиды и 2-нитрофенил- α -D-глюкопиранозиды. Максимальная активность была отмечена в мицелиальной пленке базидиомицета, также более высокая активность, относительно непигментированного мицелия, была представлена в клетках примордия и плодового тела *L. edodes* (Рисунки 73 и 74).



НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 73 – Динамика активности ферментов галактозидаз на разных стадиях онтогенеза базидомицета *L. edodes*

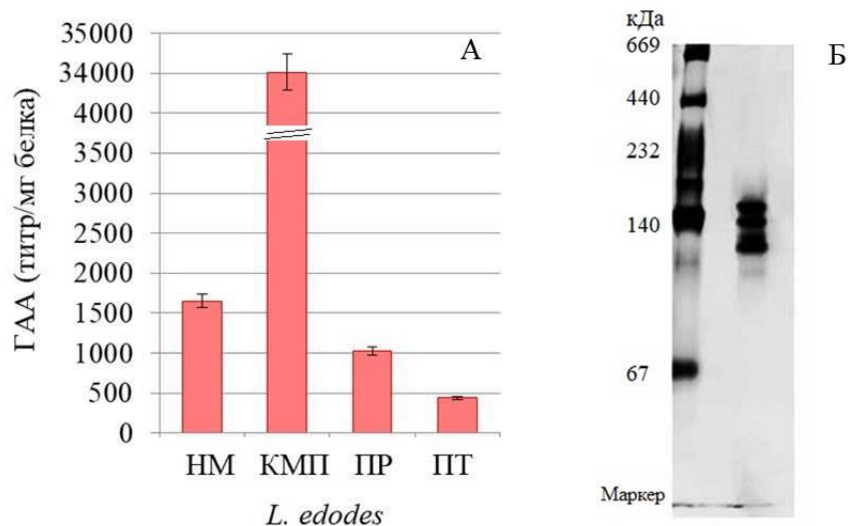


НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 74 – Динамика активности ферментов глюкозидаз на разных стадиях онтогенеза базидомицета *L. edodes*

5.8.14 ДЭГ, кодирующие углеводсвязывающие гликопротеины (лектины)

На разных стадиях морфогенеза базидомицета были обнаружены высокоактивные лектины, с максимальной удельной гемагглютинирующей активностью на стадии коричневой мицелиальной пленки (Рисунок 75А). Каждая стадия морфогенеза, особенно коричневая мицелиальная пленка, была насыщена транскриптами активированных генов, кодирующих углеводсвязывающие гликопротеины (Рисунок 76).



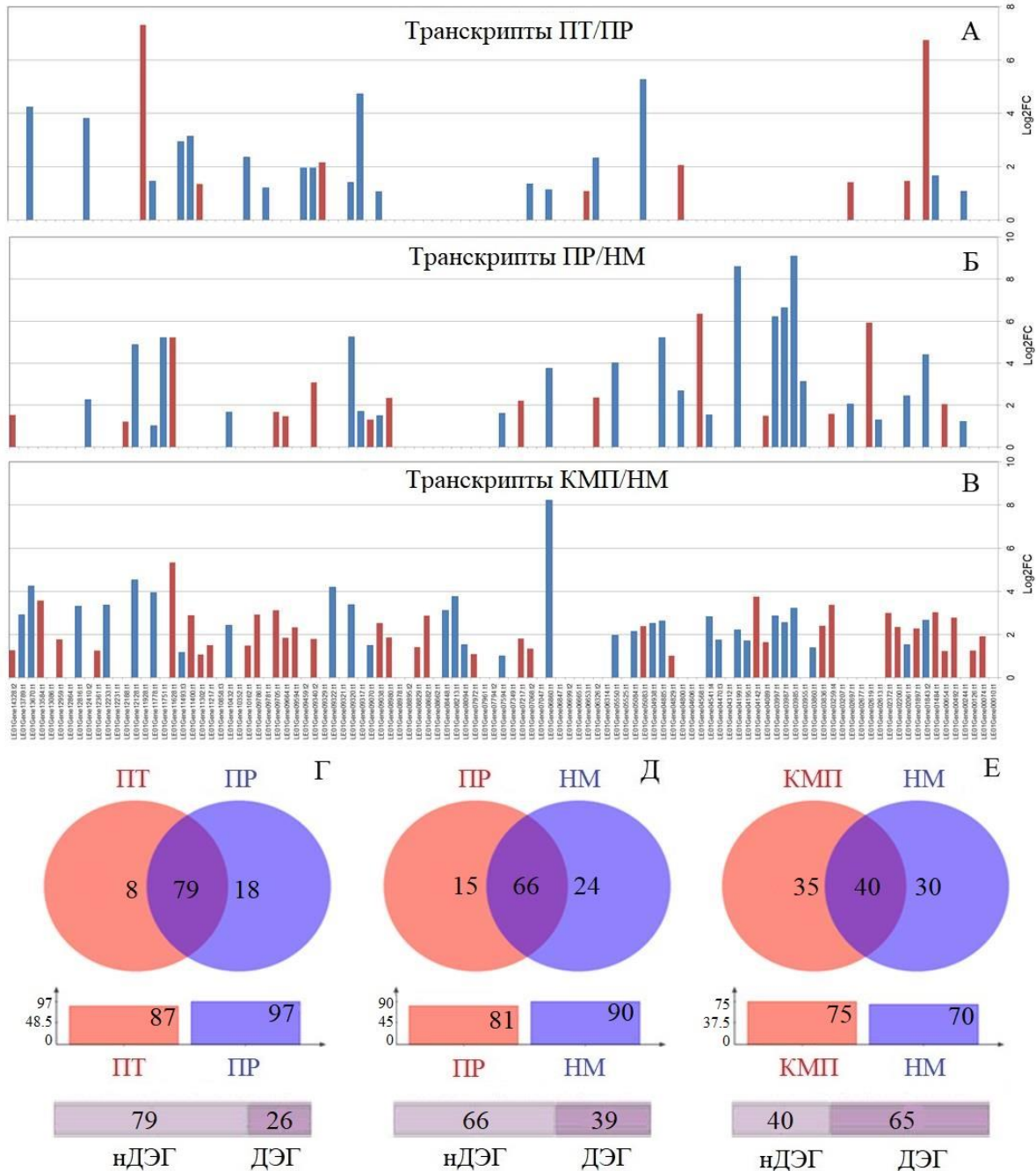
НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии, ПТ – плодовое тело.

Рисунок 75 – Динамика активности лектинов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* (А) и нативный электрофорез специфичных лектинов для коричневой мицелиальной пленки (Б) (Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2017024280>)

На стадии мицелиальной пленки нами были обнаружены высокоактивные лектины молекулярной массой около 130, 140 и 150 кДа характерные для этого этапа развития базидиомицета. Определение углеводной специфичности данных лектинов показало, что наиболее высокое сродство они проявили в отношении L-D-меллибиозы, D-лактозы и D-галактозы. Важно отметить высокую активность лектинов на этой стадии морфогенеза, агглютинация которых составлял 34000 единиц (Рисунок 75Б). Высокая лектиновая активность в мицелиальной пленке объясняется возможным участием лектинов в качестве агрегирующего агента в плотном сплетении гиф. Возможно также, что переход от одной стадии развития базидиомицета к другой регулируется присутствием и активностью в клеточных структурах маркерных молекул, обладающих выраженной углеводной специфичностью (Vetchinkina, 2025).

Таким образом, проведенный сравнительный анализ транскриптомов разных стадий морфогенеза – непигментированного мицелия, мицелиальной пленки (структуры, характерной для макромицета, образование которой необходимо для перехода к плодоношению (Vetchinkina *et al.*, 2015; Vetchinkina, 2025)), примордия и плодового тела *L. edodes*, выявил на транскрипционном уровне глобальные различия в целом ряде физиологических процессов. Долгое время коричневую мицелиальную пленку рассматривали как структуру, выполняющую исключительно протекторную функцию, защищающую нижележащие слои мицелия и формирующиеся базидиомы от неблагоприятных факторов. Однако полученные результаты экспериментов указывают на гораздо более многоплановую роль данной структуры в развитии макромицетов (Ветчинкина и др., 2015; Vetchinkina *et al.*, 2015; 2017a; 2017b; 2022; Gubaev *et al.*, 2018; Vetchinkina, 2025). Штаммы *L. edodes* с нарушенным циклом развития и не способные к

образованию этой структуры либо формируют дефектные плодовые тела, либо не образуют их вовсе. Кроме того, метаболиты, входящие в состав коричневой мицелиальной пленки при их нанесении на мицелий способны индуцировать плодоношение (Vetchinkina *et al.*, 2015). Электронно-микроскопические исследования показали существенные изменения и особенности морфологии и ультраструктуры клеток на разных стадиях морфогенеза *L. edodes*. Значительные изменения наблюдались на стадии мицелиальной пленки (Vetchinkina *et al.*, 2015; 2017a; 2017b).



ДЭГ (А, Б, В) и диаграммы Венна (Г, Д, Е); А, Г – КМП/НМ, Б, Д – ПР/НМ, В, Е – ПТ/ПР.
 НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка,
 ПР – примордии, ПТ – плодовые тела.

Рисунок 76 – Сравнительный анализ транскриптомов *L. edodes* на разных стадиях онтогенеза для идентификации ДЭГ, кодирующих лектины (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Формирование пленки сопряжено с глобальными транскриптомными перестройками. При этом происходит модуляция групп генов, связанных с различными метаболическими и сигнальными процессами. Исходя из результатов транскриптомного профилирования и верификации полученных данных, в мицелиальной пленке индуцируются процессы биогенеза клеточных стенок (биосинтез глюкозаминов, хитина), что подтверждено также данными электронной микроскопии (Vetchinkina *et al.*, 2017a; 2017b; Gubaev *et al.*, 2018). Кроме того, здесь индуцировались гены, связанные с меланизацией, а также транспортом ионов металлов, которые, в частности, являются кофакторами ферментов биосинтеза пигментов. Особое внимание обращает на себя активация сигнальных и коммуникативных процессов, связанных с G-белками, убиквитинилированием, митоген-активируемыми протеинкиназами, а также везикулярным транспортом, фокальной адгезией и щелевыми контактами. Активация генов последних трех категорий хорошо согласуется с индукцией генов категории «цитоскелет», работа которого необходима для формирования межклеточных контактов (Vetchinkina *et al.*, 2017b; Gubaev *et al.*, 2018). Эти данные свидетельствуют в пользу не только протекторной, но и сенсорно-регуляторной функции мицелиальной пленки. В свою очередь, процессы, связанные с биогенезом рибосом и метаболизмом ДНК и РНК, дыханием и клеточным делением в пленке подавлены по сравнению с мицелием, что свидетельствует о снижении общей метаболической активности этой структуры. Отмечена репрессия биосинтеза хинонов, образование которых сопряжено с деградацией лигноцеллюлозного субстрата. Вероятно, это определяется локализацией данной морфоструктуры, образование которой происходит не на поверхности ростового субстрата, а на внешней поверхности непигментированного мицелия. Использование предложенного алгоритма анализа транскриптомов *de novo* позволило описать мицелиальную пленку не просто как «мертвое» статичное образование, выполняющее исключительно защитную функцию, а как метаболически активную полифункциональную структуру. На это указывают также данные по анализу динамики активности ряда ферментов и функциональных гликопротеинов (Vetchinkina *et al.*, 2015; 2017a; 2017b; 2022; Vetchinkina, 2025). В мицелиальной пленке, по сравнению с мицелием, отмечено многократное повышение активности лектинов и ряда ферментных систем, входящих в состав целлюло- и лигнинолитического комплексов базидиомицетов, а также принадлежащих к функциональной категории биогенеза клеточной стенки высших грибов. Это указывает на активный метаболизм и происходящие энергозатратные процессы в клетках данной морфоструктуры, служащей своего рода интерфейсом между внешней средой и нижележащими слоями мицелия. Вероятно, эта стадия критична для формирования специфического сигнального фона, необходимого для репрограммирования экспрессии генома при переходе в фазу плодоношения. Исследование представляет интерес, как для фундаментальной науки, так и для решения прикладных задач при разработке и оптимизации практического получения мицелия и плодовых тел съедобных и лекарственных грибов с большим биотехнологическим потенциалом.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ, ПОЛИСАХАРИДНЫХ ФРАКЦИЙ И ОТДЕЛЬНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ГЛУБИННОГО МИЦЕЛИЯ И ПЛОДОВЫХ ТЕЛ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Поиск и изучение биологически активных веществ, обладающих противоопухолевым действием является приоритетным направлением, особенно это касается внедрения высокоэффективных нетоксичных природных лекарственных препаратов с минимальными побочными эффектами. Перспективными в этом плане являются культивируемые базидиальные макромицеты, содержащие вещества с широким спектром биологического действия (Mizuno, 1995; Ikekawa, 2001; Bao *et al.*, 2002; Wasser *et al.*, 2005; Krasnopolskaya *et al.*, 2005). Представители данной группы грибов *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* ценятся как высококачественные съедобные грибы и источник биологически активных и лекарственных веществ, нашедших широкое применение пищевой и фармацевтической промышленности (Chihara, 1992; Wasser and Weis, 1999; Babitskaya, 2001; Лобанок и др., 2003; Kanska, 2006; Papinutti, 2010). Полученные из данных культур полисахаридные препараты, показали себя как эффективные лекарственные средства, обладающие противовоспалительными, противоаллергенными, иммуностимулирующими, гепатопротекторными, антибиотическими, антиоксидантными, противовирусными свойствами (Mizuno, 1999; Bender *et al.*, 2001; Matsuura *et al.*, 2002; Wasser, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Kodama *et al.*, 2003; Феофилова, 2007; Ulbricht *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012) и противоопухолевой активностью (Gao and Zhou, 2003; Lin, 2004; Zhang and Lin, 2004; Xie *et al.*, 2006; Chen and Seviour, 2007; Shimizu *et al.*, 2009; Yukawa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014), при отсутствии токсического действия на организм человека. Установлено, что лекарственные препараты из подобного природного сырья, способны замедлять или останавливать рост опухолей, предотвращать образование метастазов, уменьшать побочные эффекты химио- и радиотерапии (Gao *et al.*, 2003; Kodama *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004; Wang and Weng, 2006; Deng *et al.*, 2009). Поскольку распад опухоли сопровождается обширным некрозом и следующим за ним воспалением, то действие противоопухолевой композиции может быть расширено за счет включения противовоспалительных, иммуностимулирующих, антимикробных и других эффектов. В качестве ценного сырья для получения высокоэффективных противоопухолевых веществ используют в основном полисахаридные фракции плодовых тел макромицетов (Papinutti, 2010; Mizuno, 1999; Bender *et al.*, 2001; Kodama *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2008; Kodama *et al.*, 2010). Практически неизученными остаются гликопротеиновые соединения вегетативного мицелия и метаболиты низкомолекулярной природы, хотя состав мицелия по всем важнейшим показателям, в том числе и по содержанию биологически активных веществ, не уступает, а

зачастую и качественно превосходит состав плодовых тел грибов (Wasser and Weis, 1999; Wasser, 2002). Кроме того, погруженное культивирование, по сравнению с другими методами выращивания базидиомицетов, представляет собой наиболее целесообразный способ получения метаболитов, поскольку проводится в строго контролируемых стерильных условиях, обеспечивающих стабильность и воспроизводимость химического состава получаемой продукции, а также имеет несомненные преимущества в плане экономических затрат, сроков культивирования и трудоемкости биотехнологического процесса. Также, нужно отметить, что воздействие одного и того же действующего вещества на разные опухолевые клеточные линии млекопитающих может быть различным. В связи с этим, целесообразно сравнительное изучение противораковой активности белковых и полисахаридных грибных фракций из вегетативного мицелия и плодовых тел лекарственных базидиомицетов на различные опухолевые клетки.

6.1 Характеристика метаболитов гликопротеиновой природы базидиомицета *L. edodes* в условиях глубинного и поверхностного культивирования

Одной из приоритетных задач современной биотехнологии является поиск новых источников физиологически активных соединений с целью получения эффективных и безопасных продуктов. Лекарственные грибы представляют огромный потенциал в качестве источников биологически активных метаболитов углеводной, липидной, белковой природы, терпеноидов, стероидов, алкалоидов, фенольных соединений, витаминов, минеральных элементов (Wasser, 2014). Уникальные свойства, полифункциональность гликополимеров позволяют использовать их для создания диагностических и лечебно-профилактических препаратов, данные соединения мицелия практически не изучены, в отличие от плодовых тел макромицетов. Поэтому изучение метаболитов гликопротеиновой природы вегетативного мицелия базидиомицета *L. edodes*, который обладает антиоксидантными и противовирусными свойствами, при глубинном и твердофазном культивировании является приоритетной задачей.

6.1.1 Растворимость эндо- и экзогликополимеров *L. edodes*

При поверхностном культивировании и на жидких питательных средах (глубинном и стационарном) *L. edodes* продуцирует эндогликополимеры и выделяет в среду внеклеточные гликополимеры. Исследование растворимости показало, что эндо- и экзогликополимеры базидиомицета независимо от способа культивирования полностью растворяются в воде при нагревании до 80-90°C, а также в слабых растворах неорганических и органических кислот, растворах щелочей и диметилсульфоксиде, но не растворяются в органических растворителях: спиртах, ацетоне, хлороформе.

6.1.2 Определение вязкости и угла вращения гликополимеров *L. edodes*

Важной характеристикой гликополимеров является вязкость, растворы гликополимеров *L. edodes* имели больший показатель кинематической вязкости (от 0.99 до 1.85 мм²/с), чем таковой воды (0.89 мм²/с). Отличие по данному показателю между эндогликополимерами глубинного и стационарного мицелия незначительно (1.02 и 0.99 мм²/с). Аналогичная закономерность наблюдается и в случае экзогликополимеров (1.78 и 1.85 мм²/с). Как при глубинном, так и стационарном культивировании кинематическая вязкость экзогликополимеров больше таковой эндогликополимеров. Показатель кинематической вязкости гликополимеров, синтезируемых *L. edodes* при твердофазном культивировании, имеет промежуточное значение (1.39 мм²/с) между показателем экзо- и эндогликополимеров. Удельное вращение плоскости поляризации 0.1% растворов экзогликополимеров составило $[\alpha]_D^{20} +84^\circ$, эндогликополимеров $[\alpha]_D^{20} -18^\circ$.

6.1.3 Углеводный и аминокислотный состав экзо- и эндогликопротеинов *L. edodes*

Определение углеводного состава экзо- и эндогликопротеинов, образуемых при разных условиях культивирования *L. edodes*, выявило незначительное отличие по качественному мономерному составу и показало, что они являются гетерогликанами с преобладающим мономером глюкозой: 55–96%. Маннозы больше всего отмечено в эндогликополимерах, образуемых при стационарном и глубинном культивировании гриба, галактозы – в эндогликополимерах, образуемых при глубинном и поверхностном культивировании. Минимальное количество глюкозы установлено в экзогликополимерах при стационарном выращивании (54.7 и 58.5%) (Таблица 28). Нами было установлено присутствие белка в растворах гликополимеров в количестве 2–9 % от веса гликана. Как при глубинном, так и стационарном культивировании содержание белка было больше в экзогликополимерах.

Таблица 28 – Углеводный состав гликополимеров *L. edodes*, образующихся при различных условиях культивирования

Тип культивирования и фракция гликополимеров	Мономеры, %							
	Ксилоза		Манноза		Галактоза		Глюкоза	
	Штамм 19	Штамм 25	Штамм 19	Штамм 25	Штамм 19	Штамм 25	Штамм 19	Штамм 25
Стационарное культивирование								
эндогликополимеры	—	—	5.9	7.2	4.5	5.8	89.6	87.0
экзогликополимеры	8.3	4.5	29.7	30.5	7.3	6.5	54.7	58.5
Глубинное культивирование								
эндогликополимеры	—	—	15.0	8.2	10.6	10.5	74.4	81.3
экзогликополимеры	—	—	4.5	7.0	—	—	95.5	91.0
Поверхностное культивирование								
эндогликополимеры	—	—	6.7	7.5	14.3	12.5	79.0	80.0

(Галицкая, Ветчинкина и др., 2010 [Doi:10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35](https://doi.org/10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35))

Наибольшее количество белка отмечено в растворах гликополимеров, образуемых при стационарном культивировании. Поскольку существенных межштаммовых различий не наблюдалось, результаты исследований показаны на примере штаммов *L. edodes* 19 и 25. В составе гликополимеров гриба, выращенного глубинным способом, установлено наличие белка – до 9%. В экзогликопротеинах содержалось 8.7 и 9.2% белка, в эндогликопротеинах – 5.5 и 6.4% (соответственно штаммы 19 и 25). Самое низкое содержание белка (2.0 и 3.5%) отмечено в гликопротеинах, выделенных из поверхностно выращенного мицелия.

Анализ аминокислотного состава гидролизатов гликопротеинов глубинной культуры *L. edodes* показал наличие в них 17 аминокислот. Сумма их в гликопротеинах составила 55.62 и 64.89 мг/г (эндогликопротеины), 86.9 и 92.3 мг/г (экзогликопротеины) (Таблица 29). В гидролизатах гликопротеинов гриба *L. edodes*, выращенного поверхностным способом содержалось также 17 аминокислот (Таблица 30).

Таблица 29 – Аминокислотный состав гликопротеинов глубинной культуры *L. edodes*

Аминокислота мг/г	Эндогликопротеины		Экзогликопротеины	
	Штамм 19	Штамм 25	Штамм 19	Штамм 25
Лиз	2.95	3.45	2.81	2.45
Гис	0.62	1.52	1.37	1.67
Арг	3.71	3.42	1.73	2.32
Асп	6.20	8.17	8.57	10.20
Тре	3.82	4.18	7.90	8.52
Сер	4.15	5.42	8.23	7.63
Глу	9.24	9.70	10.83	12.30
Про	2.56	2.13	3.48	4.55
Гли	2.58	3.65	6.34	6.01
Ала	3.61	4.50	5.39	6.11
Цис	2.61	2.34	3.00	5.40
Вал	2.78	4.32	4.43	5.38
Мет	1.78	1.65	1.51	1.92
Иле	1.66	2.30	3.48	3.67
Лей	3.93	4.28	7.01	7.28
Тир	1.32	1.10	6.55	2.79
Фен	2.10	2.75	4.27	4.10
Всего	55.62	64.89	86.9	92.3

(Галицкая, Ветчинкина и др., 2010 [Doi:10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35](https://doi.org/10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35))

6.1.4 Характеристика внутриклеточных лектинов разных морфоструктур *L. edodes*

Все мицелиальные экстракты исследованных нами штаммов *L. edodes* проявляли в той или иной степени лектиновую активность. Методом гель-фильтрации на Sephadex G-75 нами были выделены внутриклеточные лектины *L. edodes* штамма F-249, обладающего очень высокой лектиновой активностью. Для сравнения лектины выделяли из разных морфоструктур,

Таблица 30 – Аминокислотный состав гликопротеинов базидиомицета *L. edodes*, выращенного поверхностным способом

Аминокислота мг/г	Эндогликопротеины	
	Штамм 19	Штамм 25
Лиз	2.64	1.78
Гис	1.23	0.28
Арг	2.12	2.15
Асп	1.47	3.79
Тре	1.50	0.60
Сер	1.32	1.39
Глу	3.72	2.09
Про	2.00	1.22
Гли	2.26	1.53
Ала	3.10	1.34
Цис	1.61	0.76
Вал	2.90	1.10
Мет	1.15	0.18
Иле	2.55	0.66
Лей	1.93	1.13
Тир	2.25	0.31
Фен	1.30	0.44
Всего	35.11	20.75

(Галицкая, Ветчинкина и др., 2010 [Doi:10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35](https://doi.org/10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35))

образующихся в процессе развития базидиомицета. Установили, что данные лектины являются гликопротеинами, однако они различаются по содержанию углеводов. Углеводная часть в них составляла 3.3% (непигментированный мицелий), 18.1% (коричневая мицелиальная пленка) и 19.8 % (плодовое тело) (Таблица 31). Белковая часть выделенных лектинов *L. edodes* составляла – 96.7% (непигментированный мицелий), 81.9% (мицелиальная пленка) и 80.2% (плодовое тело). В составе белка выявлено 17 аминокислот: асп, тре, сер, глут, про, гли, ала, вал, мет, иле, лей, тир, фен, гис, лиз, арг, три и следовые количества цистина. В больших количествах присутствовали сер (7.5%), гли (10%), тре (13%), про и вал (7.3 и 7.5%).

Таблица 31 – Состав углеводной части лектинов базидиомицета *L. edodes*

Лектины	Сахара,% от суммы					Сахара,% от сухой массы лектинов
	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Инозит	Итого	
Непигментированный мицелий	–	17.36	25.0	57.64	100.0	3.29
Коричневая мицелиальная пленка	12.5	–	45.83	41.67	100.0	18.06
Плодовое тело	–	12.5	79.16	8.34	100.0	19.83

(Галицкая, Ветчинкина и др., 2010 [Doi:10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35](https://doi.org/10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35))

6.1.5 ИК-спектроскопия препаратов гликопротеинов. Определение структуры и конфигурации экзо- и эндогликопротеинов

Для определения строения гликопротеинов анализировали их ИК-спектры. Были исследованы гликопротеины, выделенные из глубинного мицелия и культуральной жидкости. На рисунке представлены ИК-спектры эндо- и экзогликопротеинов базидиомицета *L. edodes* (Рисунок 77). Наиболее сильные полосы находятся в области 3400 см^{-1} . Их следует рассматривать как проявление валентных колебаний —OH -групп. В обоих образцах OH -группы включены в межмолекулярные и внутримолекулярные водородные связи, о чем свидетельствует смещение максимума в область меньших волновых чисел относительно максимума поглощения свободного гидроксила (3615 см^{-1}). Полоса 2940 см^{-1} с плечом в коротковолновой области говорит о проявлении колебаний CH_2 -групп. Полосу 1550 см^{-1} , присутствующую в ИК-спектрах обоих образцов, можно однозначно отнести к колебаниям =NH -групп. Степень аминирования в эндогликопротеине (образец 2) выше, чем в экзогликопротеине (образец 1). Полоса поглощения при 1550 см^{-1} является подтверждением того, что оба гликопротеина содержат азот (белок) и относятся к пептидогликанам. Наличие полосы при 1415 см^{-1} (симметричные колебания групп —COOH) указывает на кислый характер обоих полисахаридов.

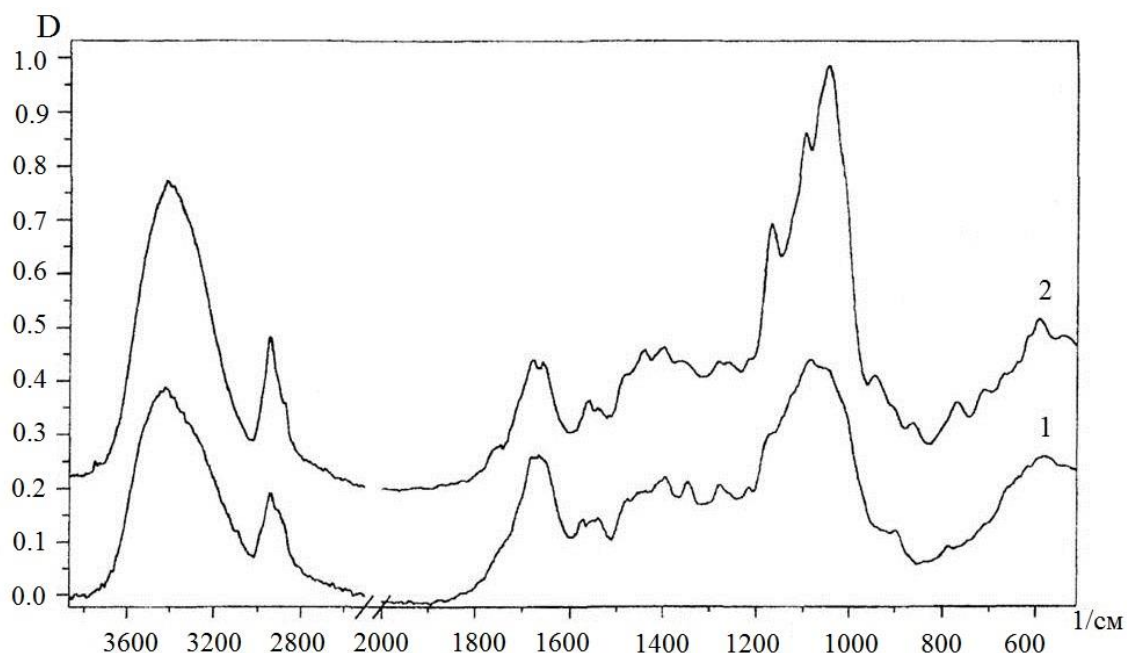


Рисунок 77 – ИК-спектры экзо- (1) и эндогликопротеинов (2), выделенных из глубинного мицелия и культуральной жидкости базидиомицета *L. edodes*
(Галицкая, Ветчинкина и др., 2010 [Doi:10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35](https://doi.org/10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35))

Самой главной областью является $1200\text{--}800\text{ см}^{-1}$ – область «отпечатков пальцев углеводов». В обоих образцах присутствовали полосы, свойственные деформационным колебаниям —C—C— , —C—O— , CH— и OH— групп. В ИК-спектре эндогликопротеина (2) присутствует интенсивная полоса в области 1150 см^{-1} , которая обусловлена колебанием связи —C—O— при втором углеродном атоме кольца ($\text{C}_2\text{—O—}$). Для образца 1 (экзогликопротеин) наиболее

интенсивной полосой в области 1200-800 см^{-1} является пик 1070-1075 см^{-1} , что присуще таким биополимерам как хитин и хитозан. Для образца 2 наиболее сильная полоса в этом диапазоне – 1020 см^{-1} и характеризующая присутствие остатков уроновых кислот. В аномерном регионе (800-900 см^{-1}) присутствовали полосы, характеризующие тип и направление связей. Полосы 940-945 см^{-1} и 850-860 см^{-1} в спектре эндогликопротеина (2) однозначно указывают на α -аномерный тип связи. Плечо при 890-900 см^{-1} говорит и о наличии в этом образце β -связей. Следовательно, можно считать, что в образце 2 одновременно присутствуют и α -(1 $\rightarrow$ 4) и β -(1 $\rightarrow$ 3)-связи. В спектре экзогликопротеина (1) присутствует только полоса 890-900 см^{-1} , указывающая на β -тип связи β -(1 $\rightarrow$ 3).

На основании проведенных исследований можно считать, что эндо- и экзогликопротеины, синтезируемые *L. edodes*, являются пептидогликанами. Экзогликопротеин – глюкан с β -(1 $\rightarrow$ 3)-связью. Эндогликопротеин – смесь глюканов с α -(1 $\rightarrow$ 4) и β -(1 $\rightarrow$ 3)-связями. Таким образом, ИК-спектры экзо- и эндогликопротеинов гриба обнаружили большое сходство между собой. Эндогликопротеин *L. edodes* – гликан с α - и β -типом гликозидных связей, в экзогликопротеине присутствует только β -гликозидная связь.

6.1.6 Периодатное окисление полисахаридов базидиомицета *L. edodes*

Как следует из данных, при периодатном окислении с последующим боргидридным восстановлением гликопротеинов потребляется периодат натрия и образуется муравьиная кислота, а продуктами гидролиза восстановленных гликопротеинов являлись глицерин, эритрит и непрогидролизированный остаток гликопротеинов. При проведении жесткого гидролиза гликопротеинов основным компонентом гидролизатов являлась интактная глюкоза, что указывает на наличие (1 $\rightarrow$ 3)-связи в основной цепи полимеров. Наличие в продуктах гидролиза эритрита указывает на присутствие (1 $\rightarrow$ 4)-связей, а образование глицерина и муравьиной кислоты при окислении – (1 $\rightarrow$ 6)-связей (Таблица 32).

Таблица 32 – Результат периодатного окисления полисахаридов *L. edodes*

Фракции полисахаридов	Расход периодата, моль/моль ангидрогексоз	Образование формата, моль/моль ангидрогексоз	Продукты гидролиза	Тип связи в боковых цепях
<i>L. edodes</i> 19				
Экзогликопротеин	1.7	0.9	эритрит	1-4
Эндогликопротеин	0.4	0.1	глицерин, эритрит	1-4; 1-6'
<i>L. edodes</i> 25				
Экзогликопротеин	1.5	0.6	эритрит	1-4
Эндогликопротеин	0.2	0.2	глицерин, эритрит	1-4; 1-6'

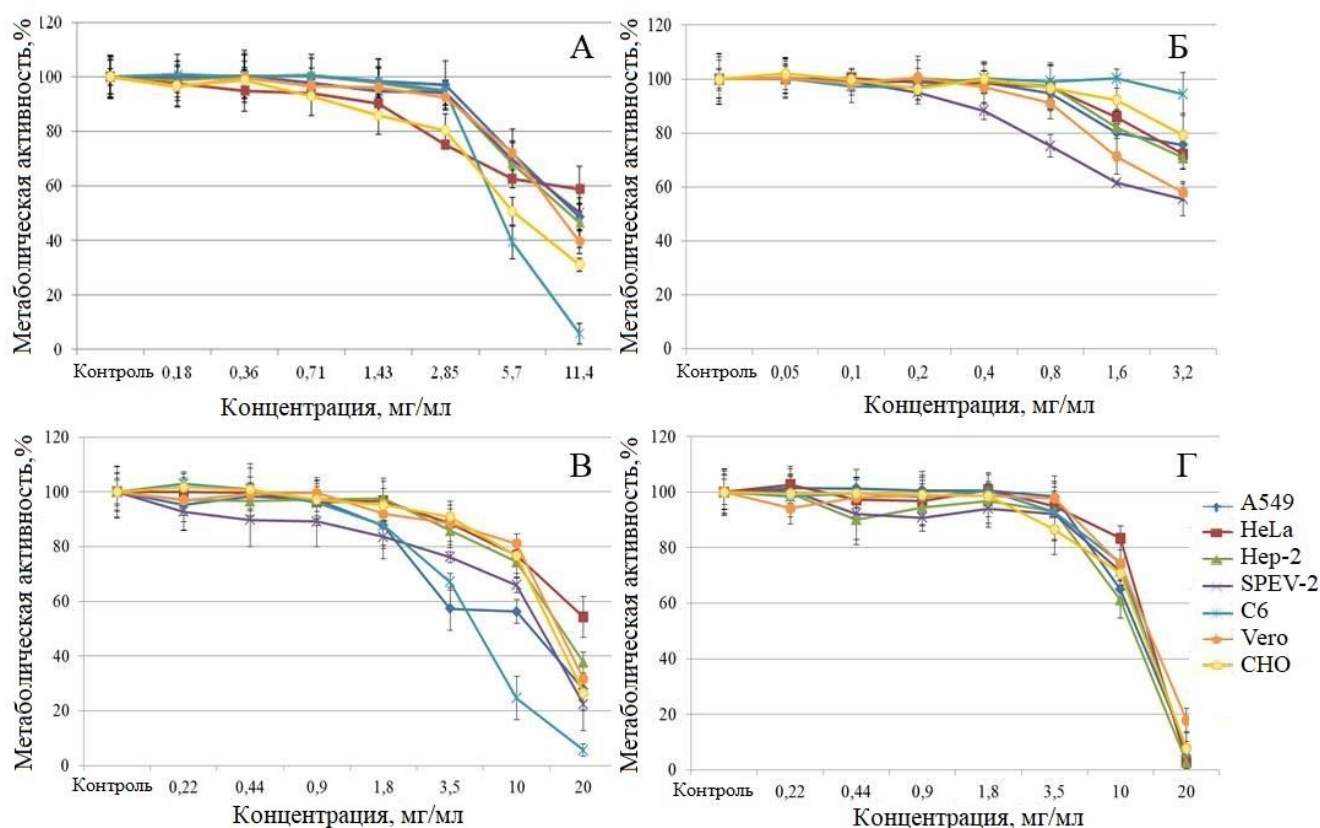
(Галицкая, Ветчинкина и др., 2010 [Doi:10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35](https://doi.org/10.18500/1816-9775-2010-10-1-29-35))

Таким образом, установлено, что гликопротеины базидиомицета *L. edodes* являются разветвленными структурами. Боковые цепи эндогликопротеинов содержат преимущественно C_1 - C_4 гликозидные связи и небольшое количество C_1 - C_6 связей, а экзогликопротеины содержат только C_1 - C_4 связи в боковых цепях молекул гликанов. Изучение абсолютной конфигурации моносахаридов, входящих в состав гликопротеинов базидиомицета, показало, что все они относятся к D-ряду (D-глюкоза, D-манноза и D-галактоза). Экзо- и эндогликополимеры базидиомицета являются гликопротеинами с содержанием белка от 2.0 до 9.2% и с преобладающим мономером глюкозой. Показано, что способ культивирования оказывает определенное влияние на строение образуемых *L. edodes* экзо- и эндогликопротеинов. На основании исследования структуры гликопротеинов с использованием ИК-спектроскопии и деградации по Смитсу установлено, что углеводная часть экзо- и эндогликопротеинов представлена разветвленными гликанами, содержащими α - и β -гликозидные связи, основная цепь представлена гликанами с $C_1 \rightarrow C_3$, боковые цепи — гликанами с $C_1 \rightarrow C_4$ и $C_1 \rightarrow C_6$ гликозидными связями.

6.2 Цитотоксичность гликопротеиновых и полисахаридных фракций из глубинного мицелия *L. edodes*

Определение цитотоксичности белковых экстрактов и полисахаридов из вегетативного мицелия и плодовых тел базидиомицетов *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, а также фракций гликопротеинов разной степени очистки, проводили на опухолевых клеточных линиях человека и животных: A549 (легочная аденокарцинома), Нер-2 (эпидермоидная карцинома гортани), HeLa (карцинома шейки матки человека), SPEV-2 (клетки почки эмбриона свиньи, зараженные онковирусом) и С6 (глиома крысы) с использованием общепринятой методики МТТ-теста на дыхательную активность животных клеток (Niks and Otto, 1990). В качестве контроля были взяты не раковые клеточные линии СНО-K1 (клетки яичников китайского хомячка) и Vero (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки). Было установлено, что суммарная фракция водорастворимых гликопротеинов с концентрацией выше 10 мг/мл на 40–90% подавляла дыхательную активность всех исследуемых клеточных линий. Наименьшее цитотоксическое действие грибной экстракт оказывал на карциному шейки матки человека (40%), наибольшее угнетение дыхательной активности (95%) проявлялось в отношении глиомы крысы при концентрации 11.4 мг/мл (Рисунок 78А).

Для сравнения цитотоксической активности, была взята фракция водорастворимых полисахаридов данной культуры. При концентрации белкового экстракта в 3.2 мг/мл угнетение жизнеспособности клеточной линии С6 было на уровне 30%, действие суммарной фракции водорастворимых полисахаридов при той же концентрации оказывало на данную раковую линию минимальное влияние (около 5%, почти на уровне контроля) (Рисунок 78Б).

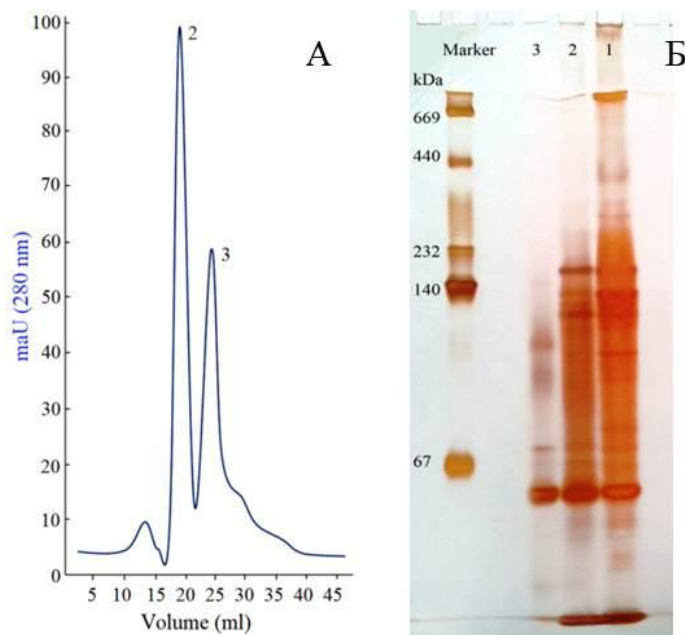


А – суммарная фракция водорастворимых гликопротеинов, Б – суммарная фракция водорастворимых полисахаридов; В – высокомолекулярная и Г – низкомолекулярная гликопротеиновые фракции после гель-фильтрации на Sephadex G-75.

Рисунок 78 – Цитотоксичность фракций водорастворимых гликопротеинов и полисахаридов глубинного мицелля *L. edodes* по отношению к клеточным линиям A549, HeLa, Hep-2, SPEV-2, C6, Vero и CHO (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Наибольший цитотоксический эффект грибные полисахариды оказывали на клетки почки эмбриона свиньи и клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки (40%), для сравнения с белковым экстрактом, при той же концентрации (3.2 мг/мл), уровень жизнеспособности клеток SPEV-2 и Vero составлял (90%). При сравнении дыхательной активности клеточных линий A549, HeLa, Hep-2 и CHO-K1 под действием грибных белковых и полисахаридных фракций прослеживается схожий (15–25%) цитотоксический эффект (Рисунок 78А,Б).

Дальнейшее исследование было направлено на выявление наиболее перспективных в плане противоопухолевого действия гликопротеиновых фракций из вегетативного мицелля базидиомицета. Для выделения белковых препаратов использовали глубинную 21 суточную культуру *L. edodes*. Внутриклеточные фракции нативных водорастворимых гликопротеинов были фракционированы по молекулярной массе методом гель-фильтрации на колонках с носителем Sephadex G-25 и G-75 (Рисунок 79А).



1 – суммарная фракция гликопротеинов, 2 – высокомолекулярная гликопротеиновая фракция и 3 – низкомолекулярная гликопротеиновая фракция из глубинного мицелия *L. edodes*; маркеры указывают (кДа).

Рисунок 79 – Гель-фильтрация водорастворимых гликопротеинов с использованием хроматографии на Sephadex G-75 (А) и неденатурирующий электрофорез в 7.5% ПААГ и окраска нитратом серебра (Б)

(Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

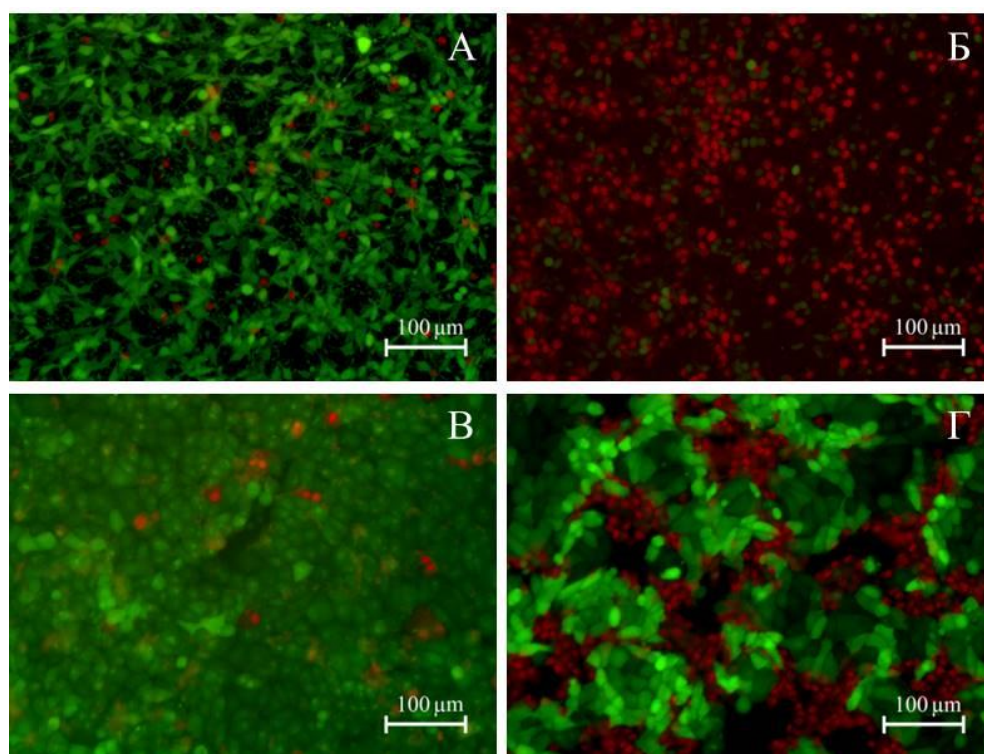
С помощью белкового нативного электрофореза в ПААГ и окрашивании нитратом серебра, было установлено, что суммарная фракция водорастворимых гликопротеинов (Рисунок 79Б, 1) после гель-фильтрации на колонке с носителем Sephadex G-75, разделилась на (условно нами названные) высокомолекулярную фракцию гликопротеинов (60–250 кДа) (Рисунок 79Б, 2) и низкомолекулярную фракцию гликопротеинов (10–100 кДа) (Рисунок 79Б, 3). Полученные фракции были подвергнуты диализу, лиофилизированы и уравновешены по массе.

Было установлено, что высокомолекулярная фракция гликопротеинов (>80 кДа) наибольший цитотоксический эффект оказывает на клеточную линию С6, при концентрации белка 3.5–10 мг/мл доля жизнеспособных клеток падает от 70% до 20%, при дальнейшем увеличении концентрации (20 мг/мл) дыхательную активность проявляют лишь 5% раковых клеток (Рисунок 78В). Для клеток легочной аденокарциномы (А549) цитотоксичность высокомолекулярной белковой фракции при тех же концентрациях составляла 50–70%. Для всех остальных клеточных линий (HeLa, Hep-2, SPEV-2, Vero и CHO-K1) при концентрации грибного белка в 10 мг/мл жизнеспособность проявляют 70–80% клеток, при концентрации 20 мг/мл – 20–60% клеток (Рисунок 78В). Низкомолекулярная белковая фракция (от <80 кДа до 5 кДа) была способна достоверно снижать метаболическую активность всех клеточных линий только при высоких концентрациях, при 10 мг/мл на 20–40%, при 20 мг/мл на 80–95% (Рисунок

78Г). При небольших концентрациях белка в 3.5 мг/мл и меньше максимальный цитотоксический эффект был равен 5–10%, в отличие от высокомолекулярной фракции, где снижение метаболической активности раковых клеток было более выраженным (Рисунок 78В, Г).

6.3 Микроскопическая оценка метаболической активности раковых клеток при воздействии гликопротеинов и полисахаридов глубинного мицелия *L. edodes*

Для всех клеточных линий высокие концентрации (10–20 мг/мл) исследуемых фракций водорастворимых гликопротеинов из вегетативного мицелия *L. edodes* приводили к некрозу или позднему апоптозу. Об этом свидетельствует почти полное отсутствие клеточного дыхания, связанное с лизисом основных внутриклеточных ферментов и данные микроскопического наблюдения, сделанные до проведения МТТ-теста (Рисунки 80, 81).

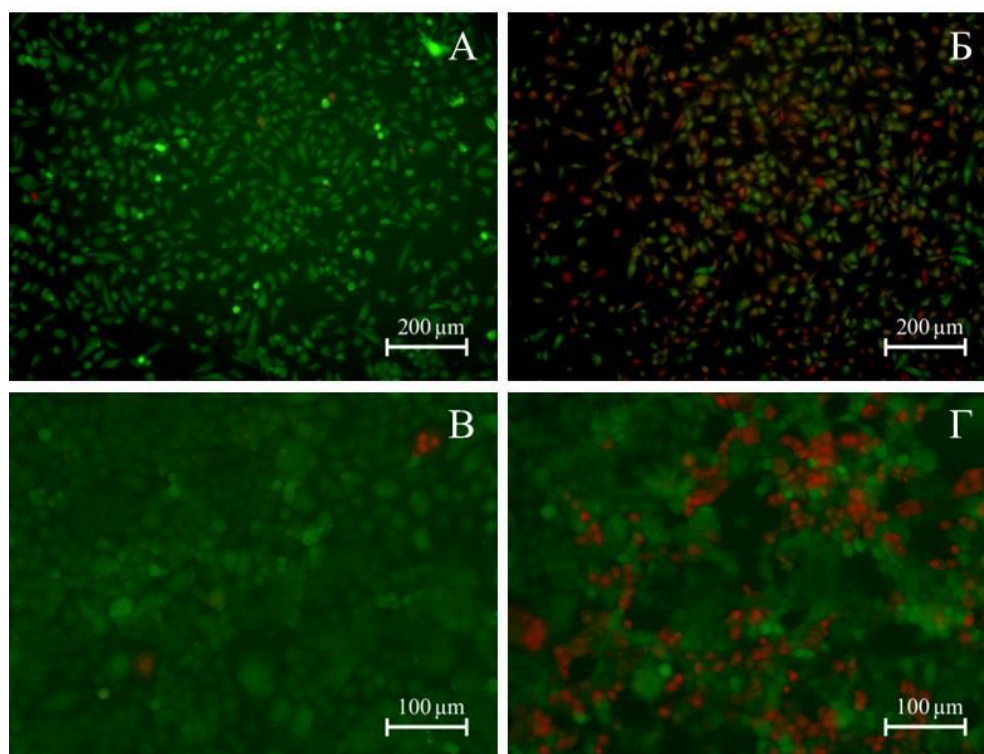


Окраска пропидий йодидом и красителем CellTracker™ CM-DiI Dye
Масштабная линейка – 100 мкм.

Рисунок 80 – Цитотоксичность по отношению к клеточным линиям С6 фракции гликопротеинов (11.4 мг/мл) (Б) и SPEV-II фракции водорастворимых полисахаридов (3.2 мг/мл) (Г) из глубинного мицелия *L. edodes*. Контроль: А – линия С6 и В – линия SPEV-II (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Клетки при данных концентрациях имели неизмененную форму при небольшом увеличении линейных размеров, были преимущественно адгезированы к подложке. Уменьшение концентрации фракций гликопротеинов индуцировало апоптоз в течение 24 часов. При концентрациях менее 10 мг/мл практически все клетки откреплялись от подложки и имели признаки апоптоза: уменьшение размера клетки, наличие апоптотных гранул, пикнолиз ядер.

При дальнейшем уменьшении концентрации грибных препаратов, доля жизнеспособных клеток увеличивалась. Полученные результаты показали, что при использовании суммарной фракции водорастворимых гликопротеинов из вегетативного мицелия полулетальная концентрация (LC_{50}) для клеточной линии С6 составляла порядка 5 мг/мл (Рисунок 78А), тогда как двукратное увеличение концентрации приводило почти к 100% гибели клеток глиома крысы (Рисунок 80Б), по сравнению с контролем (Рисунок 80А). В случае фракции водорастворимых полисахаридов в отношении линии SPEV-II полулетальная концентрация достигалась при концентрации 3.2 мг/мл (Рисунок 80Г), а минимальный цитотоксический эффект при 0.2 мг/мл и был практически на уровне контроля, приводя к гибели менее 5% раковых клеток (Рисунок 80В).



Окраска пропидий йодидом и красителем CellTracker™ CM-DiI Dye
Масштабная линейка – 100 и 200 мкм.

Рисунок 81 – Цитотоксичность по отношению к клеточным линиям A549 высокомолекулярной фракции гликопротеинов (10 мг/мл) (Б) и Нер-2 низкомолекулярной фракции гликопротеинов (10 мг/мл) (Г) из глубинного мицелия *L. edodes*. Контроль: А – линия A549 и В – линия Нер-2 (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Для клеточной линии A549 полулетальная концентрация высокомолекулярной фракции гликопротеинов находилась в диапазоне 3.5–10 мг/мл (Рисунок 81Б), минимальная действующая концентрация около 1 мг/мл (Рисунок 78В). Низкомолекулярная фракция гликопротеинов снижала на 50% метаболическую активность всех исследуемых клеточных линий при концентрации около 15 мг/мл (Рисунок 78Г), исключение составляет карцинома гортани, полулетальная концентрация (LC_{50}) низкомолекулярных соединений для Нер-2 была равна 10 мг/мл (Рисунок 81Г). Очевидно, что клеточная линия С6 (глиома крысы) была более

чувствительна к воздействию грибных препаратов, особенно это заметно при использовании фракций водорастворимых гликопротеинов. Наименее чувствительной к белковым фракциям оказалась клеточная линия HeLa. Суммарная фракция водорастворимых полисахаридов из вегетативного мицелия базидиомицета показала наибольшую цитотоксическую активность в отношении клеточной линии SPEV-II.

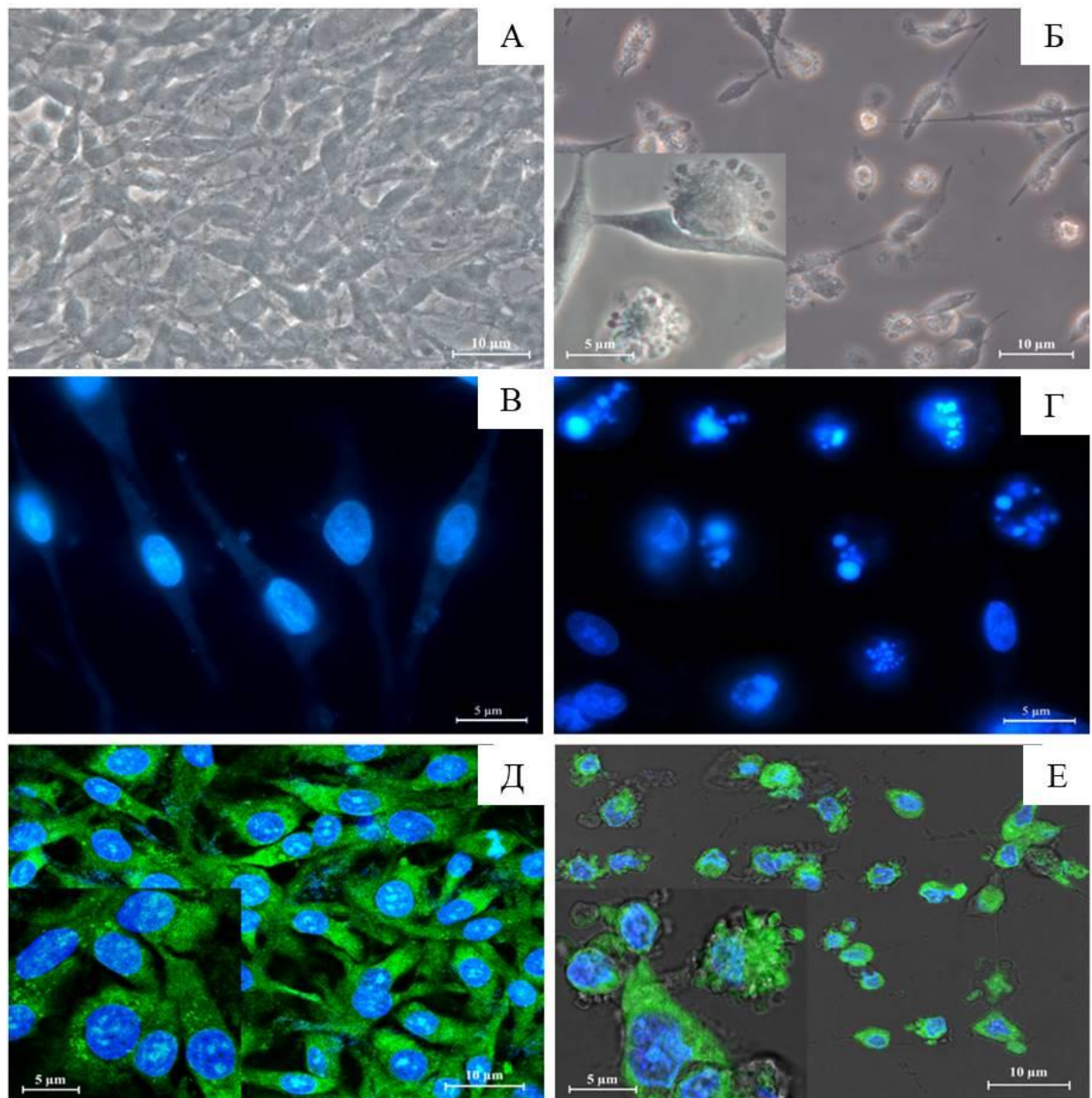
6.4 Апоптотические морфологические особенности клеток глиомы крысы (C6), подвергнутые воздействию гликопротеинов *L. edodes*

Высокие концентрации гликопротеиновых фракций приводили к полному ингибированию дыхательной активности раковых клеток всех линий, связанной с деградацией ключевых внутриклеточных ферментов. С помощью методов флуоресцентной и конфокальной микроскопии, а также методов дифференциальной окраски ядер реагентом Hoechst 33342 и окраски цитоплазмы акридиновым оранжевым, была выявлена смерть раковых клеток путем апоптоза. В концентрации 1 мг/мл форма клеток не деформировалась, линейные размеры клеток не увеличивались, и большинство клеток прикреплялось к пластинке. Увеличение концентрации гликопротеинов (10–20 мг/мл) вызывало апоптоз через 24 ч. При концентрациях более 10 мг/мл практически все клетки отделялись от культуральной пластинки. Микроскопическая оценка показала, что практически все клетки имели типичные апоптотические морфологические особенности: сморщивание клеток, наличие апоптотических телец в цитоплазме, изменение формы ядер с дефрагментацией хроматина в ядре клетки (Рисунок 82). Снижение концентрации <10 мг/мл суммарных экстрактов грибов приводило к повышению жизнеспособности клеток.

6.5 Цитотоксичность гликопротеиновых и полисахаридных фракций из глубинного мицелия лекарственных трутовиков *G. frondosa* и *G. lucidum*

Суммарная фракция гликопротеинов глубинного мицелия *G. frondosa* при высоких концентрациях (9.4 мг/мл) на 90% снижала метаболическую активность всех исследуемых раковых клеточных линий A549, HeLa, Hep-2, SPEV-2 и C6 (Рисунок 83А). При уменьшении концентрации в два раза (4.7 мг/мл) цитотоксический эффект сохранялся на прежнем уровне для линий HeLa, Hep-2 и C6, клеточные линии A549 и SPEV-2 теряли метаболическую активность на 70–60%, соответственно. При дальнейшем снижении концентрации грибного экстракта из *G. frondosa* воздействие на клеточные линии уменьшалось, и дыхательная активность клеток составляла 40–60% при концентрации 2.4 мг/мл и 60–80% при концентрации 1.2 мг/мл. Эти данные справедливы для всех клеточных линий, кроме клеток глиомы крысы (C6), воздействие грибного экстракта на данный тип раковых клеток был наибольшим среди исследуемых линий и составлял 100–90% потери дыхательной активности при концентрациях

от 9.4 до 1.2 мг/мл и 50% при концентрации 0.6 мг/мл. Все остальные клетки при концентрациях меньше 1 мг/мл сохраняли жизнеспособность на уровне 80–100% (Рисунок 83А).



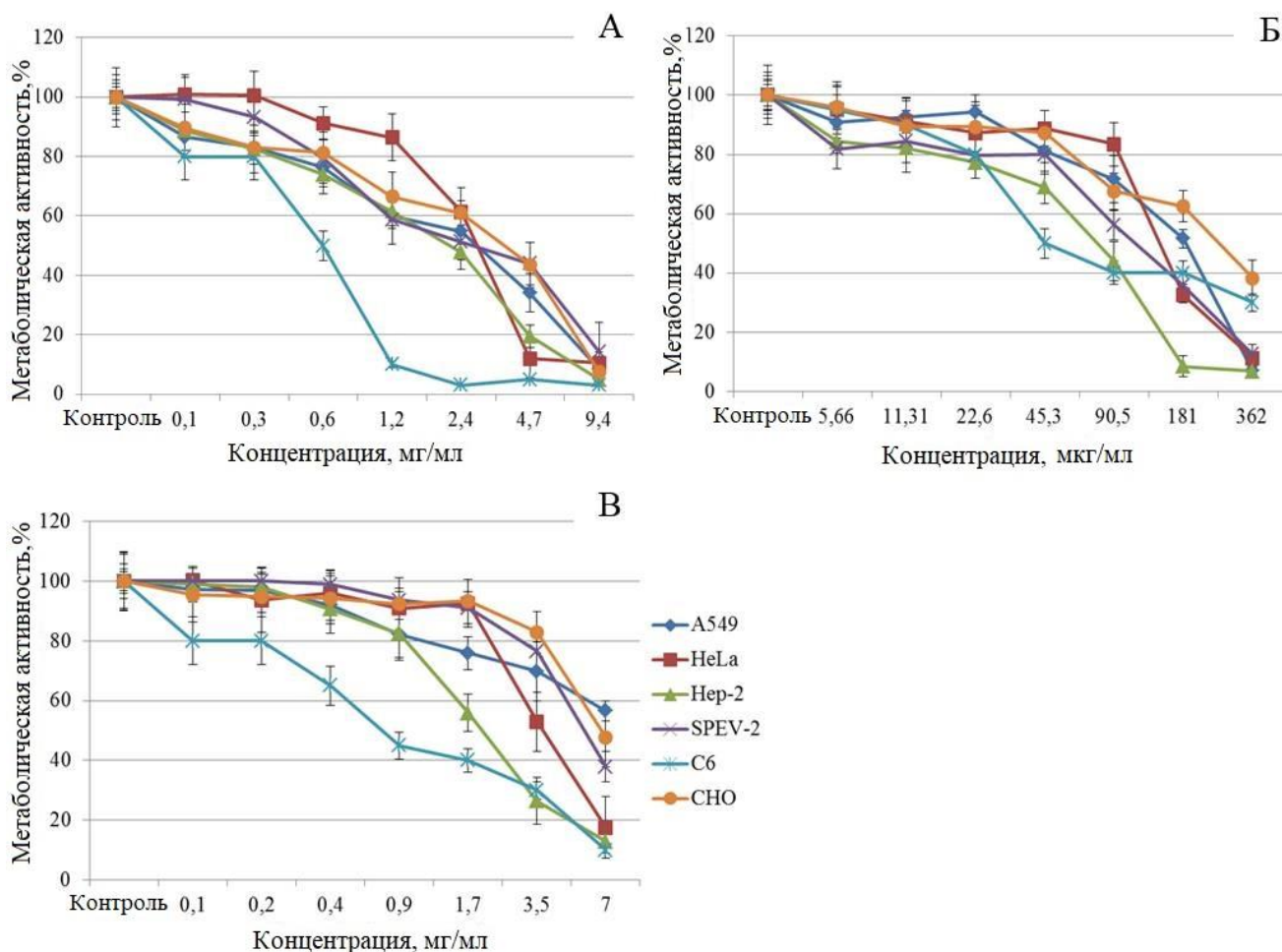
Световая микроскопия с иммерсией: А – контроль, Б – клетки С6 под воздействием грибных гликопротеинов (сморщивание клеток, наличие апоптотических телец). Флуоресцентная микроскопия: В – ядра контрольных клеток без воздействия, Г – пикнолиз ядер, дефрагментация хроматина в клетках под влиянием грибных гликопротеинов; окраска ядер реактивом Hoechst 33342.

Конфокальная микроскопия: Д – контрольные клетки С6, Е – клетки глиомы крысы с морфологическими изменениями (сморщивание клеток, наличие апоптотических телец в цитоплазме, изменение формы ядер с дефрагментацией хроматина); окраска ядер реагентом Hoechst 33342 и окраска цитоплазмы акридиновым оранжевым. Масштаб – 5 и 10 мкм.

Рисунок 82 – Апоптотические морфологические особенности клеток глиомы крысы (С6), подвергнутых воздействию гликопротеинов *L. edodes* в концентрации 10 мг/мл (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Высокомолекулярная фракция гликопротеинов глубинного мицелля *G. frondosa* проявляла более высокий цитотоксический эффект по сравнению с суммарной белковой

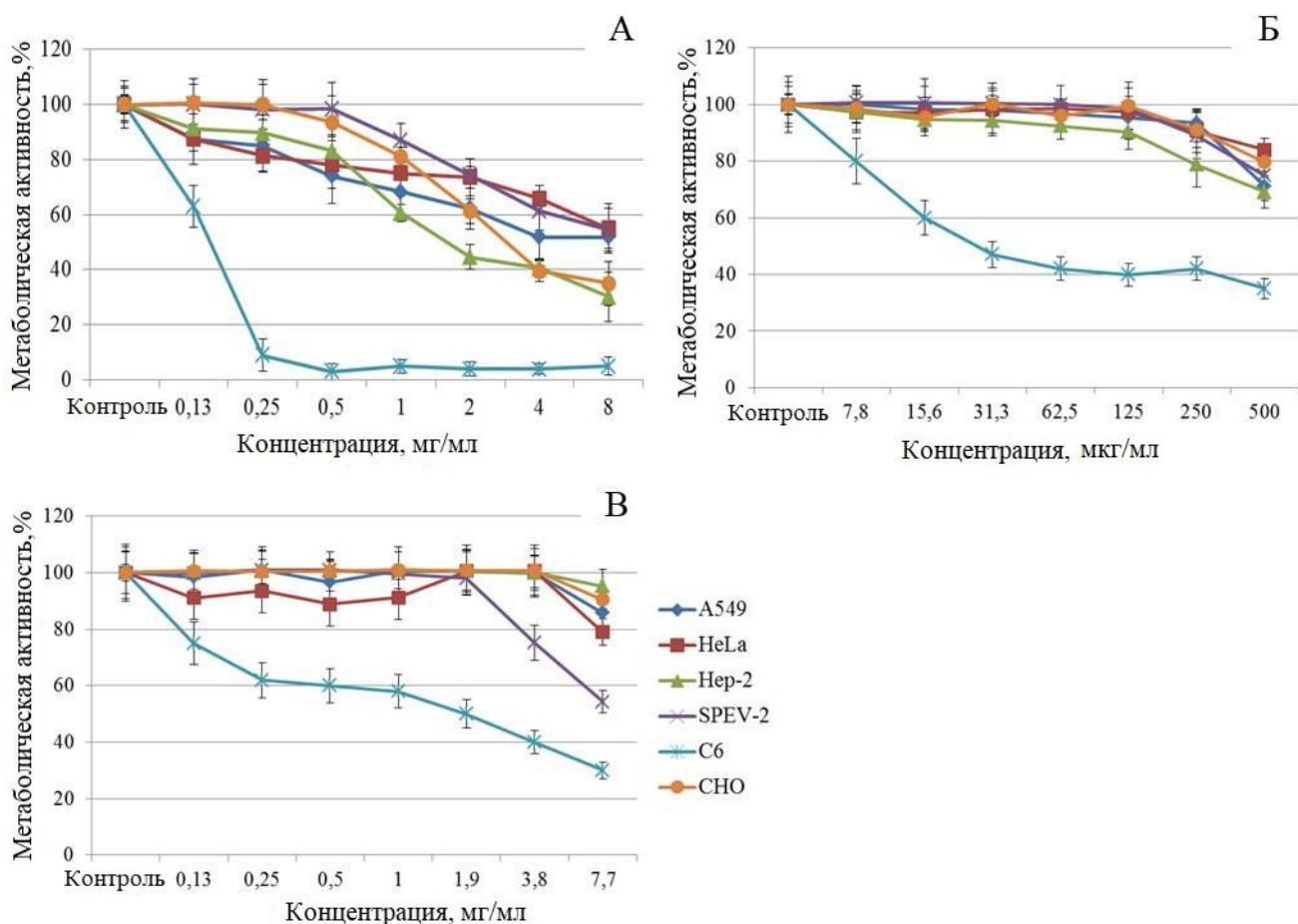
фракцией и достоверно на 90% снижала метаболическую активность клеток линий A549, HeLa, Hep-2 и SPEV-2 при концентрации 0.36 мг/мл и на 70% клеток линий C6. При уменьшении концентрации грибного белкового препарата цитотоксическое воздействие на клетки снижалось и составляло 50–60% угнетения дыхательной активности при 0.2 мг/мл (для Hep-2 на прежнем уровне – 90%) и на 50–10% при концентрации менее 0.1 мг/мл (Рисунок 83Б). Низкомолекулярная фракция из вегетативного мицелия *G. frondosa*, по сравнению с предыдущими, обладала меньшей цитотоксической активностью в отношении исследуемых раковых клеток, при высоких концентрациях (7 мг/мл) снижая метаболическую активность на 90% в отношении HeLa, Hep-2 и C6 и на 60–40% в отношении A549 и SPEV-2. При уменьшении концентрации от 3.5 до 0.9 мг/мл жизнеспособность клеток увеличивается с 30 до 80%. Концентрации менее 0.9 мг/мл не оказывали воздействия на раковые клетки, кроме C6, где в диапазоне концентраций от 3.5 до 0.1 мг/мл отмечено ингибирование дыхательной активности клеток глиомы на 70–20%, соответственно (Рисунок 83В).



А – суммарная фракция водорастворимых гликопротеинов, Б – высокомолекулярная и В – низкомолекулярная гликопротеиновые фракции после гель-фильтрации на Sephadex G-75.

Рисунок 83 – Цитотоксичность фракций водорастворимых гликопротеинов глубинного мицелия *G. frondosa* по отношению к опухолевым клеточным линиям A549, HeLa, Hep-2, SPEV-2, C6 и CHO

Суммарная фракция водорастворимых гликопротеинов глубинного мицелия трутовика *G. lucidum* при высоких концентрациях подавляла метаболическую активность клеточных линий A549, HeLa, Hep-2 и SPEV-2 на 70–40% при 8 мг/мл, 60–30% при 4 мг/мл и 50–20% при 2 мг/мл, что немного слабее по сравнению с суммарной гликопротеиновой фракцией из *G. frondosa*. Дальнейшее уменьшение концентрации грибного препарата приводило к снижению цитотоксического действия на клетки и при концентрации 0.5 мг/мл подавление метаболической активности было на уровне 2–20%. Исключение составляет клеточная линия С6, воздействие экстракта из *G. lucidum* на данный тип клеток было очень велико, наблюдалось почти полное подавление метаболической активности клеток глиомы в диапазоне концентраций от 8 до 0.25 мг/мл грибного препарата (Рисунок 84А). Высокомолекулярная фракция гликопротеинов глубинного мицелия трутовика *G. lucidum* была цитотоксически активна в диапазоне концентраций от 0.5 до 0.125 мг/мл на 40–10% в отношении всех клеточных линий, кроме С6, где отмечено подавление метаболической активности клеток на 60–40% при концентрациях грибной фракции от 0.5 до 0.02 мг/мл (Рисунок 84Б).



А – суммарная фракция водорастворимых гликопротеинов, Б – высокомолекулярная и В – низкомолекулярная гликопротеиновые фракции после гель-фильтрации на Sephadex G-75.

Рисунок 84 – Цитотоксичность фракций водорастворимых гликопротеинов глубинного мицелия *G. lucidum* по отношению к опухолевым клеточным линиям A549, HeLa, Hep-2, SPEV-2, C6 и CHO

Низкомолекулярные гликопротеины трутовика лакированного проявляли наиболее слабое воздействие на дыхательную активность всех раковых клеточных линий, подавляя метаболизм клеток A549, HeLa и HEp-2 на 10–20%, SPEV-2 – на 50% и C6 – на 70% при концентрации грибной фракции около 8 мг/мл. При уменьшении концентрации до 2 мг/мл цитотоксический эффект в отношении клеточных линий A549, HEp-2 и SPEV-2 не наблюдался, сохраняясь на уровне 10% по отношению к HeLa и 50% по отношению к C6 (Рисунок 84В).

Взятая в качестве контроля не раковая клеточная линия СНО (клетки яичников китайского хомячка), по-разному реагировала на воздействие гликопротеинов глубинного мицелия трутовиков *G. frondosa* и *G. lucidum* (Рисунки 83, 84). Высокие концентрации экстрактов базидиомицетов сильно подавляли метаболическую активность данной клеточной линии, однако, при уменьшении концентраций, проявление цитотоксического эффекта в отношении СНО было более слабое, чем в отношении раковых клеток. Особенно заметно это правило при фракционировании грибных гликопротеинов. Можно видеть, например, что при концентрации 0.4–0.2 мг/мл высокомолекулярной фракции *G. frondosa* подавление метаболической активности клеток СНО было на уровне 60–40%, в то время как всех раковых клеток при тех же концентрациях в пределах 90–50% в зависимости от типа раковых клеток (Рисунок 83Б).

При сравнении цитотоксического действия на клеточные линии гликопротеиновых и полисахаридных фракций из лекарственных трутовиков *G. frondosa* и *G. lucidum*, было установлено, что в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 1 мг/мл наибольшую цитотоксическую активность проявляли грибные гликопротеины, по сравнению с полисахаридами из вегетативного мицелия обоих трутовиков (Рисунок 85).

Как видно из представленных данных при концентрации 1 мг/мл гликопротеиновая фракция *G. frondosa* подавляла метаболическую активность клеточных линий A549, HeLa, HEp-2 и SPEV-2 на 20–40%, C6 – на 90%, в то время как фракция полисахаридов из вегетативного мицелия *G. frondosa* была способна подавлять метаболизм клеток A549, HeLa и SPEV-2 только на 10%, C6 на 20% и не проявляла цитотоксического действия в отношении HEp-2 при данном диапазоне концентраций (Рисунок 85А, Б).

Такая же динамика наблюдается и при сравнении цитотоксичности полисахаридов и гликопротеинов из вегетативного мицелия *G. lucidum*. При концентрациях 1 – 0.25 мг/мл было отмечено подавление метаболической активности клеточных линий A549, HeLa и HEp-2 на 20–40%, SPEV-2 на 10% и C6 – на 90–100%, фракция полисахаридов оказывала минимальное цитотоксическое действие на все клеточные линии, менее 10%, и угнетала жизнеспособность глиомы крысы (C6) на 40–20% при концентрациях 1–0.12 мг/мл, соответственно (Рисунок 85В, Г). Стоит отметить, что на контрольную клеточную линию СНО полисахариды из вегетативного мицелия трутовиков *G. frondosa* и *G. lucidum* в диапазоне концентраций до 1 мг/мл никакого цитотоксического действия не оказывали (Рисунок 85Б, Г).

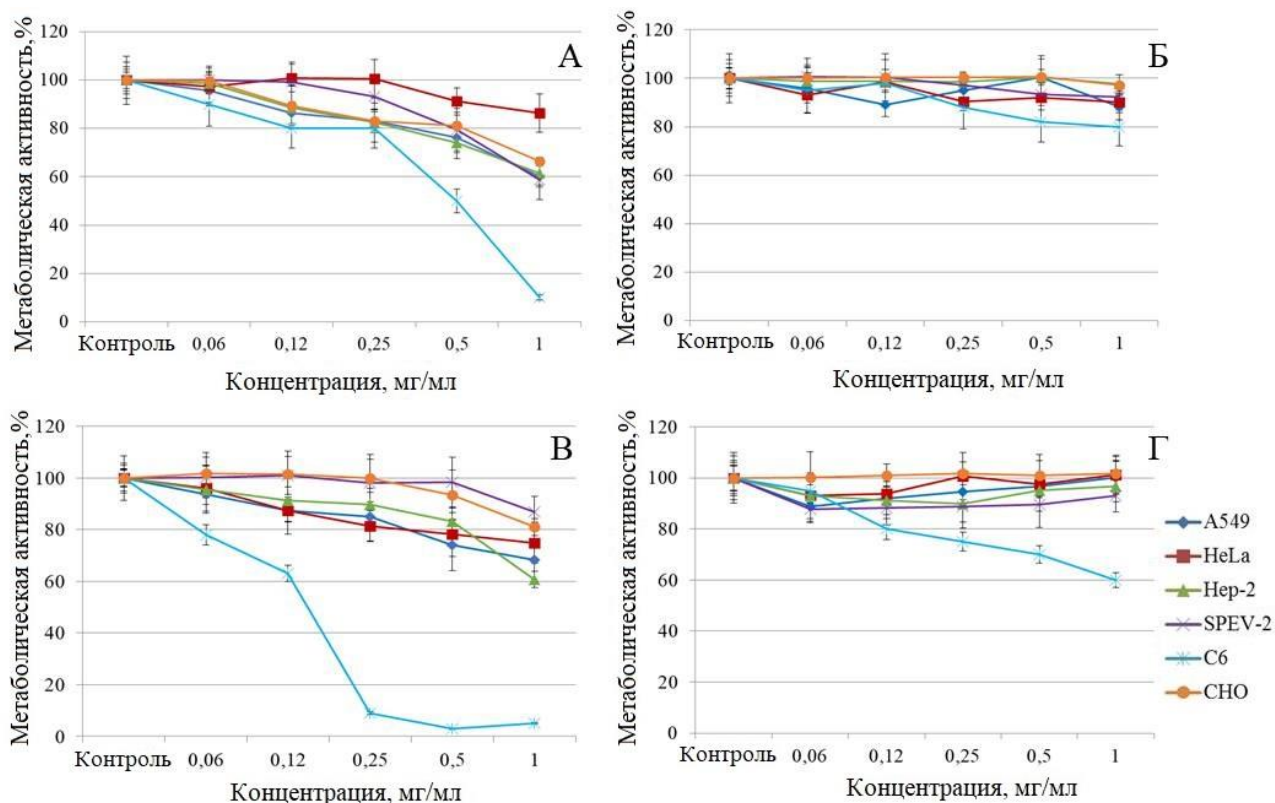


Рисунок 85 – Цитотоксичность фракций водорастворимых гликопротеинов (А, В) и полисахаридов (Б, Г) глубинного мицелия *G. frondosa* (А, Б) и *G. lucidum* (В, Г) по отношению к опухолевым клеточным линиям А549, HeLa, Hep-2, SPEV-2, С6 и CHO

Наибольший цитотоксический эффект полисахариды лекарственных трутовиков оказывали в отношении глиомы крысы (С6), ингибируя дыхательную активность клеток на 20–40% при концентрации 1 мг/мл (Рисунок 86). При увеличении концентрации грибных полисахаридных фракций цитотоксическое действие усиливалось, при концентрации 5 мг/мл

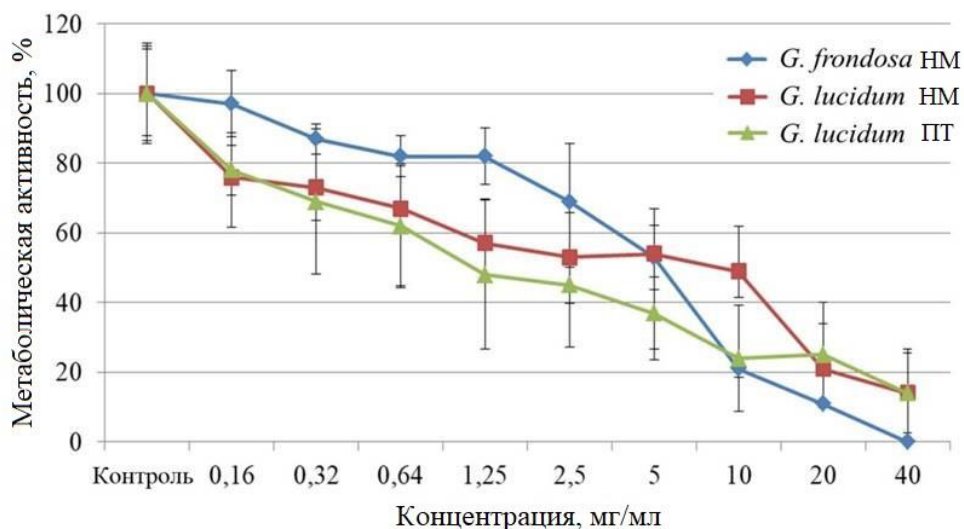
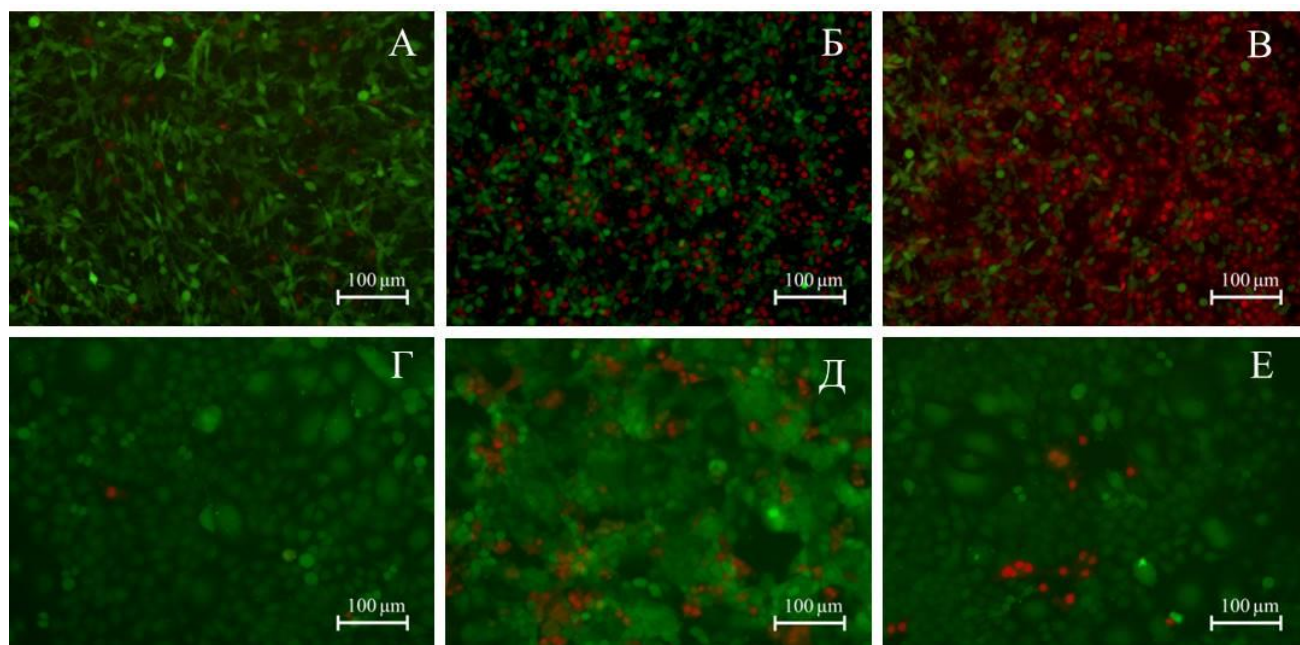


Рисунок 86 – Цитотоксичность водорастворимых полисахаридов глубинного мицелия *G. frondosa* и мицелия и плодового тела *G. lucidum* по отношению к опухолевой клеточной линии С6 (глиома крысы)

угнетая метаболическую активность клеток С6 на 50%, при 10 мг/мл на 80% (полисахариды вегетативного мицелия *G. frondosa*) и около 60% (полисахариды вегетативного мицелия *G. lucidum*). При концентрации 20 мг/мл жизнеспособность раковых клеток подавлялась на 90% и при концентрации 40 мг/мл клетки были полностью (100%) не жизнеспособны. Фракция водорастворимых полисахаридов из плодовых тел трутовика лакированного *G. lucidum* оказывала схожее воздействие на клеточную линию С6, подавляя метаболическую активность на 20–90% в диапазоне концентраций 0.16–40 мг/мл (Рисунок 86).

6.6 Микроскопическая оценка метаболической активности раковых клеток при воздействии гликопротеинов и полисахаридов глубинного мицелия *G. frondosa* и *G. lucidum*

Оценка жизнеспособности раковых клеточных линий при воздействии на них грибных препаратов была также проанализирована с применением световой микроскопии и методов дифференциального окрашивания по типу «живой-мертвый». Для окрашивания мертвых клеток использовали йодистый пропидий, который проникает только через мембраны мертвых клеток, данная особенность позволяет селективно окрасить клеточную популяцию. Для окраски живых клеток, использовали зеленый флуоресцентный краситель. На микрофотографиях можно видеть, что по отношению к линии С6 суммарная фракция гликопротеинов из мицелия *G. frondosa* при 0.5 мг/мл подавляет митохондриальную дыхательную активность 50% клеток С6 (Рисунок 87Б).

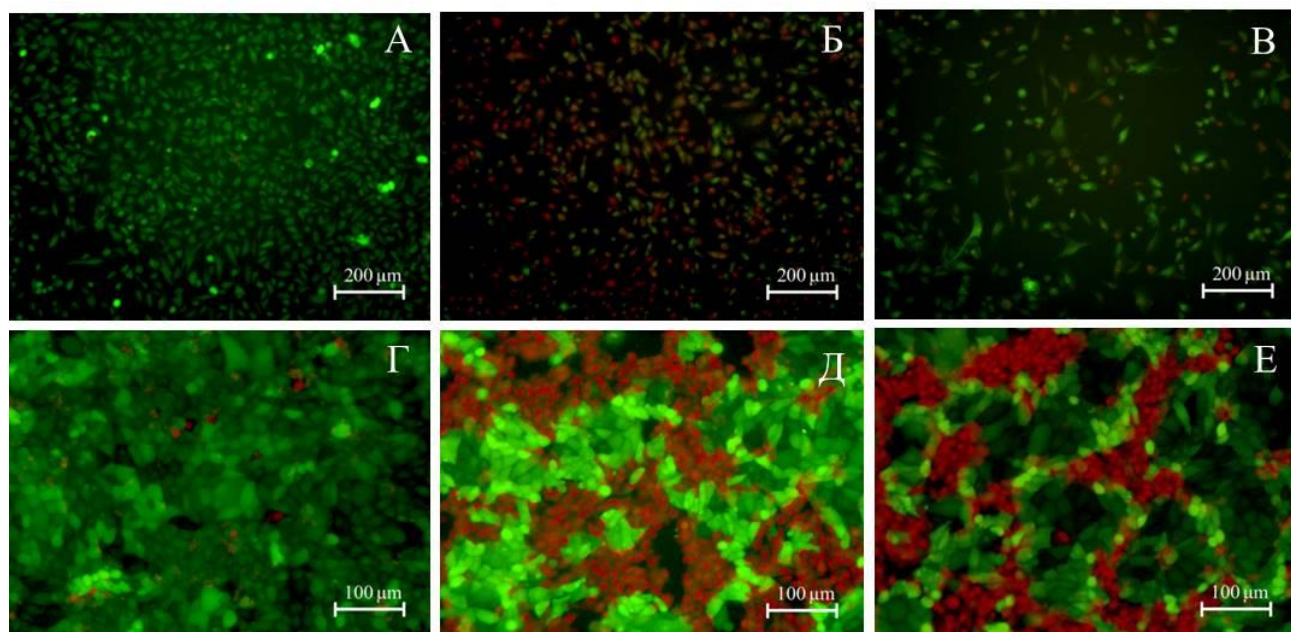


Окраска пропидий йодидом и красителем CellTracker™ CM-DiI Dye
Масштабная линейка – 100 мкм.

Рисунок 87 – Цитотоксичность по отношению к линии С6 фракций гликопротеинов *G. frondosa* (0.5 мг/мл) (Б) и *G. lucidum* (0.5 мг/мл) (В); и к линии HeLa фракций полисахаридов *G. frondosa* (0.5 мг/мл) (Д) и *G. lucidum* (0.5 мг/мл) (Е). Контроль А – линия С6 и Г – HeLa (Ветчинкина, 2022 [DOI: 10.14427/amm.2022.xxiii.06](https://doi.org/10.14427/amm.2022.xxiii.06))

При той же концентрации гликопротеины *G. lucidum* подавляли метаболическую активность 90% клеток глиомы, что наглядно представлено красными клетками, занимающими практически все поле монослоя культуры клеток С6 (Рисунок 87В). Полученные результаты подтверждают данные МТТ-теста представленные выше (Рисунки 83А,84А). Для сравнения фракции водорастворимых полисахаридов *G. frondosa* и *G. lucidum* при той же концентрации 0.5 мг/мл имели минимальный цитотоксический эффект и подавляли жизнеспособность 10% клеток HeLa, в случае полисахаридов грифолы курчавой и 5% клеток HeLa, в случае полисахаридов трутовика лакированного, данные представлены на рисунках 87Д, Е, соответственно. На микропрепаратах можно видеть монослой клеток HeLa окрашенных зеленым «живым» красителем и единичные мертвые клетки красного цвета. Данные микроскопии согласуются с данными МТТ-теста для полисахаридных препаратов (Рисунок 85Б, Г).

Высокомолекулярная фракция гликопротеинов *G. frondosa* при концентрации 0.4 мг/мл подавляла жизнеспособность 80% клеток линии А549 (Рисунок 88Б), а гликопротеины с высокой молекулярной массой *G. lucidum* при близкой концентрации 0.5 мг/мл ингибировали дыхательную активность клеток той же линии только на 30% (Рисунок 88В). Как и в предыдущих экспериментах (Рисунки 83Б, 84Б). Низкомолекулярные фракции гликопротеинов из лекарственных трутовиков при высоких концентрациях (7 мг/мл) действовали схожим образом, подавляя жизнеспособность раковой клеточной линии SPEV-II на 50–60% (Рисунок 88Д, Е).



Окраска пропидий йодидом и красителем CellTracker™ CM-DiI Dye
Масштабная линейка – 100 и 200 мкм.

Рисунок 88 – Цитотоксичность по отношению к клеточной линии А549 высокомолекулярных фракций гликопротеинов *G. frondosa* (0.4 мг/мл) (Б) и *G. lucidum* (0.5 мг/мл) (В); и к клеточной линии SPEV-II низкомолекулярных фракций гликопротеинов *G. frondosa* (7 мг/мл) (Д) и *G. lucidum* (7 мг/мл) (Е). Контроль А – линия А549 и Г – линия SPEV-II
(Ветчинкина, 2022 [DOI: 10.14427/amm.2022.xxiii.06](https://doi.org/10.14427/amm.2022.xxiii.06))

Данные также согласуются с представленными выше результатами МТТ-теста по воздействию низкомолекулярных гликопротеинов вегетативного мицелия трутовиков на клеточную линию SPEV-II в тех же концентрациях (Рисунки 83В, 84В).

6.7 Ингибирование метаболической активности раковых клеточных линий HeLa и С6 очищенными белковыми препаратами из глубинного мицелия *G. frondosa* и *G. lucidum*

Разделение гликопротеиновых фракций из вегетативного мицелия базидиомицетов *G. frondosa* и *G. lucidum* проводили с помощью ионообменной хроматографии, после чего белковые препараты подвергались диализу и лиофилизации (Рисунок 89А, В). Белковый состав фракций исследовали с помощью нативного электрофореза в полиакриламидном геле с последующей окраской нитратом серебра (Рисунок 89Б, Г).

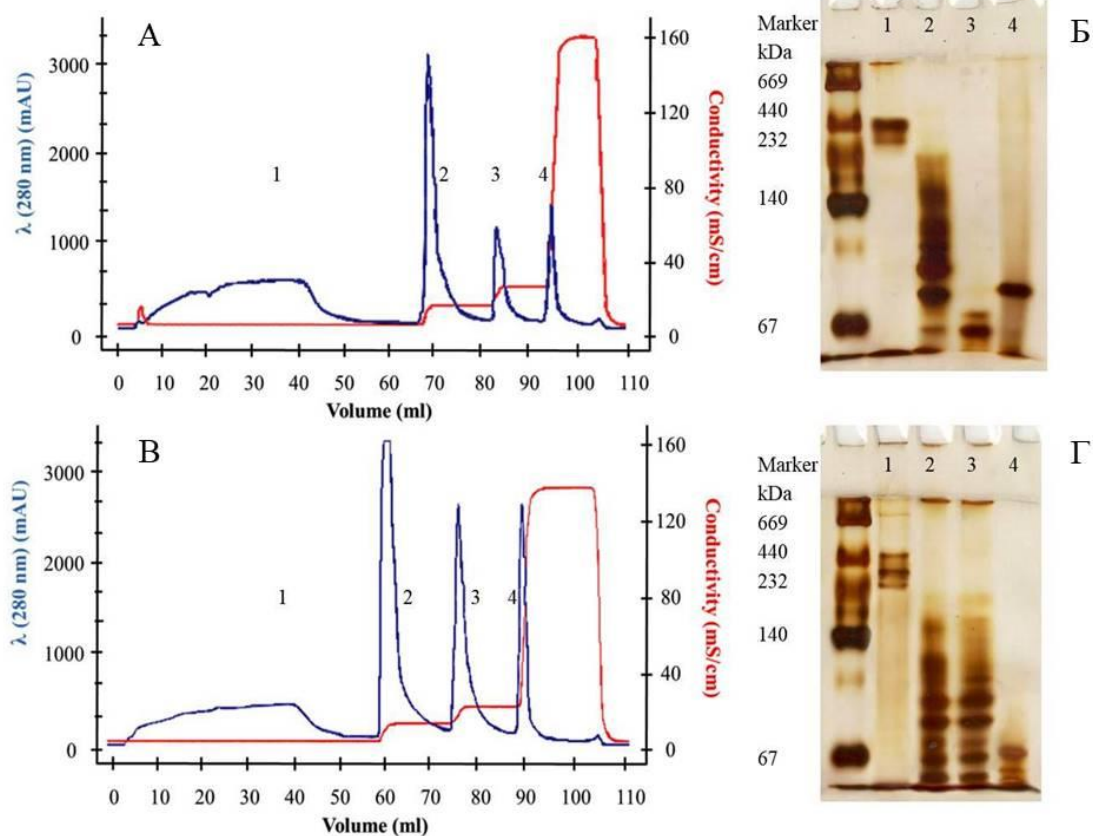


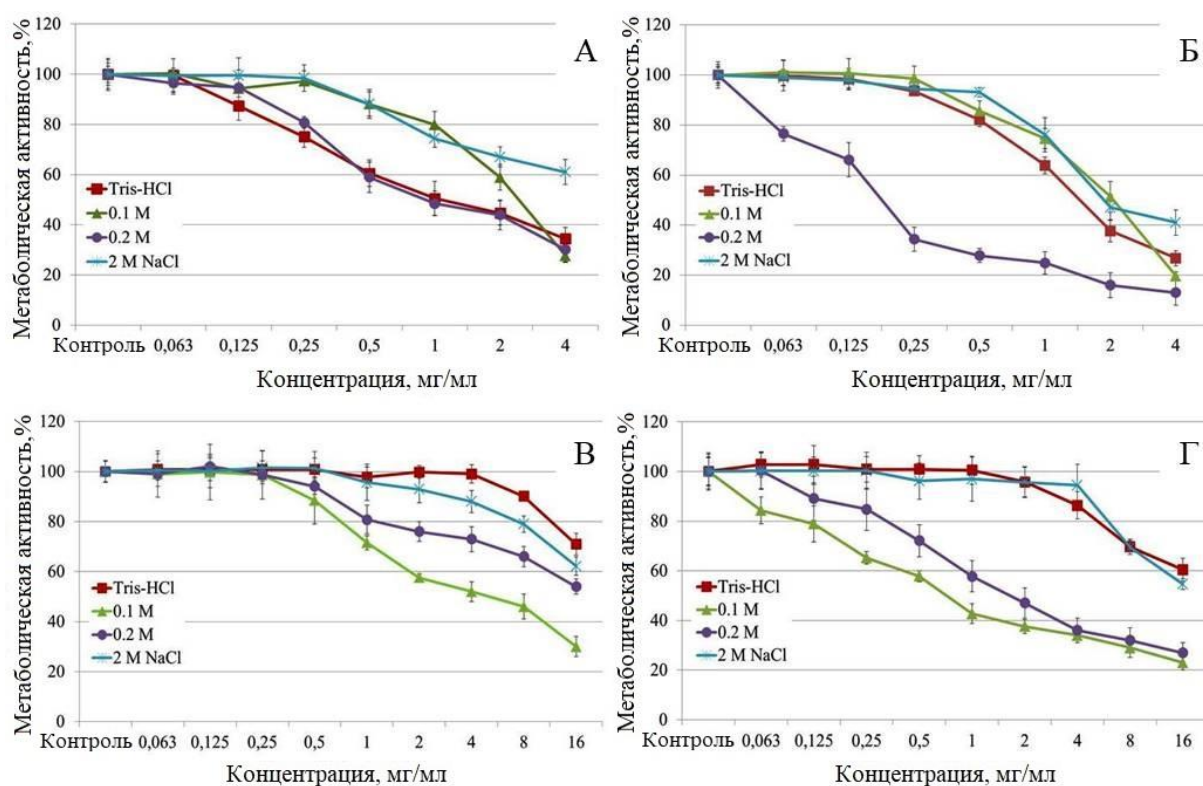
Рисунок 89 – Анионообменная хроматография на Toyopearl DEAE-650M с градиентом NaCl от 0.1 до 2.0M; профили элюции гликопротеинов из глубинного мицелия *G. frondosa* (А) и *G. lucidum* (В). Неденатурирующий электрофорез в 7.5% ПААГ и окрашивание нитратом серебра фракций белков: Tris-HCl (1), 0.1M NaCl (2), 0.2M NaCl (3), 2M NaCl (4) из мицелия *G. frondosa* (Б) и *G. lucidum* (Г); маркеры указывают (кДа)

В гликопротеиновой фракции из вегетативного мицелия *G. frondosa*, не связавшейся с ионообменным носителем было обнаружено две четких белковых полосы с молекулярной массой около 300 и 400 кДа. Во фракции, элюированной с колонки 0.1M концентрацией NaCl, обнаружено шесть белковых полос с молекулярной массой от 60 до 170 кДа. Белковая фракция,

элюированная 0.2M NaCl, содержала две белковые полосы, одну мажорную с молекулярной массой 60 кДа и одну минорную полосу с массой около 80 кДа. Во фракции, элюированной с ионообменного носителя 2M концентрацией соли NaCl, была обнаружена одна четкая белковая полоса с молекулярной массой около 90 кДа (Рисунок 89Б).

Аналогичным образом исследовали белковый состав фракций из вегетативного мицелия *G. lucidum* после разделения методом ионообменной хроматографии. Было выявлено три белка не связавшейся с ионообменным носителем молекулярной массой от 250 до 400 кДа. Во фракции, элюированной при 0.1M NaCl, обнаружено наибольшее количество белковых полос с приблизительными молекулярными массами 40, 60, 70, 80, 90, 120 и 150 кДа. Белковая фракция, элюированная 0.2M NaCl, содержала четыре мажорные белковые полосы с молекулярной массой 50, 60, 80 и 90 кДа, и две минорные белковые полосы с молекулярной массой 70 и 100 кДа. Во фракции, элюированной с ионообменного носителя 2M концентрацией соли NaCl, были обнаружены три белковые полосы с молекулярной массой около 50, 60 и 70 кДа (Рисунок 89Г).

Все полученные белковые фракции из вегетативного мицелия трюфеликов подавляли дыхательную активность раковых клеток карциномы шейки матки человека и глиома крысы, но с разной степенью цитотоксичности (Рисунок 90). При использовании вегетативного мицелия



Фракция белков, не связавшихся с носителем – Tris-HCl, фракции элюированные с носителя при концентрации соли NaCl – 0.1 M, 0.2 M и 2.0 M).

Рисунок 90 – Цитотоксичность фракций гликопротеинов глубинного мицелия *G. frondosa* (А, Б) и *G. lucidum* (В, Г) после ионообменной хроматографии на Toyopearl CM 650-M по отношению к опухолевым клеточным линиям HeLa (А, В) и С6 (Б, Г)

базидиомицета *G. frondosa* гликопротеиновые фракции не связавшиеся с ионообменным носителем и элюированные с колонки при концентрации 0.1 и 0.2M NaCl при 1 мг/мл проявляли довольно сильную цитотоксичность по отношению к клеточным линиям карциномы и глиомы, подавляя жизнеспособность клеток на 40–50% (фракции Tris-HCl и 0.2M NaCl) и на 20% (фракция 0.1M NaCl) (Рисунок 90А, Б).

При увеличении концентрации (4 мг/мл) все три белковые фракции подавляли метаболическую активность клеток карциномы на 70%, а клеток глиомы на 80%. Фракция белков элюированных высокой концентрацией соли (2M NaCl) проявляла меньшую цитотоксическую способность по сравнению с предыдущими фракциями и ингибировала жизнеспособность клеточной линии HeLa максимально на 40% и клеточной линии С6 на 60% при концентрации 4 мг/мл (Рисунок 90А, Б).

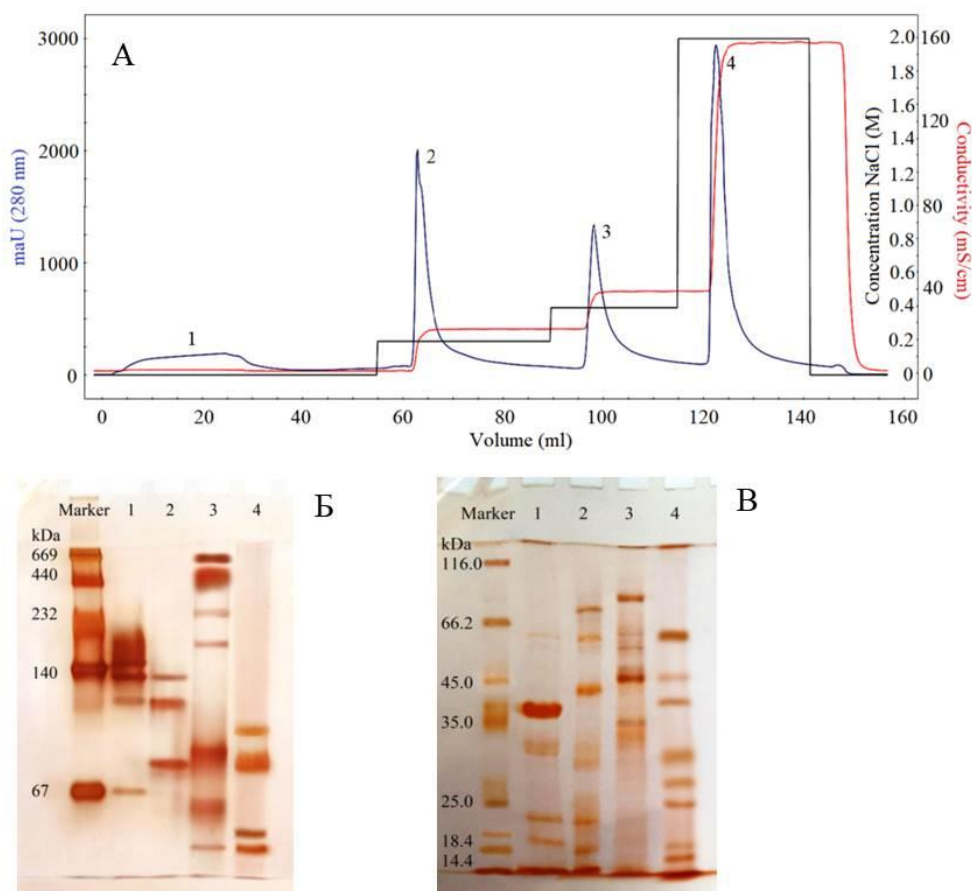
Гликопротеины вегетативного мицелия *G. lucidum* не связавшиеся с ионообменным носителем и фракция белков элюированных высокой концентрацией соли (2M NaCl) были способны ингибировать метаболическую активность раковых клеток, как HeLa, так и С6, только в больших концентрациях (4–16 мг/мл) максимум на 10–40%. Гликопротеиновые фракции, элюированные с ионообменного носителя при 0.1 и 0.2M NaCl, проявляли большую цитотоксичность, подавляя дыхательную активность клеток HeLa и С6 на 30–60% уже при 1 мг/мл, с последующей возрастающей цитотоксичностью при увеличении концентрации (Рисунок 90В, Г).

6.8 Цитотоксичность, белковый и субъединичный состав отдельных гликопротеиновых фракций из глубинного мицелия *L. edodes* после ионообменной хроматографии

Дальнейшая очистка гликопротеинов вегетативного глубинного мицелия базидиомицета *L. edodes* проводилась методом ионообменной хроматографии с использованием колонки с носителем Toyopearl DEAE-650M и градиента соли от 0.02 до 2M NaCl (Рисунок 91А). Полученные фракции так же были подвергнуты диализу, лиофилизированы и уравновешены по массе. По мере разделения и очистки белковых фракций, цитотоксическое действие препаратов на опухолевые клетки усиливалось (Рисунок 92). Это справедливо в отношении фракций гликопротеинов, элюированных с ионообменного носителя при 0.1–0.4M концентрации NaCl (Рисунок 91Б, В).

Наибольшей способностью к подавлению метаболической активности данные белковые фракции обладали в отношении клеток опухоли мозга (С6), легочной аденокарциномы (А549) и онковируса (SPEV-2). Для белковой фракции 0.3–0.4M NaCl при концентрации 1 мг/мл доля жизнеспособных клеток составляла 5–25%, для фракции 0.1–0.2M NaCl при той же концентрации жизнеспособность проявляли 5–40% раковых клеток. Угнетать дыхательную активность эпидермоидной карциномы гортани (Нер-2) и рака шейки матки (HeLa),

гликопротеины, элюированные с анионообменного носителя концентрацией соли NaCl от 0.1 до 0.4М при концентрации 1 мг/мл, были способны на уровне 30–40% (Рисунок 92Б, В).

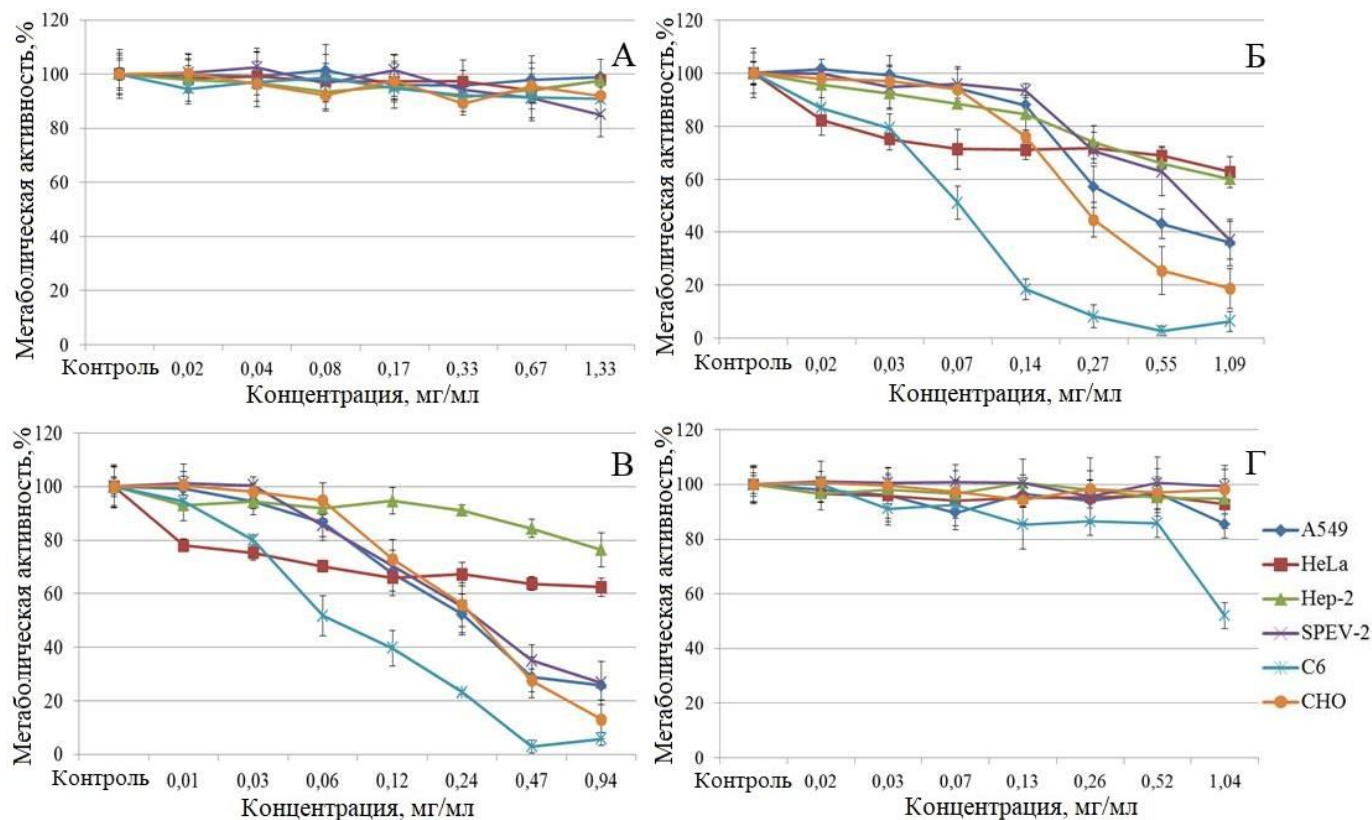


Гликопротеиновые фракции глубинного мицелия *L. edodes*: фракция, не связавшаяся с носителем Трис-HCl (1), элюированная с носителя 0.1–0.2М NaCl (2), 0.3–0.4М NaCl (3) и 0.5–2М NaCl (4); окраска нитратом серебра; маркеры указывают (кДа).

Рисунок 91 – Профили элюции гликопротеинов глубинного мицелия *L. edodes* после анионообменной хроматографии на колонке Toyopearl DEAE-650M с градиентом 0.1–2М NaCl (А); неденатурирующий электрофорез в 7.5% ПААГ (Б) и электрофорез с додецилсульфатом натрия в 15% ПААГ (В)

(Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Слабым воздействием на все исследуемые клеточные линии обладали белки (при концентрации около 1 мг/мл), не связавшиеся с анионообменным носителем и элюированные с колонки буфером Трис-HCl, а также вышедшие при концентрации соли от 0.5 до 2М NaCl (Рисунок 92А, Г). Исключение составляет воздействие на глиому крысы, высоко адсорбционная белковая фракция была способна достоверно снижать метаболическую активность клеток и при концентрации грибного белка в 1 мг/мл достигалась полуметальная концентрация (LC₅₀) для клеточной линии С6 (Рисунок 92Г). Стоит, кроме того, отметить, что для всех белковых фракций мицелия *L. edodes* на разных стадиях разделения и очистки, установлена высокая цитотоксическая активность по отношению к линии С6, в сравнении со всеми исследуемыми в работе раковыми и контрольными клеточными линиями.



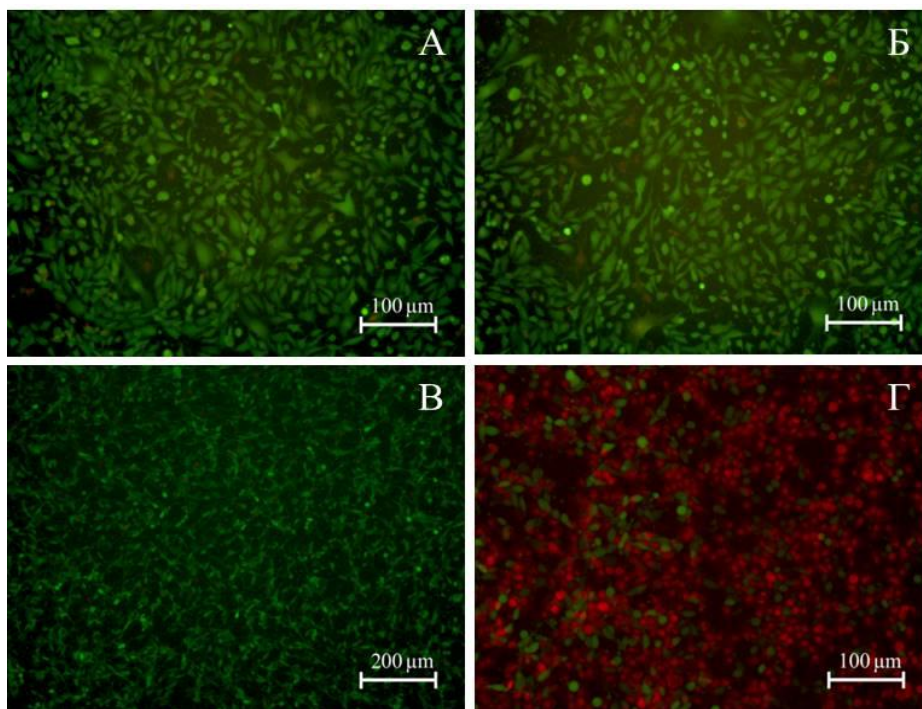
Фракции: Tris-HCl (А), 0,1 – 0,2 М NaCl (Б), 0,3 – 0,4 М NaCl (В) и 2 М NaCl (Г).

Рисунок 92 – Цитотоксичность фракций гликопротеинов глубинного мицелля *L. edodes* после ионообменной хроматографии на Toyopearl CM 650-M по отношению к линиям A549, HeLa, Hep-2, SPEV-2, C6 и Vero (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

6.9 Микроскопическая оценка метаболической активности раковых клеток при воздействии очищенных фракций гликопротеинов из глубинного мицелля *L. edodes*

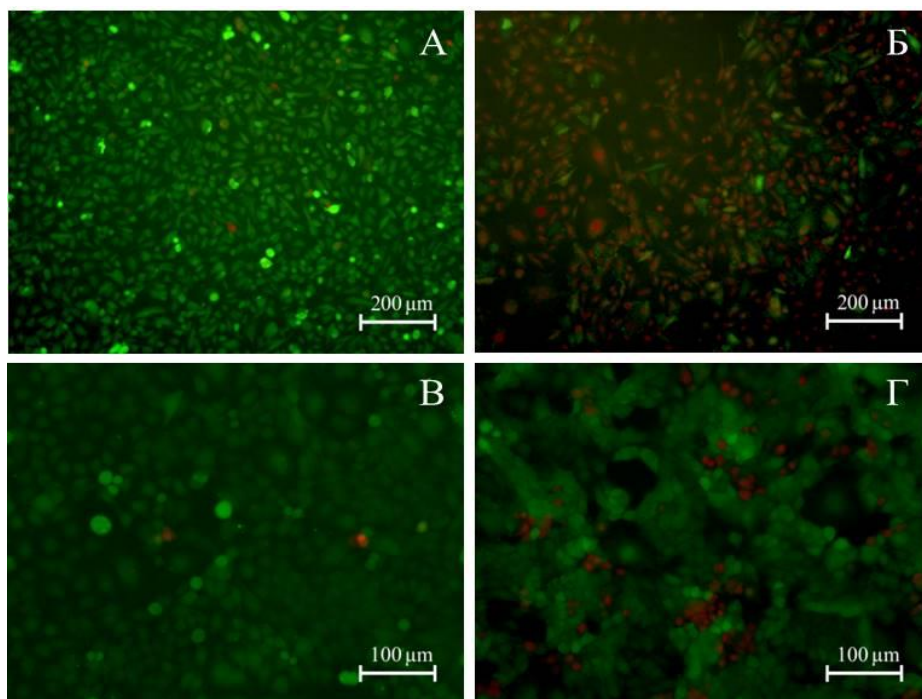
На микрофотографиях можно видеть, что фракция не связавшихся с анионообменным носителем белков при концентрации 1.3 мг/мл, не оказывала никакого действия на клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки (Рисунок 93Б), равно как и на все остальные исследуемые клеточные линии (Рисунок 92А). В то время как фракция гликопротеинов 0.1–0.2М NaCl при той же концентрации полностью прекращает метаболическую активность опухоли мозга С6 (Рисунок 93Г).

Достоверно минимальным ингибирующим дыхание клеток эффектом обладают белковые фракции 0.5–2М NaCl, как для линий A549, Hep-2, SPEV-2 и Vero, так и для HeLa (Рисунок 94Г). Напротив, белковая фракция 0.2–0.4М NaCl, при той же концентрации в 1 мг/мл показывает существенное угнетение дыхательной активности у всех линий по сравнению с контролем (Рисунок 94А), например для A549 она составляет 70% (Рисунок 94Б).



Окраска пропидий йодидом и красителем CellTracker™ CM-DiI Dye
Масштабная линейка – 100 и 200 мкм.

Рисунок 93 – Цитотоксичность гликопротеинов *L. edodes* по отношению к клеточной линии Vero фракции Tris-HCl (1.3 мг/мл) после ионообменной хроматографии (Б) и к клеточной линии С6 фракции 0.2М NaCl (1.1 мг/мл) (Г). Контроль: линия Vero (А) и линия С6 (В) (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)



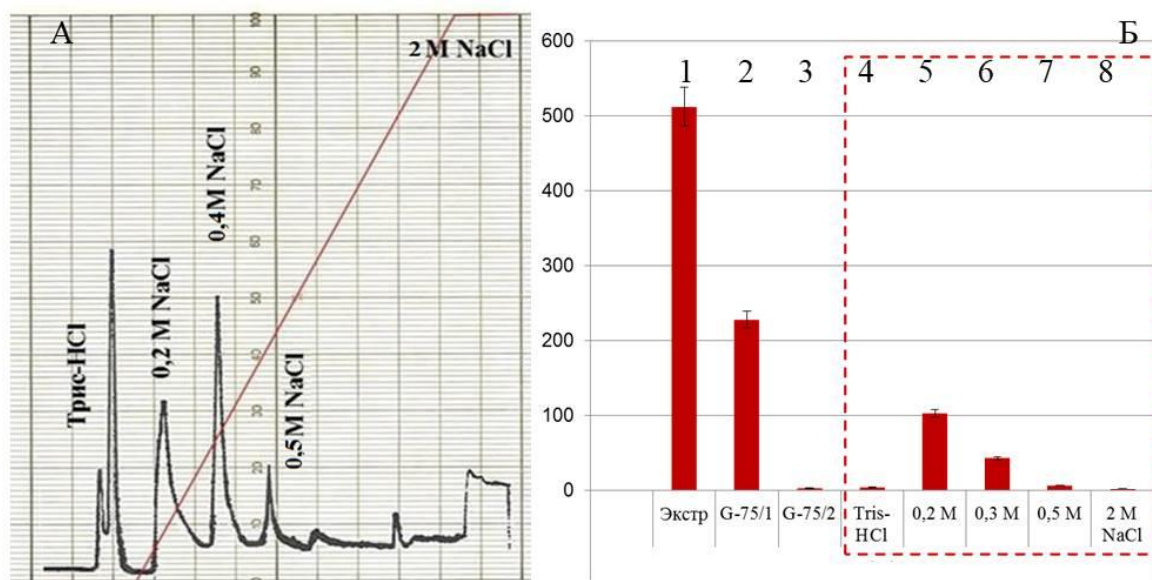
Окраска пропидий йодидом и красителем CellTracker™ CM-DiI Dye
Масштабная линейка – 100 и 200 мкм.

Рисунок 94 – Цитотоксичность гликопротеинов *L. edodes* по отношению к клеточной линии А549 фракции 0.4М NaCl (1 мг/мл) после ионообменной хроматографии (Б) и к клеточной линии HeLa фракции 2М NaCl (1 мг/мл) (Г). Контроль: линия (А) А549 и линия HeLa (В) (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Взятые в качестве контроля не раковые клеточные линии Vero (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки) и СНО-K1 (клетки яичников китайского хомячка), по-разному реагировали на воздействие гликопротеинов вегетативного мицелия. В целом, однако, грибные препараты при определенных концентрациях меньше подавляли дыхательную активность контрольных клеток по сравнению с большинством опухолевых клеточных линий (Рисунок 92).

6.10 Гемагглютинирующая активность и углеводная специфичность лектинов глубинного мицелия *L. edodes* из гликопротеиновых фракций, обладающих высокой цитотоксической активностью

Стоит отметить, что фракции гликопротеинов, способные значительно снижать метаболическую активность раковых клеточных линий, обладали так же высокой лектиновой активностью. Это гликопротеины глубинного вегетативного мицелия *L. edodes* очищенные с помощью гель-фильтрации (высокомолекулярная фракция) и ионообменной хроматографии (белки элюированные при 0.1–0.4M NaCl) (Рисунок 95А). Титр гемагглютинирующей активности лектинов, определенный при помощи реакции гемагглютинации в серии последовательных 2-кратных разведений с самопроизвольным оседанием 2%-ной суспензии трипсинизированных кроличьих эритроцитов, составил от 128 до 64000 единиц гемагглютинации. При пересчете на белок (удельная активность) титр был равен 500–250 ед./мг белка для суммарной и высокомолекулярной фракций водорастворимых гликопротеинов, и 50–100 ед./мг белка для фракций элюированных с анионообменного носителя при 0.2–0.4M NaCl (Рисунок 95Б).



Водный экстракт (1); гель-фильтрация на Sephadex G-75: высокомолекулярная фракция (2) и низкомолекулярная фракция (3); ионообменная хроматография на Toyopearl CM 650-M: Tris-HCl (4), 0.1–0.2M (5), 0.3–0.4M (6), 0.5M (7) и 2M NaCl (8).

Рисунок 95 – Профили элюции гликопротеинов мицелия *L. edodes* после анионообменной хроматографии. Гемагглютинирующая активность фракций (Б)
(Vetchinkina et al., 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Определение углеводной специфичности лектинов показало, что наиболее высокое сродство они проявили в отношении L-D-меллибиозы, D-лактозы и D-галактозы. Молекулярные массы гликопротеинов фракции 0.1–0.2М NaCl, по данным электрофореза, составляли приблизительно 80, 120 и 140 кДа, а для фракции 0.3–0.4М NaCl гликопротеины имели молекулярные массы в пределах от 30 до 600 кДа (Рисунок 91Б).

Нами был описан алгоритм для транскриптомного профилирования немодельных организмов и проведен анализ транскриптома базидиомицета *L. edodes*. На основе алгоритма мы провели сравнительный анализ транскриптомов вегетативного мицелия и плодовых тел шиитакэ, по результатам которого было выявлено большое количество дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), классифицированных к функциональной категории углеводсвязывающие гликопротеины (лектины) (Рисунок 96). Было отмечено разнообразие

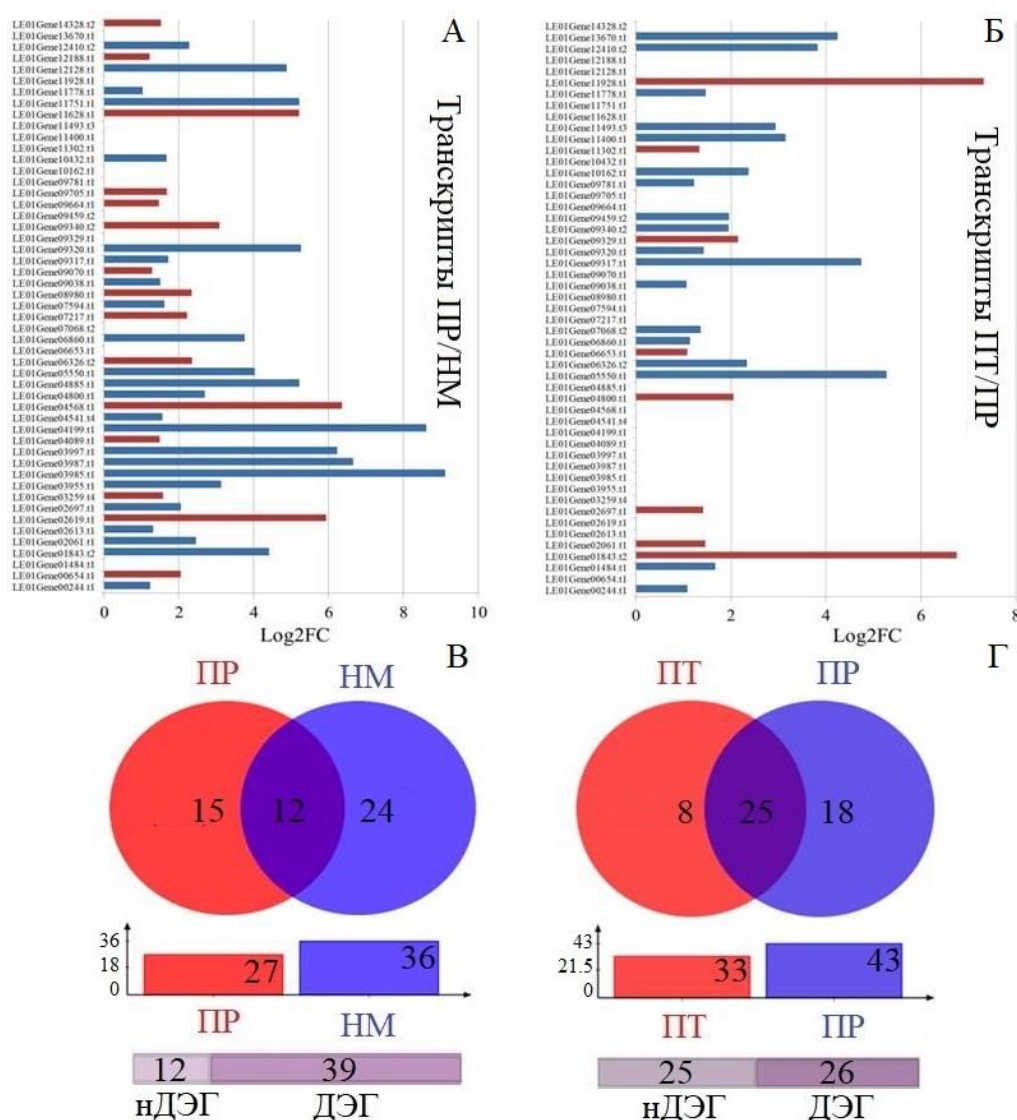


Рисунок 96 – Сравнительный анализ транскриптомов вегетативного мицелия, примордиев и плодовых тел *L. edodes* для выявления ДЭГ в функциональной категории углеводсвязывающие гликопротеины (лектины). ДЭГ (А, Б) и диаграммы Венна (В, Г) примордиев/непигментированного вегетативного мицелия (А, В) и плодового тела/примордиев (Б, Г) (Vetchinkina et al., 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

и высокая экспрессия генов данной категории, как на стадии вегетативного мицелия, так и в плодовых телах *L. edodes*. Непрерывную активность (активацию/репрессию) данной группы генов, кодирующих лектины, можно объяснить разнообразием функций и процессов, находящихся под сферой влияния данных гликопротеинов, что указывает на исключительную важность этих веществ в функционировании клетки и жизнедеятельности организмов.

Лежащий в основе биологической активности лектинов феномен обратимого связывания с углеводами, определяет множество типов биологических реакций: транспорт и накопление углеводов, обеспечение специфичности межмолекулярных и межклеточных взаимодействий, связывание различных биорегуляторов на поверхности клеток, влияние на активность разнообразных ферментов, участие в процессах адгезии при становлении симбиотических отношений (Kocourek and Horejsi, 1983; Laine, 1997; Reuter and Gabius, 1999; Sun *et al.*, 2003; Końska, 2006; Singh *et al.*, 2010). Все это находит отражение в самых разнообразных биологических ответах, происходящих на разных уровнях, от процессов локализованных внутри клетки, до взаимодействия различных организмов и является результатом адаптации микроорганизмов к окружающим условиям.

С другой стороны, лектины в последнее время начинают рассматривать как новые инструменты в диагностике и терапии различных заболеваний, в частности злокачественных опухолей (Vodovozova *et al.*, 2000; Антонова и Юшков, 2004; Чикаловец и др., 2010; Zhao *et al.*, 2014). Поэтому внимание на себя обращают фракции грибных гликопротеинов проявляющие наибольшую способность к подавлению метаболической активности опухолевых клеток, которые помимо цитотоксического действия, обладают и высокой лектиновой активностью. При развитии онкологического заболевания, поверхность опухолевых клеток, претерпевает изменения, происходит малигнизация клеток (приобретение свойств злокачественной опухоли), в первую очередь это связано с перестройкой моносахаридных звеньев входящих в состав гликопротеинов и гликолипидов клеточной поверхности (Васильева и др., 2011). Благодаря способности лектинов узнавать гликозильные лиганды поверхности клетки и избирательно и обратимо связываться с углеводами (Игнатов, 1997), данные гликопротеины могут узнавать измененные (перегликозилированные) поверхности клеток при их трансформации (малигнизации) (Silva *et al.*, 2014; Chernikov *et al.*, 2017). В этом заключается слабость опухолевой клетки: она дает «обнаружить» себя углеводсвязывающим белкам. Уже сейчас на основе углеводсвязывающих белков создаются коммерческие тест-системы некоторых онкопатологий (Silva *et al.*, 2014; Li and King, 2012). Установлено, что лекарственные препараты из некоторых грибов, способны замедлять или останавливать рост опухолей, предотвращать образование метастазов, уменьшать побочные эффекты химио- и радиотерапии (Wasser, 2002; Kodama *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2009). Кроме того, начинают появляться работы, показывающие наличие антиопухолевой активности у растительных и бактериальных лектинов,

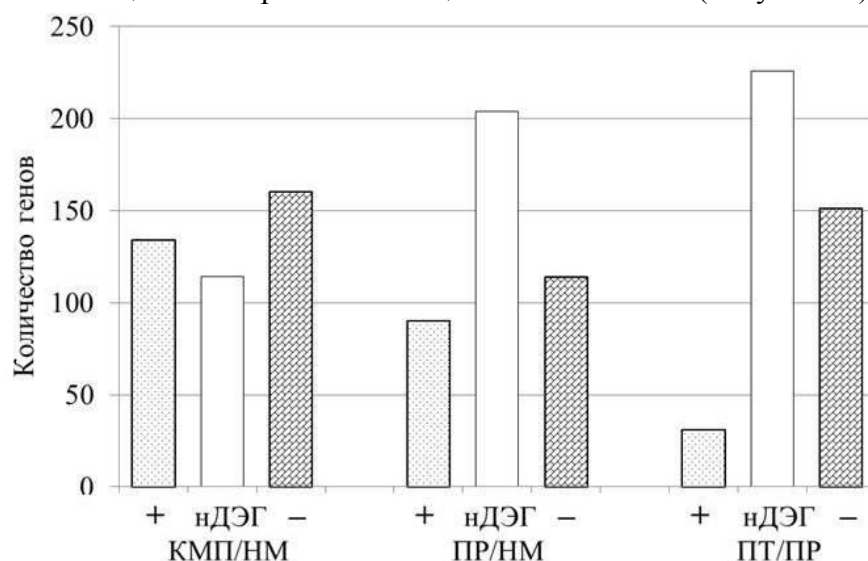
которые при некоторых онкопатологиях могут запускать апоптоз в опухолевых клетках. А также имеют способность к стимуляции в клетках аутофагии, при которой отдельные фрагменты клетки или большая ее часть, подвергается деградации в лизосомах (Vodovozova *et al.*, 2000; Лисяный и др., 2009; Li *et al.*, 2011). Это подводит к необходимости выявления противоопухолевой активности культивируемых лекарственных базидиальных грибов и установления метаболитов, принимающих участие в цитотоксическом действии на раковые клетки. Причастность лектинов к активации широкого спектра защитных реакций на уровне клетки и организма, наличие противоопухолевой, иммуностимулирующей и антивирусной активностей, открывает большой потенциал к применению данных гликопротеинов в диагностике и терапии раковых заболеваний.

6.11 Сравнительный анализ транскриптомов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* для выявления ДЭГ, входящих в функциональную категорию вторичных метаболитов

Лекарственные грибы представляют собой неограниченный источник полисахаридов и полисахарид-белковых соединений с противоопухолевыми и иммуностимулирующими свойствами, что наиболее важно для современной медицины. Некоторые полисахаридные препараты лекарственных макромицетов уже сейчас используются для профилактики и лечения иммунных расстройств, различных типов рака, в том числе после химио- и лучевой терапии, вирусных инфекций, разных видов анемии, синдрома приобретенного иммунодефицита, вируса герпеса, синдрома хронической усталости, для пациентов с хроническим гастритом и язвой желудка; а также для пациентов с деменцией. Препараты из полисахаридов разных видов лекарственных грибов показывают положительные результаты в лечении рака *in vitro* и *in vivo* и используются как новый вид лечения рака, наряду с хирургией, химиотерапией и лучевой терапией. Подобные биологически активные соединения действуют главным образом через стимуляцию иммунной системы организма. В основном грибные лекарственные соединения продемонстрировавшие противораковую активность были представлены β -глюканами или β -глюканами, связанными с различными белками. Стоит отметить, что последние показали большую иммуностимулирующую активность, чем свободные глюканы.

Помимо полисахаридов, грибы производят огромное количество биологически активных белковых соединений, которые могут стимулировать иммунную систему и модулировать специфические клеточные реакции, поэтому могут использоваться в качестве молекулярных мишеней в злокачественных клетках. Огромный терапевтический интерес представляют собой вторичные метаболиты лекарственных грибов, особенно некоторые низкомолекулярные соединения, такие как лактоны, терпеноиды, алкалоиды, лектины, антибиотики и хелатирующие агенты с металлами, которые также важны для иммунной системы организма. Проникая через клеточную мембрану, эти вещества способны модулировать различные внутриклеточные пути, и таким образом могут играть важную роль в лечении рака (Anke, 1989; Wasser, 2014).

Нами был проведен сравнительный анализ разных стадий онтогенеза гриба для характеристики метаболических путей и функциональных категорий, ответственных за синтез и функционирование биологически активных низкомолекулярных соединений, с потенциалом применения в медицине и фармацевтике. Классификация ДЭГ макромицета *L. edodes* на стадиях непигментированного мицелия, коричневой мицелиальной пленки, примордиев и плодовых тел по функциональным категориям была проведена с использованием баз данных KEGG и KOG. С помощью базы данных KOG мы обнаружили, что в непигментированном мицелии по сравнению с коричневой мицелиальной пленкой активируются пути, ответственные за синтез вторичных метаболитов, всего обнаружено 408 генов в данной категории, 160 ДЭГ активируются, 134 ДЭГ находятся в репрессии, 114 генов нДЭГ. В примордиях относительно непигментированного мицелия большинство генов (204 гена) вторичных метаболитов нДЭГ, активируются – 90 ДЭГ, репрессируются – 114 ДЭГ. В плодовых телах в сравнении с примордиями обнаружено наименьшее количество активируемых ДЭГ – 31 ген, большинство в плодовых телах (226) дифференциально не экспрессируются, в репрессии находятся 151 ДЭГ. Таким образом, можно отметить, что наибольшее количество активируемых генов в данной категории находится в непигментированном мицелии и коричневой мицелиальной пленке (Рисунок 97).



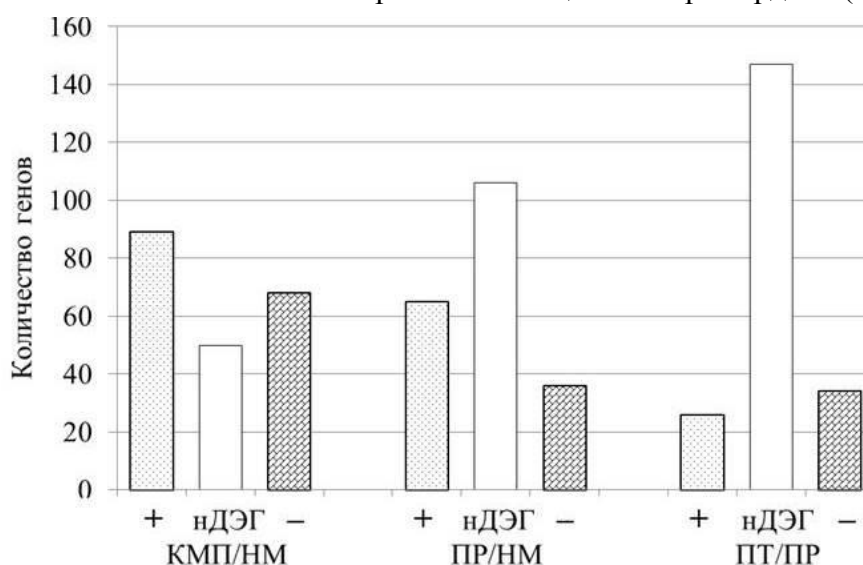
НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии и ПТ – плодовое тело; «+» – активируемые гены, «-» – репрессируемые гены, нДЭГ – дифференциально неэкспрессируемые гены.

Рисунок 97 – Сравнительный анализ транскриптомов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* для выявления ДЭГ, входящих в функциональную категорию биосинтез вторичных метаболитов с использованием базы KOG
(Ветчинкина, 2023 [DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.14](https://doi.org/10.14427/amm.2023.xxv.14))

Помимо функциональной классификации ДЭГ *L. edodes* с применением базы данных KOG, информация была дополнена с помощью ресурса KEGG. Было установлено, что функциональная категория биосинтез вторичных метаболитов представлена 296 генам, из

которых 157 ДЭГ на стадии коричневой мицелиальной пленки относительно непигментированного мицелия, 99 ДЭГ в примордиях относительно непигментированного мицелия и 62 ДЭГ в плодовых телах в сравнении с примордиями. К метаболической группе генов, ответственных за синтез антибиотиков, отнесено в общей сложности 218 генов, наибольшее количество ДЭГ (114) выявлено на стадии мицелиальной пленки, в соотношении примордии/мицелий 75 нДЭГ, в плодовых телах относительно примордиев выявлено 49 ДЭГ.

С помощью информации базы данных KEGG в функциональной категории биосинтез вторичных метаболитов было обнаружено 207 аннотированных генов. Наибольшее количество ДЭГ было представлено в паре сравнения мицелиальная пленка/мицелий, из них 89 активируемых и 68 репрессируемых генов, 50 нДЭГ. В примордиях относительно мицелия количество нДЭГ увеличивается вдвое до 106 генов, активируемых – 65 репрессируемых генов – 36. В базидиомах (плодовое тело/примордий) большинство генов (147) нДЭГ, обнаружено в плодовых телах 26 активируемых и 34 репрессируемых генов. Наибольшее количество активных генов, ответственных за синтез вторичных метаболитов представленных в базе данных KEGG находится в коричневой мицелиальной пленке, также высокое содержание активируемых генов отмечено в непигментированном мицелии и примордиях (Рисунок 98).

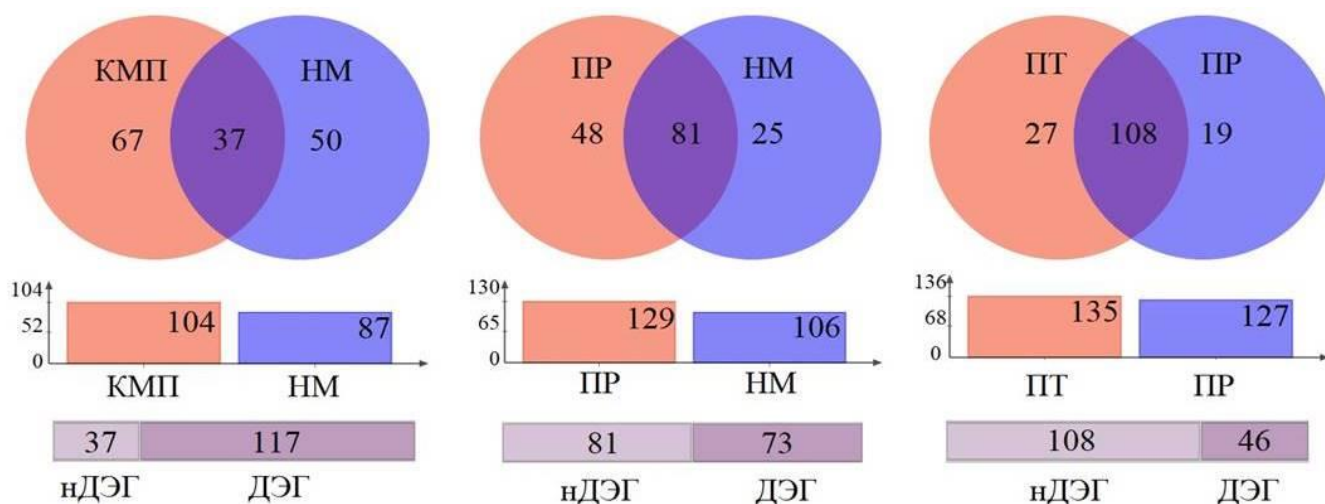


НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии и ПТ – плодовое тело; «+» – активируемые гены, «-» – репрессируемые гены, нДЭГ – дифференциально неэкспрессирующиеся гены.

Рисунок 98 – Сравнительный анализ транскриптомов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* для выявления ДЭГ, входящих в функциональную категорию биосинтез вторичных метаболитов с использованием базы KEGG (Ветчинкина, 2023 [DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.14](https://doi.org/10.14427/amm.2023.xxv.14))

Классификация категорий генов ответственных за синтез антибиотиков, представленных в базе данных KEGG, выявила 154 гена на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* в данном метаболическом пути. Было установлено, что соотношение ДЭГ/нДЭГ при сравнении

коричневой мицелиальной пленки относительно непигментированного мицелия составляет 117/37, активируемых генов – 67, репрессируемых – 50 генов. При сравнении примордиев и непигментированного мицелия количество нДЭГ (81) превышает ДЭГ (73), из них активируемых – 48 генов, репрессируемых – 25 генов. В плодовых телах относительно примордий обнаружено 27 активируемых и 19 репрессируемых генов, соотношение ДЭГ/нДЭГ составляет 46/108, наблюдается большое количество генов с одинаковой экспрессией, что говорит о схожести этих морфоструктур в отношении синтеза антибиотиков, наибольшая активность генов в данной функциональной категории отмечена на стадии коричневой мицелиальной пленки (Рисунок 99).



НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии и ПТ – плодовое тело; «+» – активируемые гены, «-» – репрессируемые гены, нДЭГ – дифференциально неэкспрессирующиеся гены.

Рисунок 99 – Сравнительный анализ транскриптомов (представленный в диаграммах Венна) на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* для выявления ДЭГ, входящих в функциональную категорию биосинтез антибиотиков с использованием базы данных KEGG (Ветчинкина, 2023 [DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.14](https://doi.org/10.14427/amm.2023.xxv.14))

В мицелии и базидиомах лекарственных макромицетов содержится большое количество фенолоксиляющих ферментов, таких как лакказы и различные пероксидазы. Было показано, что ферментная терапия играет важную роль в лечении рака, предотвращая окислительный стресс и подавляя рост клеток (Wasser, 2010; 2014). Сравнительный анализ транскриптомов и характеристика ДЭГ фенолоксиляющих ферментов показал наличие активацию/репрессию генов данной функциональной категории на всех стадиях онтогенеза *L. edodes*. В коричневой мицелиальной пленке обнаружено 12 активируемых и 9 репрессируемых генов, в примордиях – 7 активируемых и 9 репрессируемых генов относительно непигментированного мицелия. В плодовых телах по сравнению с примордиями 4 – активируемых и 7 репрессируемых генов. Соотношение ДЭГ/нДЭГ в коричневой мицелиальной пленке и примордиях относительно непигментированного мицелия и в плодовых телах относительно примордиев составило 21/17, 16/22 и 11/27, соответственно (Рисунок 57).

Наряду с другими вторичными грибными метаболитами, показано что, меланиновые пигменты обладают противовоспалительной, высокой антиоксидантной и антирадикальной активностью, оказывают иммуномодулирующее, фотопротекторное и антимуtagenное действие (Marcovici *et al.*, 2022). Нами были обнаружены ДЭГ в категории меланогенез, наибольшее количество активированных ДЭГ наблюдается в КМП по отношению к НМ. В ПР также большинство генов данной категории было активировано, в ПТ по отношению к ПР активированных ДЭГ не наблюдалось, часть генов находилась в репрессии, большинство же генов меланогенеза дифференциально не экспрессировалось.

6.12 Сравнительный анализ цитотоксичности гликопротеинов коричневой мицелиальной пленки и непигментированного мицелия *L. edodes*

Исходя из данных, полученных при сравнительном анализе транскриптомов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* для выявления ДЭГ вторичных метаболитов (антибиотиков, лектинов, фенолоксидах, пигментов), становится очевидным, что коричневая мицелиальная пленка базидиомицета *L. edodes* совсем не уступает по данным показателям вегетативный непигментированный мицелий. Мы провели исследование по сравнению цитотоксической активности на ряд раковых клеточных линий экстрактов из коричневой мицелиальной пленки и непигментированного мицелия базидиомицета. Результаты представлены на рисунке 100.

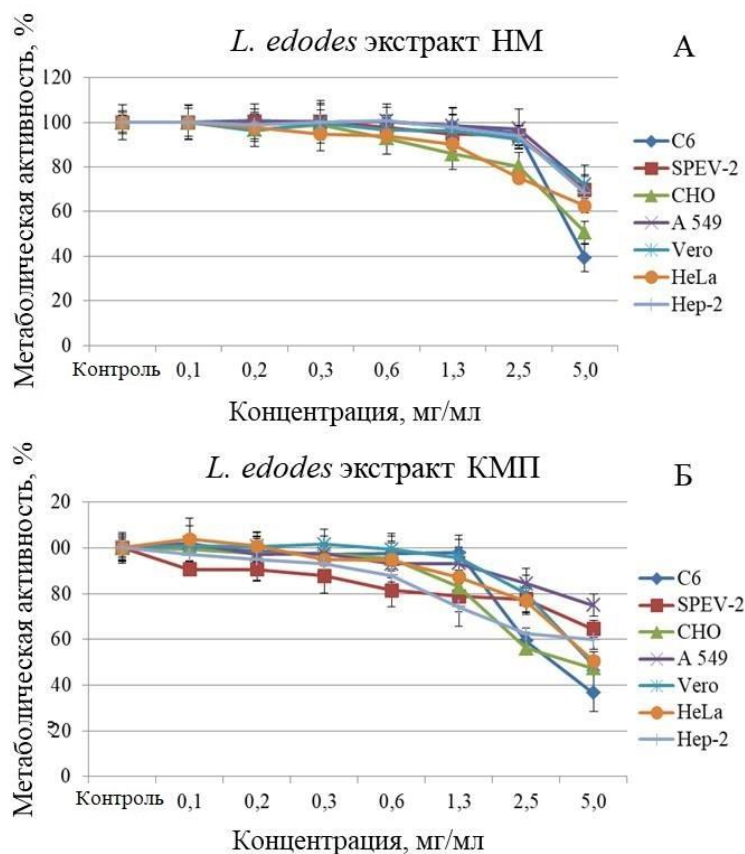


Рисунок 100 – Цитотоксичность гликопротеиновых экстрактов непигментированного мицелия (НМ) (А) и коричневой мицелиальной пленки (КМП) (Б) базидиомицета *L. edodes* по отношению к опухолевым клеточным линиям А549, HeLa, Hep-2, SPEV-2 и C6

Полученные данные подтверждают наше предположение, метаболиты данной морфоструктуры по цитотоксической активности по отношению к опухолевым клеточным линиям не уступают, а в отдельных случаях даже немного превосходят ингибирующее действие гликопротеинового экстракта непигментированного мицелия. При концентрации 5 мг/мл белковый экстракт коричневой мицелиальной пленки ингибировал дыхательную активность клеток глиомы C6 на 70%, клеточных линий HeLa, Hep-2, SPEV-2 и A549 на 60%, 50%, 40% и 30%, соответственно (Рисунок 100).

Современные фармацевтические тенденции в профилактике и терапии различных заболеваний включают разработку новых диагностических тест-систем и лекарств на основе вторичных грибных метаболитов. Успех применения данных препаратов требуют всестороннего изучения низкомолекулярных соединений, продуцируемых лекарственными грибами.

6.13 Сравнительный анализ цитотоксичности гликопротеинов вегетативного мицелия и плодовых тел *G. lucidum*

В качестве сырья для получения биологически активных веществ, в том числе и с противоопухолевым действием, используют, как правило, плодовые тела макромицетов, и гораздо реже вегетативный мицелий. Мы провели сравнительное исследование на ряде раковых клеток по выявлению уровня цитотоксической активности гликопротеиновых фракций из вегетативного мицелия и плодовых тел лекарственного трутовика *G. lucidum*.

Было установлено, что гликопротеины плодового тела трутовика лакированного ингибируют метаболическую активность глиомы крысы (C6) на 40% в диапазоне концентраций от 0.5 до 8 мг/мл и на 70% при концентрации 16 мг/мл (Рисунок 101А). В то время как гликопротеины мицелия гриба проявляли гораздо большую цитотоксичность, угнетая дыхательную активность той же клеточной линии на 90% при концентрации 0.5–16 мг/мл. При малых концентрациях (0.25 мг/мл) грибных препаратов из вегетативного мицелия и плодовых тел, их цитотоксическая активность была сопоставима и составляла 30% (Рисунок 101А). По отношению к легочной аденокарциноме (A549) цитотоксическая активность обоих препаратов была более сопоставима. Существенных отличий при концентрациях от 0.25 до 2 мг/мл обнаружено не было, отмечено угнетение метаболической активности в обоих случаях на 20–40% (Рисунок 101Б). При увеличении концентрации 4 и 8 мг/мл цитотоксическая активность гликопротеинов плодовых тел возрастала больше (на 60–70%), чем гликопротеинов вегетативного мицелия (на 40–50%), при дальнейшем увеличении концентрации (16 мг/мл) степень ингибирования метаболической активности клеток A549 выравнивался и составлял 85% (Рисунок 101Б). Суммарные фракции водорастворимых гликопротеинов, как плодовых тел, так и вегетативного мицелия, обладали одинаковой цитотоксической активностью по отношению к клеточной линии Hep-2 в диапазоне концентраций от 0.25 до 8 мг/мл, которая

составляла от 10% до 70%, соответственно. Только при концентрации в 16 мг/мл гликопротеины из вегетативного мицелия полностью угнетали метаболизм клеток эпидермоидной карциномы гортани, а активность гликопротеинов плодового тела была на уровне 80% (Рисунок 101В). Также и в отношении клеток почки эмбриона свиньи, зараженных онковирусом (SPEV-2), при небольших концентрациях (0.25–1 мг/мл) обе гликопротеиновые фракции проявляли сходный цитотоксический эффект на уровне 10% (Рисунок 101Г).

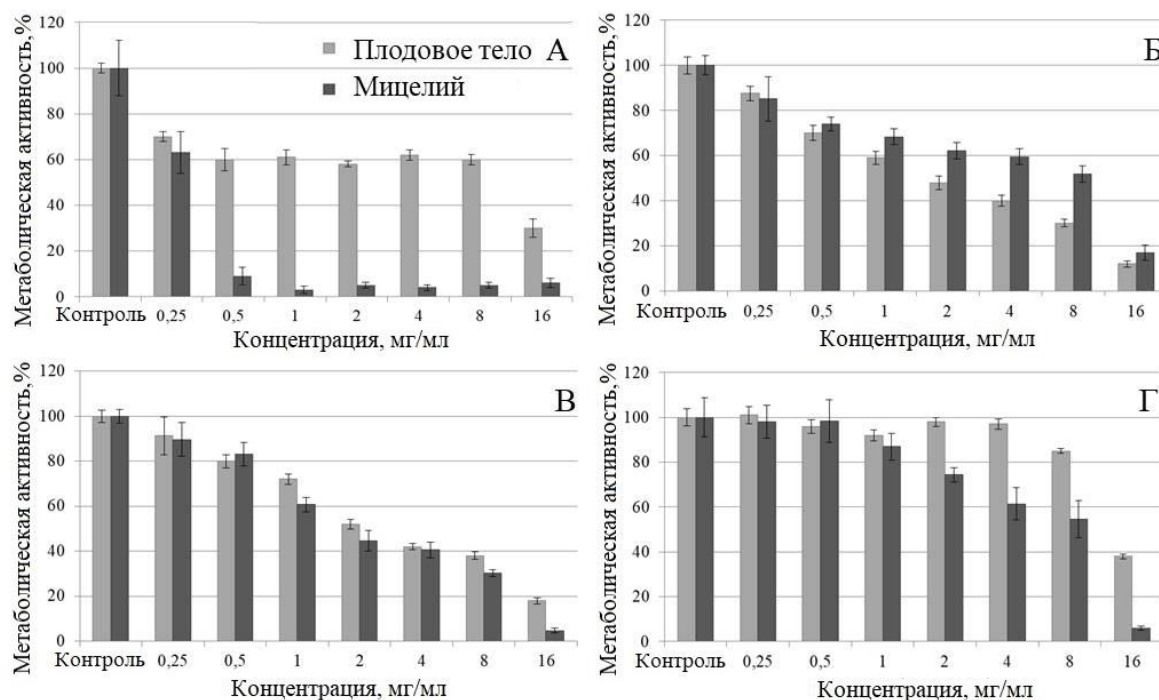


Рисунок 101 – Цитотоксичность фракций водорастворимых гликопротеинов мицелия и плодовых тел *G. lucidum* по отношению к опухолевым клеточным линиям С6 (А), А549 (Б), Нер-2 (В) и SPEV-2 (Г)
(Vetchinkina et al., 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

Однако при увеличении концентрации (2–8 мг/мл) гликопротеины вегетативного мицелия подавляли дыхательную активность клеток на 30–50%, полностью подавляя ее при дальнейшем увеличении концентрации (16 мг/мл). В то время как цитотоксичность гликопротеинов плодового тела при 2–8 мг/мл составляла не более 10%, а при 16 мг/мл жизнеспособность теряли 60% раковых клеток SPEV-2 (Рисунок 101Г).

6.14 Сравнительный анализ цитотоксичности гликопротеинов и полисахаридов вегетативного мицелия и плодовых тел *L. edodes*

Поскольку в качестве ценного сырья для получения высокоэффективных противоопухолевых веществ, как уже было отмечено, используют в основном полисахаридные фракции плодовых тел макромицетов, для сравнения с вегетативным мицелием на примере опухоли мозга С6 была исследована цитотоксичность фракций гликопротеинов и полисахаридов плодовых тел базидиомицета *L. edodes*. Полисахаридные фракции из

вегетативного мицелия и плодовых тел базидиомицета метаболическую активность клеток глиомы крысы практически не снижали, при концентрации от 0.5 до 8 мг/мл цитотоксический эффект препаратов был на уровне 5–10% (Рисунок 102Б).

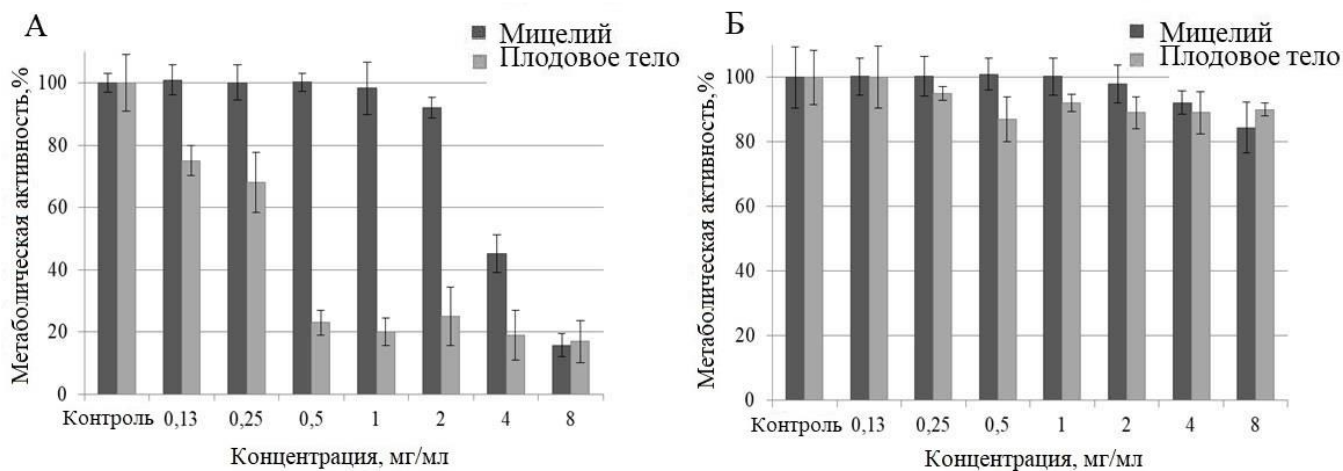


Рисунок 102 – Цитотоксичность фракций водорастворимых гликопротеинов (А) и полисахаридов (Б) мицелия и плодовых тел базидиомицета *L. edodes* по отношению к опухолевой клеточной линии С6 (глиома крысы) (Vetchinkina *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.059>)

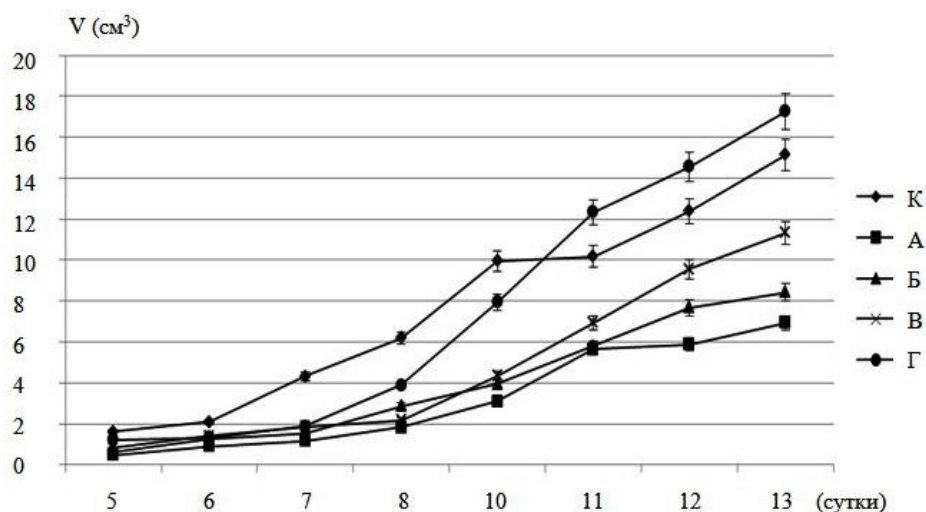
Суммарные фракции гликопротеинов, как плодовых тел так и вегетативного мицелия, обладали достоверной цитотоксической активностью по отношению к клеточной линии С6. При небольших концентрациях (0.13–2 мг/мл) более выраженный цитотоксический эффект проявляли гликопротеины плодового тела, однако при увеличении концентрации белка (4 мг/мл) гликопротеины мицелия подавляли дыхательную активность клеток глиомы крысы более чем на 50% и при дальнейшем увеличении концентрации (8 мг/мл) цитотоксичность обеих белковых фракций, и вегетативного мицелия и плодовых тел, выравнивалась, в результате чего жизнеспособность теряли 80% раковых клеток С6 (Рисунок 102А).

6.15 Изменение объема и массы опухоли рака почки (РА) под действием гликопротеинов глубинного мицелия и плодовых тел базидиомицетов

В качестве объектов исследования, для получения противоопухолевых веществ, как правило, служат плодовые тела грибов, хотя, очевидно, что более перспективным является получение мицелия при глубинном культивировании, что позволяет существенно сократить длительность процесса. Кроме того, состав глубинного мицелия по всем важнейшим показателям, в том числе и по содержанию биологически активных веществ, качественно превосходит состав плодовых тел грибов (Wasser and Weis, 1999; Wasser, 2002). Отмечено также, что водорастворимая фракция мицелия некоторых базидиомицетов обладает выраженной противоопухолевой активностью (Бабицкая и др., 2003; Щерба и Бабицкая, 2008).

Исследовали противоопухолевую активность суммарной фракции водорастворимых

гликопротеинов из глубинного вегетативного мицелия базидиомицетов *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, а также, для сравнения, плодовые тела трутовика лакированного. После перевивки животным опухоли рака почки (РА) начиная с 6 дня, отмечали задержку роста объема опухоли в опытных группах под влиянием суммарной фракции водорастворимых гликопротеинов из вегетативного глубинного мицелия грибов *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* (Рисунок 103). Гликопротеиновая фракция из плодовых тел трутовика лакированного (опытная группа Г) оказывала подавляющее действие на рост опухоли в первые 10 суток после начала эксперимента, однако в дальнейшем объем опухоли увеличивался до показаний контрольной группы. Объем опухоли рака почки (РА) на 14 сутки после перевивки достоверно различался, по сравнению с контрольной группой, и был в 3 раза меньше чем в опытной группе крыс (А), получавшей суммарную фракцию гликопротеинов шиитакэ, при этом индекс торможения роста опухоли (ИТРО) был 59%, и в 2 раза меньше в группах Б и В, животные в которых получали фракцию гликопротеинов из вегетативного мицелия майтаке и трутовика лакированного (Рисунок 104А).

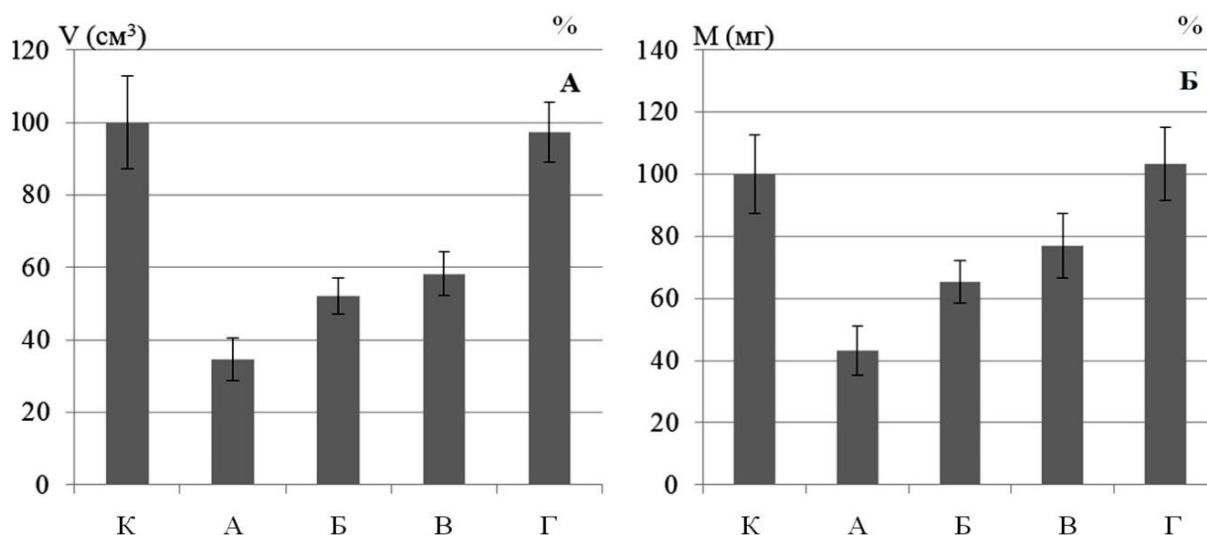


К – группа крыс, получающих физ. раствор (контрольная группа); группа крыс, получающих фракцию водорастворимых гликопротеинов из глубинного мицелия:

А – *L. edodes*, Б – *G. frondosa*, В – *G. lucidum* и Г – из плодовых тел *G. lucidum*

Рисунок 103 – Рост объема опухоли рака почки (РА) (см³) под действием суммарной фракции водорастворимых гликопротеинов базидиомицетов
(Vetchinkina et al., 2016 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i11.10>)

Так же и масса опухоли, благодаря воздействию суммарной фракции водорастворимых гликопротеинов из вегетативного мицелия *L. edodes*, практически не увеличивалась и была на момент окончания эксперимента более чем в 2 раза меньше по сравнению с контролем (Рисунок 104Б). В группах Б и В также была отмечена положительная тенденция. Водные экстракты из плодовых тел *G. lucidum* (группа Г) не дали подобного положительного эффекта; данные по объему и массе опухоли по завершении эксперимента в этом случае были сопоставимы с контрольными значениями (Рисунок 104А, Б).



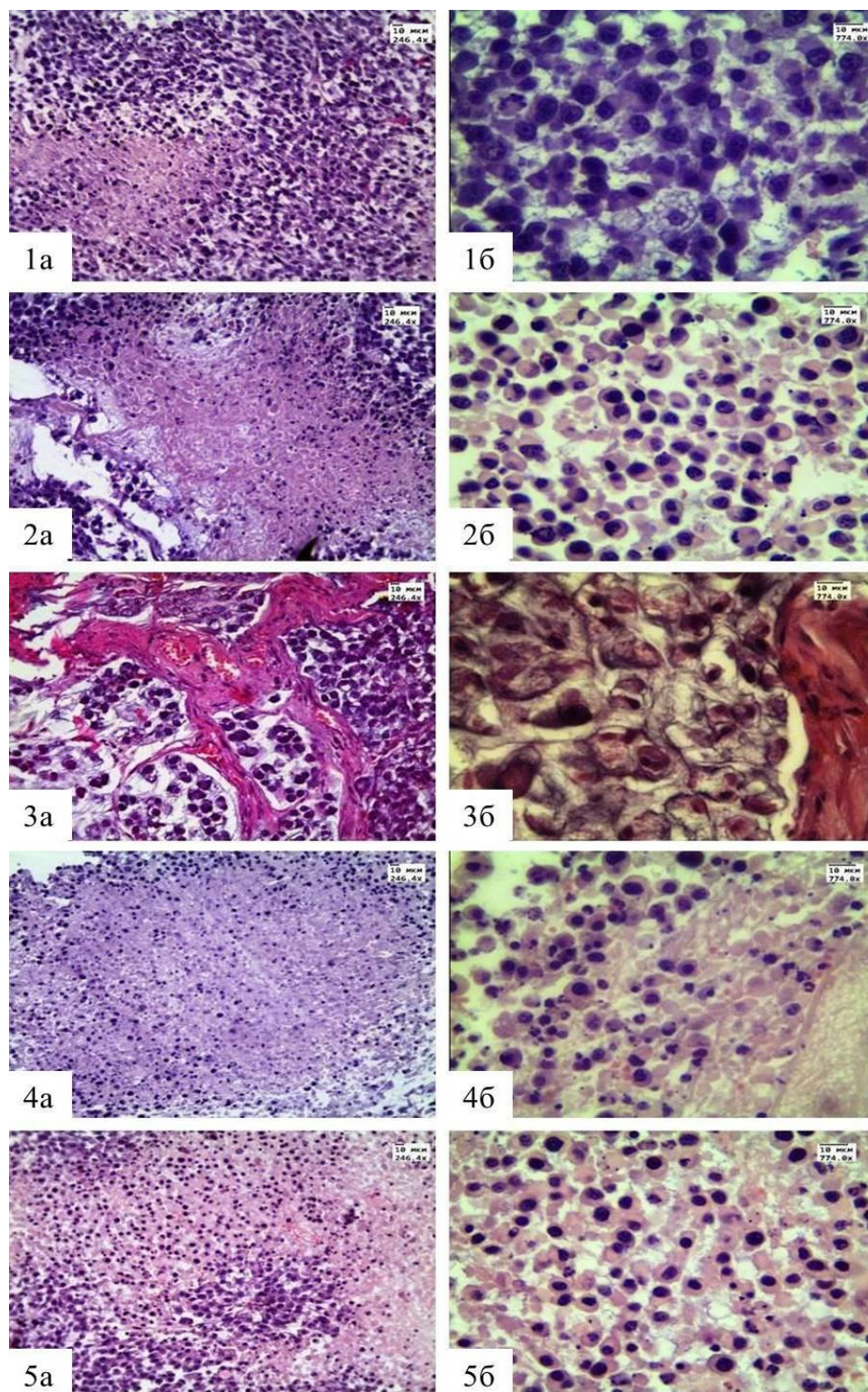
К – группа крыс, получающих физ. раствор (контрольная группа); группа крыс, получающих фракцию водорастворимых гликопротеинов из глубинного мицелия: А – *L. edodes*, Б – *G. frondosa*, В – *G. lucidum* и Г – из плодовых тел *G. lucidum*

Рисунок 104 – Изменение объема (А) и массы (Б) опухоли рака почки (РА) под действием суммарной фракции водорастворимых гликопротеинов грибов (Vetchinkina et al., 2016 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i11.10>)

Таким образом, в результате проведенных экспериментов по измерению объема и массы перевитого рака почки (РА), было установлено, что под действием фракций гликопротеинов из вегетативного мицелия всех трех видов базидиомицетов, в наибольшей степени у *L. edodes* и немного меньшее у *G. frondosa* и *G. lucidum*, у животных отмечали выраженное замедление темпов роста опухоли в 2–3 раза по сравнению с животными без воздействия, что может быть вызвано цитостатическим эффектом или активацией апоптоза в опухолевых клетках.

6.16 Гистологические исследования опухолевых тканей рака почки (РА) под действием гликопротеинов глубинного мицелия и плодовых тел базидиомицетов

Данные по гистологическим исследованиям опухолевых тканей рака почки (РА) показали, что в контрольной группе опухоль представлена комплексом полиморфных клеток, которые располагались в виде отдельных островков, разделенных прослойками рыхлой отечной соединительной ткани. Опухолевые клетки существенно отличались выраженным полиморфизмом, формой и размерами. Встречались полигональные, веретеновидные, овальные и округлые клетки, среди которых много клеточных элементов, напоминающих по строению атипичные фибробласты. Форма и размеры ядер варьировали в зависимости от размеров опухолевых клеток. Большинство ядер крупные, занимали большую часть клетки. Хроматин располагался в виде нежной сетки. Цитоплазма опухолевых клеток отличалась резко выраженной базофилией. В строме опухоли и по границе с опухолью много новообразованных кровеносных сосудов типа капилляров. Среди отечной соединительной ткани много лимфоидных клеток.



1 – группа крыс, получавших физ. раствор (контрольная группа); группа крыс, получавших суммарную фракцию водорастворимых гликопротеинов из глубинного мицелия (после 10 дневного перорального введения); 2 – *L. edodes*, 3 – *G. frondosa*, 4 – *G. lucidum* и 5 – из плодовых тел *G. lucidum*. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: а – 246.4 $\times$, б – 774.0 $\times$. Масштаб – 10 мкм

Рисунок 105 – Изменение опухолевых клеток рака почки (РА) под действием суммарной фракции водорастворимых гликопротеинов базидиомицетов
(Vetchinkina *et al.*, 2016 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i11.10>)

Опухоль была окружена широкой зоной плотной фиброзной ткани, ближе к опухоли по типу грануляционной, в которой также много лимфоидных клеток. Некрозы составляли 10–20% от площади среза, митозы до 3% (Рисунок 105: 1а, 1б). У группы животных, получавших суммарную фракцию водорастворимых гликопротеинов из глубинного вегетативного мицелия гриба *L. edodes*, капсула опухоли оставалась неизменной, опухолевые клетки с дистрофическими изменениями, лежали в основном отдельно друг от друга, а неизменные опухолевые клетки представлены только под капсулой опухоли. Наблюдалась инфильтрация опухолевой ткани лимфоцитами, нейтрофилами, возможно, это происходит за счет активации иммунной системы. В некоторых случаях определялся отек в ткани опухоли и полнокровие сосудов, встречались опухолевые клетки с единичными митозами, а также с косвенными признаками апоптоза (пикнотичные ядра) (Рисунок 105: 2а, 2б). Некрозы в опухоли составляли от 50 до 80% от площади срезов микропрепаратов. 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 2.5 раза, что свидетельствует о цитостатическом эффекте или возможной гибели опухолевых клеток преимущественно путем апоптоза.

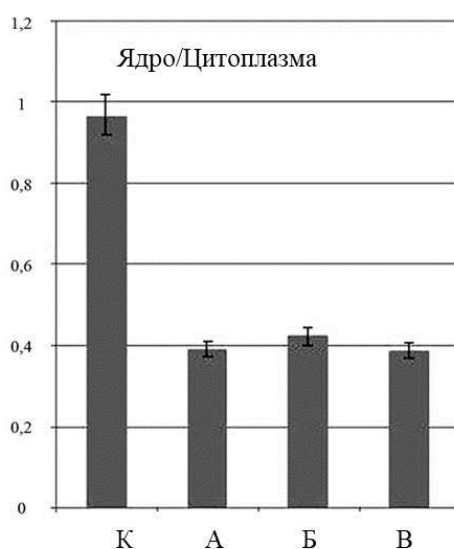
Фракция водорастворимых гликопротеинов из глубинного мицелия *G. frondosa* оказывала воздействие на опухолевые клетки аналогично действию водорастворимых гликопротеинов шиитаке, но соединительнотканые перегородки не были утолщены, и наблюдалась более выраженная инфильтрация опухоли лимфоцитами, что может говорить об активации иммунной системы под действием гликопротеинов из данной грибной культуры (Рисунок 105: 3а, 3б).

В опытной группе, где животные получали суммарную фракцию водорастворимых гликопротеинов из вегетативного мицелия *G. lucidum*, капсула опухоли оставалась неизменной, некрозы в опухоли составляли от 50 до 90% площади микропрепаратов, опухолевые клетки с дистрофическими изменениями, отмечали признаки апоптоза в опухолевых клетках (фрагментация ядра, при сохраненной цитоплазме). Неизменные опухолевые клетки оставались только под капсулой опухоли, среди них были отмечены единичные митозы (Рисунок 105: 4а, 4б). Кроме того, гликопротеины *G. lucidum* стимулировали иммунную систему животных.

Фракция гликопротеинов плодовых тел *G. lucidum* проявляла небольшой цитотоксический эффект на клетки опухоли, по сравнению с фракциями вегетативного мицелия, некрозы в опухоли составляли от 30 до 50% площади препаратов. Опухолевые клетки с дистрофическими изменениями, местами неизменные были расположены ближе к капсуле, митозы единичные. Капсула опухоли фиброзная, утолщенная, полнокровная, слабо инфильтрирована единичными нейтрофилами, лимфоцитами (Рисунок 105: 5а, 5б). Однако, несмотря на то, что гликопротеины плодовых тел обладали умеренным цитотоксическим эффектом и вызывали миграцию клеток иммунной системы в опухолевую ткань, это не повлияло на темпы роста опухоли, масса и объем которой, по окончании опыта, была сопоставима с группой без воздействия (Рисунок 105: 1а, 1б).

6.17 Исследование морфометрии опухолевых клеток с применением автоматизированной микроскопической системы «Ariol»

Исследование морфометрии опухолевых клеток с применением автоматизированной микроскопической системы Ariol показало, что ядерно-цитоплазматическое соотношение в тканях опухоли группы сравнения было высоким, что является характерным признаком злокачественного новообразования (Рисунок 106А). В опухолевых тканях экспериментальных групп животных, которым вводили фракции водорастворимых гликопротеинов из вегетативного мицелия базидиомицетов, выявлено значительное уменьшение ядерно-цитоплазматического соотношения, по сравнению с группой животных без воздействия, за счет уменьшения площади ядер в опухолевых клетках и увеличения площади цитоплазмы (Рисунок 106Б, В). Данный эффект является признаком лечебного воздействия препаратов из грибов на опухолевые клетки.



К – группа крыс, получавших физ. раствор (контрольная группа); группа крыс, получавших суммарную фракцию водорастворимых гликопротеинов из вегетативного мицелия (после 10 дневного перорального введения): А – *L. edodes*, Б – *G. frondosa*, В – *G. lucidum*

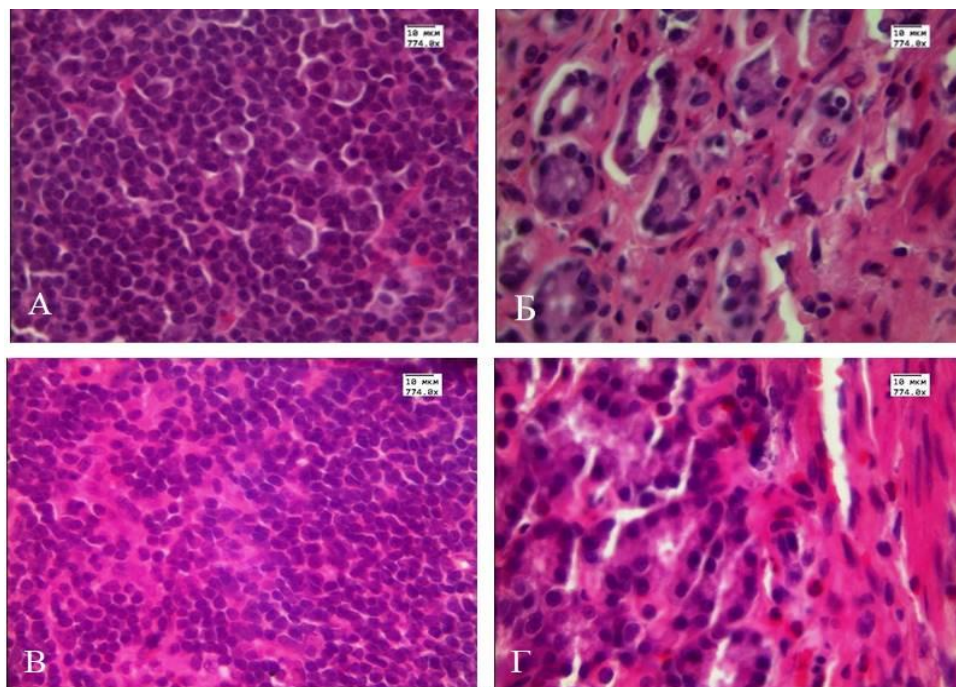
Рисунок 106 – Ядерно-цитоплазматического соотношения в опухолевых клетках экспериментальных животных, подсчитаное с применением автоматизированной микроскопической системы Ariol SL50

(Ветчинкина, 2015 [DOI: 10.14427/amm.2015.xiv.09](https://doi.org/10.14427/amm.2015.xiv.09))

6.18 Изучение действия гликопротеиновых фракций глубинного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* на иммунную и пищеварительную системы животных *in vivo*

Также нами были проведены морфологические и морфометрические исследования, направленные на изучение влияния гликопротеиновых фракций вегетативного мицелия лекарственных базидиомицетов *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa* и на иммунную и пищеварительную системы лабораторных животных с использованием методов гистологического окрашивания. При исследовании тканей мезентериальных лимфатических узлов были выявлены изменения, указывающие на активацию иммунной системы животных.

При воздействии препаратов гликопротеинов грибов, получаемых животными, в тканях лимфатических узлов была отмечена гиперплазия лимфоидной ткани, поверхностное увеличение светлых зон (зародышевых центров) и макрофагальный ответ (Рисунок 107А, В).

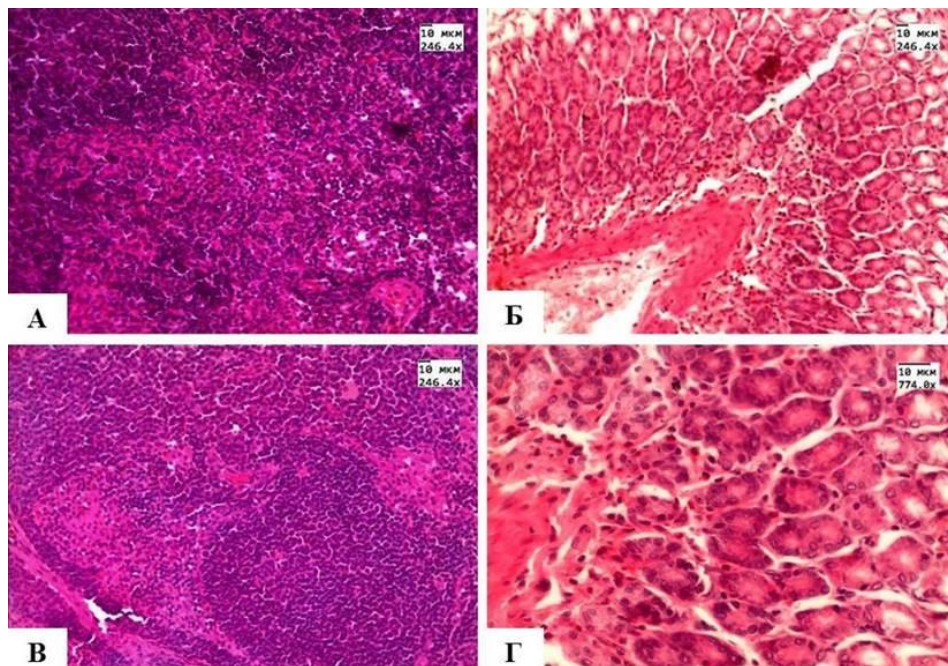


Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: 774.0×. Масштаб – 10 мкм

Рисунок 107 – Макрофагальная реакция в мезентеральном лимфатическом узле (А, В) и слизистая желудка с сохранным и не измененным эпителием в железах (Б, Г) при воздействии суммарной фракции водорастворимых гликопротеинов из глубинного мицелля *L. edodes* (А, Б) и *G. frondosa* (В, Г)
(Vetchinkina *et al.*, 2016 <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i11.10>)

Гистологические исследования слизистой и подслизистой слоев желудка лабораторных крыс показали, что архитектура желудочных желез не изменена, железы расположены плотно, между мышечной тканью и слизистой оболочкой наблюдали лимфоцитарную и эозинофильную инфильтрацию (Рисунок 107Б, Г). В целом исследования не выявили различий по сравнению с контрольной группой, не получавших лечение грибными препаратами, что свидетельствует об отсутствии токсического действия гликопротеиновых фракций *L. edodes* и *G. frondosa* на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта животных при пероральном введении.

В отношении *G. lucidum*, как для гликопротеинов глубинного мицелля, так и для водорастворимой фракции плодовых тел, наблюдался тот же эффект, но менее выраженный, чем у других видов (Рисунок 108). Одно из главных достоинств водорастворимых фракций данных базидиомицетов заключается в отсутствии токсичности на здоровые клетки организма, при этом они способны оказывать стимулирующее действие на различные звенья иммунитета и корректировать патологические состояния, связанные с нарушением функций иммунной системы, приводя их к норме. (Akramiene *et al.*, 2007; Israilides *et al.*, 2008; Goodridge *et al.*, 2009).



Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: 246.4× и 774.0×. Масштаб – 10 мкм

Рисунок 108 – Макрофагальная реакция в мезентеральном лимфатическом узле (А, В) и слизистая желудка с сохранным и не измененным эпителием в железах (Б, Г) при воздействии фракций гликопротеинов из глубинного мицелля (А, Б) и плодовых тел (В, Г) *G. lucidum*

При проведении исследования все группы показали активирующее влияние на лимфатическую систему: увеличение светлых центров, гиперплазия лимфоидной ткани и развитие макрофагальной реакции. Отмечено нормальное морфологическое строение желудка, при пероральном введении фракций гликопротеинов грибов, что говорит об отсутствии патологического влияния на слизистую желудочно-кишечного тракта. Следовательно, данный путь может быть рекомендован при дальнейших исследованиях грибных препаратов.

Таким образом, выявлено достоверное снижение метаболической активности раковых клеточных линий млекопитающих: А549, Нер-2, HeLa, SPEV-2 и С6 под действием водорастворимых гликопротеинов из вегетативного мицелля *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*. Цитотоксическое действие белковых фракций не уступало по эффективности полисахаридам вегетативного мицелля. Установлено что разные грибные фракции по-разному действовали на тот или иной вид опухоли. По мере разделения и очистки гликопротеинов, цитотоксическое действие препаратов на опухолевые клетки усиливалось, были обнаружены белковые фракции, обладающие наибольшей токсичностью, и дана оценка их эффективных концентраций при воздействии на опухолевые клеточные линии. Наибольшую цитотоксичность проявляли высокомолекулярная белковая фракция *G. frondosa*, ингибируя на 90–100% метаболическую активность всех раковых клеточных линий при концентрации 0.4 мг/мл, общая гликопротеиновая фракция и высокомолекулярная фракция трутовика *G. lucidum*, которые на 100% подавляли рост клеток головного мозга С6 при концентрации 0.25 мг/мл и на 60% при

0.03 мг/мл, соответственно. Стоит указать, что при данных концентрациях гликопротеинов (в двух последних случаях) подавления активности не раковой линии СНО-К1, взятой в качестве контроля, отмечено не было. Наибольшей способностью к подавлению активности гликопротеиновые фракции *L. edodes* обладали в отношении клеток опухоли мозга, легочной аденокарциномы и онковируса. Сравнительные исследования показали, что гликопротеины мицелия не уступают по цитотоксической активности гликопротеинам плодовых тел, а также водорастворимым полисахаридам и в некоторых случаях, особенно в отношении линии С6, значительно их превосходят. Метаболиты мицелиальной пленки проявляли цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам, не уступая, а в отдельных случаях превосходя ингибирующее действие гликопротеинового экстракта непигментированного мицелия.

Во фракциях гликопротеинов, способных значительно снижать метаболическую активность клеточных линий, отмечено наличие лектинов, обладающих высокой активностью и специфичных в отношении L-D-меллибиозы, D-лактозы и D-галактозы. Сравнительная характеристика транскриптов вегетативного мицелия, примордиев и плодовых тел *L. edodes*, выявила активацию экспрессии большого количества генов, относящихся к функциональной категории углеводсвязывающие гликопротеины (лектины), что говорит о наличии лектинов, характерных для каждой конкретной стадии морфогенеза гриба. Это представляет интерес, учитывая, что лектины начинают рассматривать как новые инструменты в диагностике и терапии злокачественных опухолей, и может быть предметом для их применения.

При гистологических исследованиях обнаружено развитие дистрофических изменений клеток рака почки, перевитой крысам *in vivo*, и некротических процессов в опухоли под действием грибных препаратов, что говорит о цитотоксическом эффекте. Отмечена активация иммунной системы животных, выражающаяся в положительном влиянии на лимфатическую систему, а также отсутствие токсического действия на слизистую желудочно-кишечного тракта при пероральном введении грибного экстракта. Следовательно, данный путь может быть рекомендован при применении биологически активных грибных препаратов.

Стоит отметить, что глубинное культивирование мицелия базидиомицетов, по сравнению с другими методами, например, выращиванием плодовых тел, представляет собой наиболее целесообразный способ получения активных грибных метаболитов. Поскольку проводится в строго контролируемых стерильных условиях, обеспечивающих стабильность и воспроизводимость химического состава продукции, а также имеет преимущества в плане экономических затрат, сроков культивирования и трудоемкости биотехнологического процесса.

Полученные данные по противоопухолевой активности гликопротеинов из вегетативного мицелия *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, в сочетании с активацией иммунной системы и отсутствием токсического воздействия, может служить основанием для разработки на их основе средств, перспективных в комплексной терапии онкологических заболеваний.

ГЛАВА 7. БИОЛОГИЧЕСКИЙ «ЗЕЛЕНый» СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА, СЕРЕБРА И СЕЛЕНА ПОЧВЕННЫМИ И КСИЛОТРОФНЫМИ БАЗИДИОМИЦЕТАМИ

Наночастицы находят самое разнообразное применение в медицине, биологии и технологии, и в последнее время область их использования расширяется все больше. Золотые наночастицы используются в оптико-электронике, катализе и биомедицине (Dreaden *et al.*, 2012; Dykman and Khlebtsov, 2012; Austin *et al.*, 2014). Наночастицы серебра благодаря своим особым свойствам эффективны для применения в катализе химических реакций, в качестве биомаркеров, для получения антистатических, биосенсорных, криогенных сверхпроводящих материалов, косметической продукции, электронике (Sharma *et al.*, 2009; Gade *et al.*, 2010; Abbasi *et al.*, 2016; Austin *et al.*, 2014). Серебряные наночастицы обладают выраженным антимикробным действием по отношению к грамотрицательным и грамположительным бактериям, включая высоко мультирезистентные штаммы (Panáček *et al.*, 2006; Birla *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009). Наночастицы элементного селена обладают противоопухолевой активностью и антиоксидантными свойствами *in vivo* и *in vitro* (Gao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Wang, 2009). Важную роль в биологической активности наночастиц селена играет их размер. Способность к нейтрализации свободных радикалов *in vitro* выявлена у частиц размером 5–200 нм (Peng *et al.*, 2007).

В настоящее время проводятся глубокие исследования по поиску путей синтеза наночастиц требуемого химического состава, формы и размера, обладающих необходимой однородностью и стабильностью. Используемые физико-химические методы синтеза наночастиц, несмотря на их успешное применение, являются дорогостоящими, трудоемкими, экологически небезопасными, требуют использования высоких температур, pH и давления, вредных химических соединений (Dhillon *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2015). В связи с этим все больше возрастает интерес к биологическому, безопасному для окружающей среды и человека, «зеленому» синтезу, с применением различных биологических объектов, включая живые культуры растений, водорослей, грибов, бактерий, актиномицетов, а также их биомассу, клеточные фракции, экстракты, метаболиты, отработанные среды и субстраты (Vigneshwaran *et al.*, 2007; Philip, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Narayanan and Sakthivel, 2011; Kharissova *et al.*, 2013; Malik *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016).

В последние годы область биотехнологического получения наночастиц развивается очень бурно, однако в большинстве исследований для получения наночастиц используются бактерии и микроскопические грибы, многие из которых являются патогенными. Преимуществом перед другими организмами в этом плане обладают высшие грибы благодаря своей способности продуцировать широкий спектр активных белковых молекул, переводить ионы тяжелых металлов и других микроэлементов в менее токсичные формы под действием

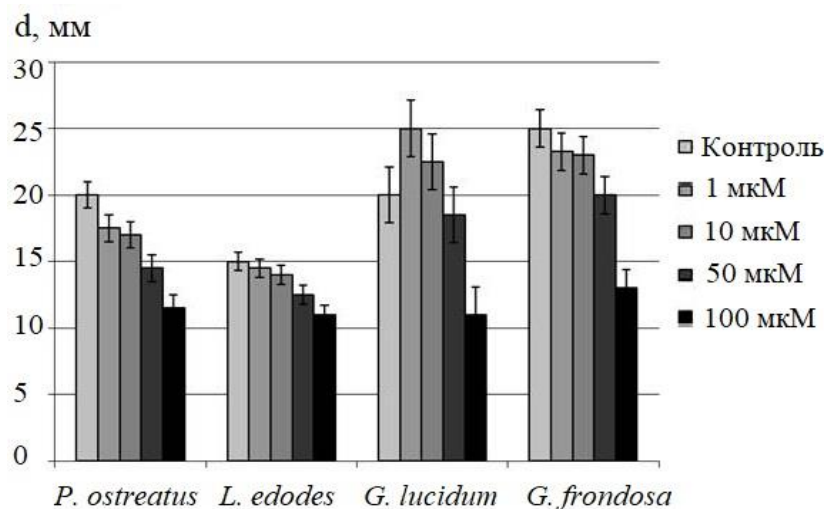
ферментов и аккумулировать их в мицелии (Gade *et al.*, 2010; Dhillon *et al.*, 2012; Kitching *et al.*, 2014; Loshchinina *et al.*, 2023a; 2023b). Более перспективным представляется использование для биосинтеза наночастиц ксилотрофных культивируемых базидиомицетов, поскольку эти объекты введены в искусственную культуру и 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. Культуры ксилотрофных базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa*, а также почвенных сапротрофов *A. bisporus* и *A. arvensis* отличаются простотой и безопасностью выращивания, ценятся как высококачественные съедобные грибы, а также как продуценты ферментов и уникального комплекса биологически активных и лекарственных веществ, нашедших широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности (Wasser, 2014; Ghobad-Nejhad *et al.*, 2024).

7.1 Влияние ионов золота, серебра и селена на рост ксилотрофных и почвенных базидиомицетов при твердофазном выращивании

С целью определения оптимальных концентраций исследуемых элементов для дальнейшего биосинтеза наночастиц при помощи грибных культур, нами было изучено влияние соединений золота, серебра и селена в среде культивирования на ростовые характеристики культур базидиомицетов при выращивании на жидких и агаризованных средах. В результате проведенных исследований было установлено, что при твердофазном выращивании с добавлением ионов металлов (золота и серебра) для всех базидиомицетов рост мицелия ухудшался по мере возрастания их концентраций в среде культивирования. Чувствительность базидиомицетов к золотохлористоводородной кислоте (HAuCl_4) и влияние данного соединения на ростовые характеристики грибного мицелия были минимальны при его концентрации в среде культивирования от 1 до 50 мкМ, при 1–10 мкМ фактически не изменялся по сравнению с контролем. Заметное ингибирование роста происходило при концентрации 100 мкМ HAuCl_4 , а при 300–500 мкМ рост полностью отсутствовал. При твердофазном культивировании наиболее чувствительной к содержанию в среде HAuCl_4 была культура трутовика *G. lucidum*, наименее – *P. ostreatus* (Рисунок 109).

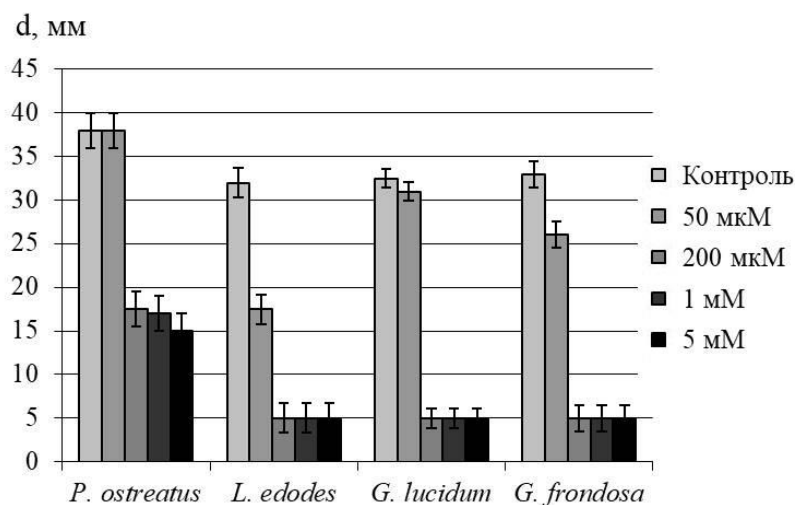
При внесении в среду культивирования ионов серебра в концентрации до 50 мкМ ингибирование роста было не значительное, наиболее сильное для *L. edodes*, а наименее – для *P. ostreatus*. Дальнейшее повышение концентрации AgNO_3 сильно влияло на жизнеспособность и при концентрации ионов 200 мкМ в среде рост всех грибов полностью прекращался, кроме *P. ostreatus* (Рисунок 110). Культура *P. ostreatus* продолжала расти даже при 5 мМ AgNO_3 в среде, вероятнее всего это связано со способностью данного гриба образовывать воздушный мицелий и разрастаться, сильно не углубляясь в среду культивирования, в отличие от других видов

базидиомицетов, особенно трутовиков, мицелиальные гифы которых сильно внедряются в субстрат и таким образом менее защищены от находящихся в ней токсичных ионов.



Твердофазное культивирование на 7 сутки выращивания; d – диаметр колонии, мм.

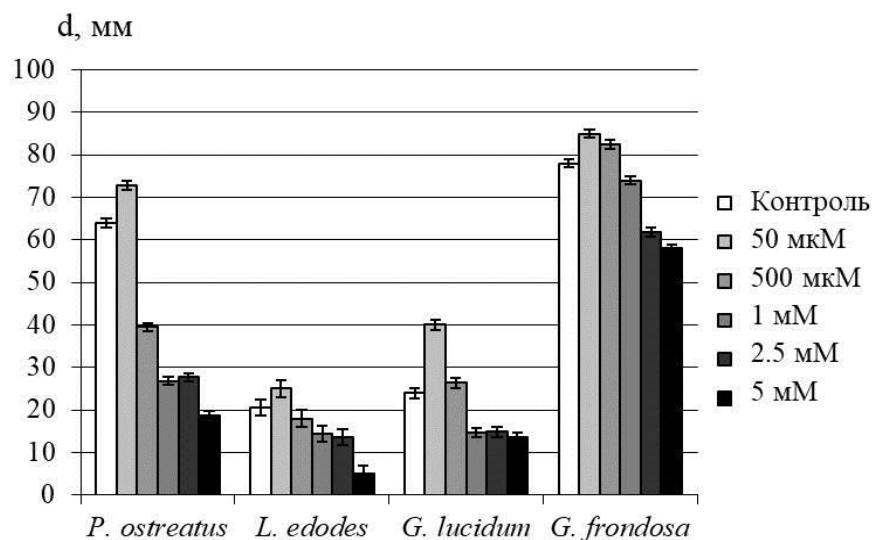
Рисунок 109 – Влияние разных концентраций ионов золота (HAuCl_4) на рост ксилотрофных базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa* (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)



Твердофазное культивирование на 10 сутки выращивания; d – диаметр колонии, мм.

Рисунок 110 – Влияние разных концентраций ионов серебра (AgNO_3) на рост ксилотрофных базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa* (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

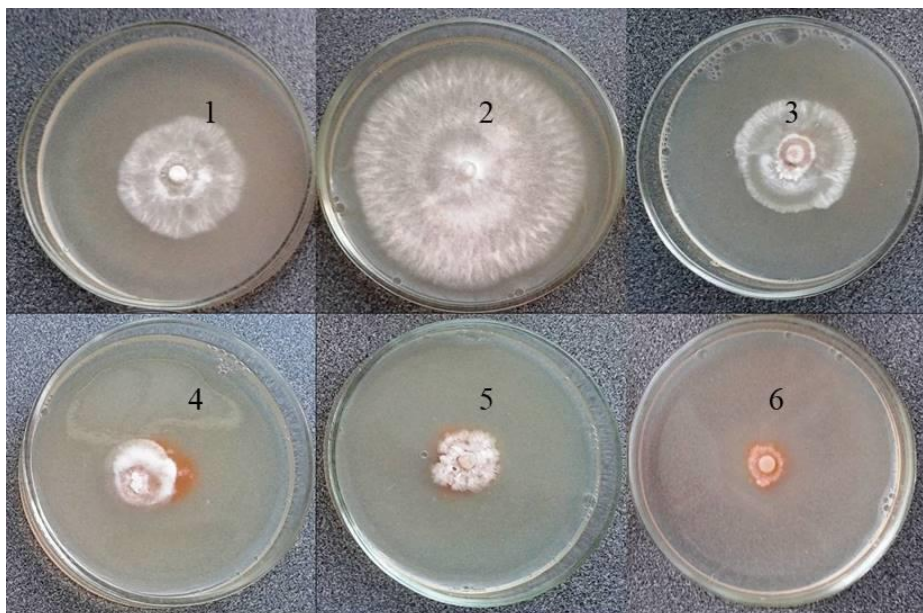
При твердофазном выращивании низкие концентрации ионов селена в среде стимулировали рост грибов и уплотнение мицелия, более высокие обладали ярко выраженным ингибирующим эффектом. Особенно наглядно данный эффект проявляется после 14 суток при измерении диаметра колоний (Рисунок 111). У *L. edodes* и *P. ostreatus* рост мицелия стимулировался при добавлении в среду Na_2SeO_3 в концентрации до 50 мкМ, у *G. lucidum* и *G. frondosa* от 50 до 500 мкМ. Заметное ингибирование роста происходило при концентрации 1 мМ Na_2SeO_3 , а при 5 мМ рост сильно замедлялся и, у *L. edodes* полностью отсутствовал.



Твердофазное культивирование на 14 сутки выращивания; d – диаметр колонии, мм.

Рисунок 111 – Влияние разных концентраций ионов селена (Na_2SeO_3) на рост ксилотрофных базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa* (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

При твердофазном культивировании наиболее чувствительными к содержанию в среде ионов селена были культуры шиитаке *L. edodes* и трютовика *G. lucidum*, наименее чувствительной – культура *G. frondosa*. При культивировании грибов с селенитом натрия субстрат на участках роста мицелия окрашивался в оранжево-красный цвет, что указывает на восстановление Se^{+4} в Se^0 из Na_2SeO_3 и его накопление в среде культивирования (Рисунок 112).

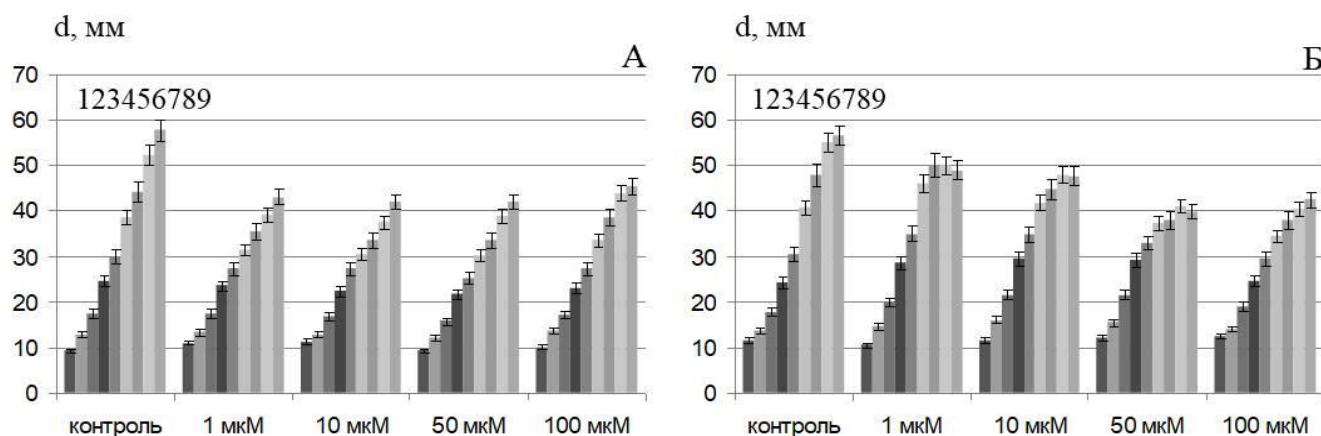


1 – Контроль, 2 – 50 мкМ, 3 – 500 мкМ, 4 – 1 мМ, 5 – 2.5 мМ, 6 – 5 мМ; 14 сутки выращивания.

Рисунок 112 – Влияние на рост культуры *G. lucidum* разных концентраций ионов селена (Na_2SeO_3) при твердофазном культивировании (14 сутки); биовосстановление Se^{4+} до Se^0 из Na_2SeO_3 грибными метаболитами (Vetchinkina et al., 2016 <https://doi.org/10.1134/S0003683816010130>)

Элементный селен существует в виде ряда форм: кристаллический (гексагональный, α -, β - и γ -моноклинный, ромбоэдрический, орторомбический, α - и β -кубический селен), стекловидный селен и четыре жидких формы, получаемых при расплавлении кристаллических форм, а также ультрадисперсный «аморфный» (красный, коричневый и черный селен) (Minaev *et al.*, 2005). Появление красной окраски у колоний микроорганизмов, растущих на селенсодержащих средах, свидетельствует о накоплении культурами элементного селена в аморфной красной модификации (Das *et al.*, 2009; Irvani, 2011). Было отмечено, что повышение концентрации ионов селена в среде культивирования приводило к увеличению интенсивности цвета субстрата. По всей видимости, микроорганизмы включают защитные механизмы, позволяющие им избавляться от токсичных ионов, переводя их в элементное, полностью инертное состояние.

Было показано, что при твердофазном культивировании все изученные концентрации HAuCl_4 подавляют рост мицелия почвенных сапротрофов *A. bisporus* и *A. arvensis* на 15–25% (Рисунок 113А, Б).



1 – 4 сут, 2 – 7 сут, 3 – 10 сут, 4 – 14 сут, 5 – 17 сут, 6 – 20 сут, 7 – 24 сут, 8 – 28 сут, 9 – 31 сутки культивирования; d – диаметр колонии, мм.

Рисунок 113 – Влияние разных концентраций ионов золота (HAuCl_4) на рост *A. bisporus* (А) и *A. arvensis* (Б) при твердофазном культивировании (Loshchinina, Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.002>)

Высокую токсичность в отношении шампиньонов проявил нитрат серебра, 0.05 мМ AgNO_3 подавляли рост мицелия обоих видов на агаризованной среде на 35%, а более высокие концентрации ингибировали рост практически полностью (Рисунок 114А, Б).

Низкие концентрации Na_2SeO_3 оказали слабое стимулирующее влияние на шампиньоны, высокие – ингибировали мицелиальный рост грибных культур вплоть до практически полного его подавления при 5 мМ Na_2SeO_3 (Рисунок 115А, Б). Таким образом, низкие концентрации ионов селена в среде стимулировали рост грибов и уплотнение мицелиальных колоний, в то время как более высокие обладали ярко выраженным ингибирующим эффектом.

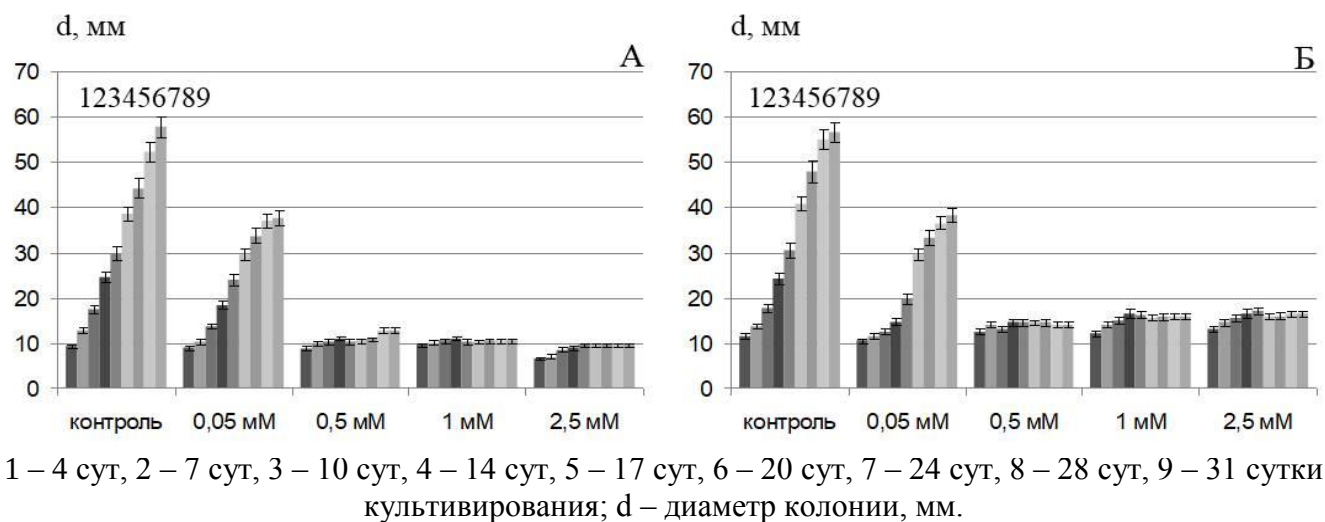


Рисунок 114 – Влияние разных концентраций ионов серебра (AgNO_3) на рост *A. bisporus* (А) и *A. arvensis* (Б) при твердофазном культивировании (Loshchinina, Vetchinkina et al., 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.002>)

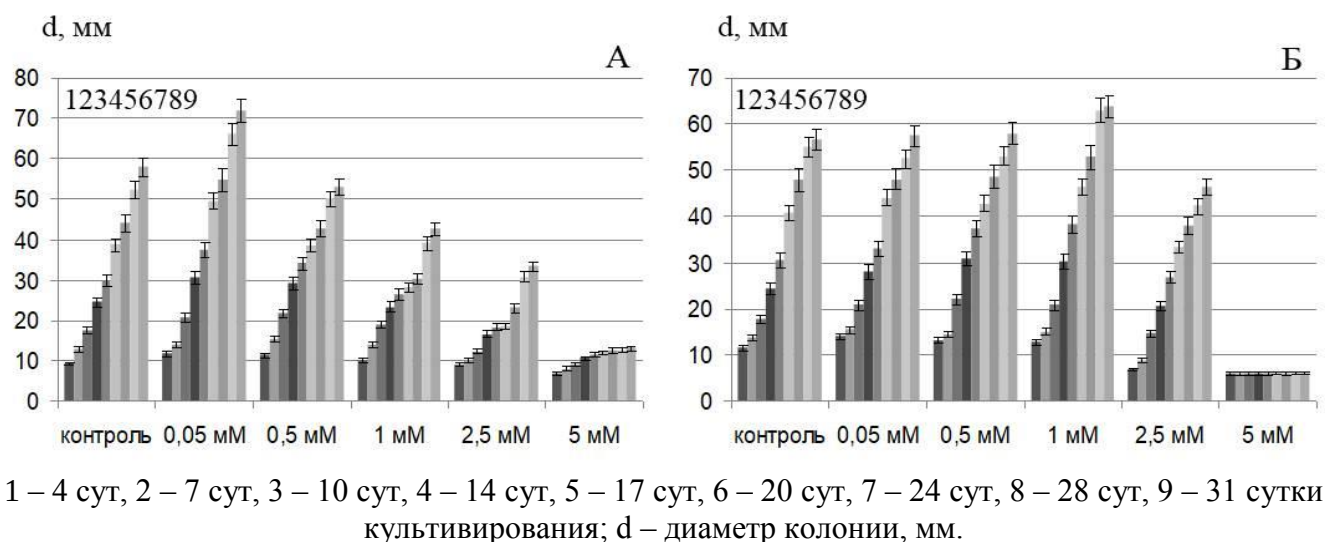


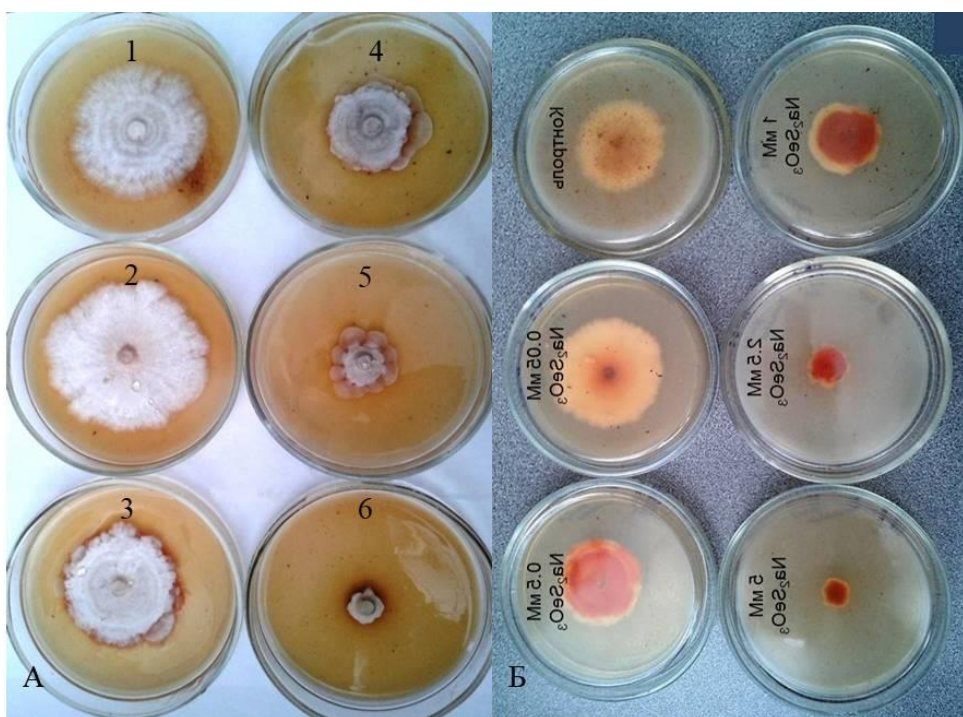
Рисунок 115 – Влияние разных концентраций ионов селена (Na_2SeO_3) на рост *A. bisporus* (А) и *A. arvensis* (Б) при твердофазном культивировании (Loshchinina, Vetchinkina et al., 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.002>)

Субстрат на участках роста мицелия *A. bisporus* и *A. arvensis* окрашивался в оранжево-красный цвет, что говорит о восстановлении Se^{+4} до Se^0 из Na_2SeO_3 и накоплении аморфной формы элементарного селена красной модификации в среде культивирования (Рисунок 116).

7.2 Влияние ионов золота, серебра и селена на рост и накопление биомассы ксилотрофных и почвенных базидиомицетов при глубинном выращивании

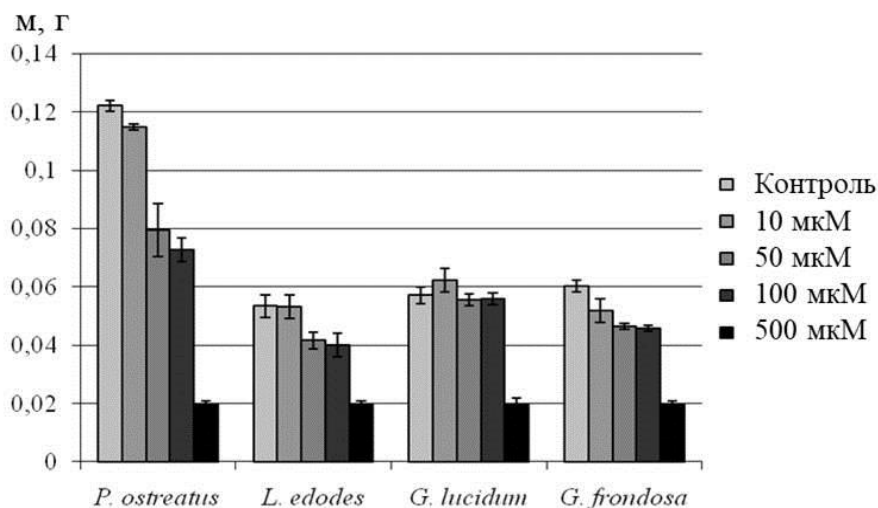
Также была протестирована чувствительность *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. frondosa* и *G. lucidum* к влиянию ионов металлов и металлоидов в среде при глубинном культивировании на ростовые характеристики базидиальных грибов. При глубинном культивировании минимальная ингибирующая рост концентрация HAuCl_4 варьировала и составляла от 50 до 100 мкМ. При

300–500 мкМ рост полностью отсутствовал, а при 10 мкМ фактически не изменялся по сравнению с контролем (Рисунок 117).



1 – Контроль, 2 – 50 мкМ, 3 – 500 мкМ, 4 – 1 мМ, 5 – 2.5 мМ, 6 – 5 мМ;
А – вид сверху чашки Петри, Б – дно чашки Петри.

Рисунок 116 – Влияние на рост культуры *A. bisporus* разных концентраций ионов селена (Na_2SeO_3) при твердофазном культивировании;
биовосстановление Se^{4+} до Se^0 из Na_2SeO_3 грибными метаболитами



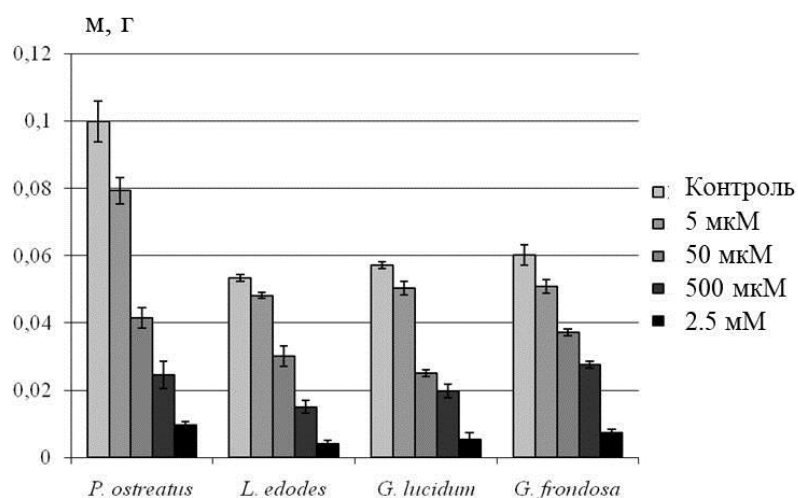
Глубинное культивирование на 28 сутки выращивания; м, г – сухая масса мицелия, грамм.

Рисунок 117 – Влияние разных концентраций ионов золота (HAuCl_4) на рост и накопление биомассы *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa*
(Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

Поскольку накопление элементного золота в мицелии коррелирует с повышением уровня HAuCl_4 в среде культивирования, можно предположить, что восстановление этих соединений с

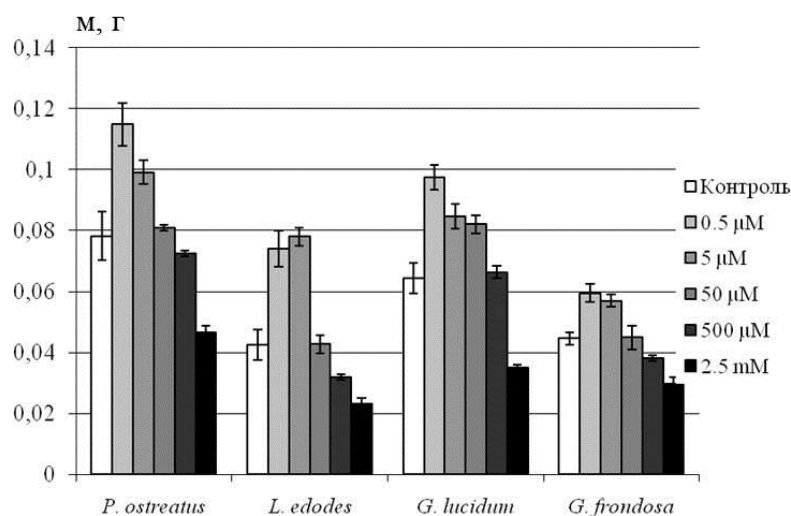
образованием Au^0 необходимо для снижения токсического действия высоких концентраций металла, что характерно для многих микроорганизмов (Garbisu *et al.*, 1996). По всей видимости, включаются защитные механизмы, позволяющие избавляться от токсичных ионов в среде обитания, в частности металлов и переводить их в элементное, полностью инертное состояние.

При культивировании с добавлением нитрата серебра для всех базидиомицетов рост мицелия ухудшался по мере возрастания концентраций ионов металлов в среде выращивания. При 5 мкМ AgNO_3 наблюдалось незначительное ингибирование роста и накопления биомассы грибов, при 50 мкМ данные характеристики сокращались уже вдвое по сравнению с контрольными культурами, дальнейшее повышение концентрации серебра в среде приводило к сильному, вплоть до полной остановки роста микроорганизмов, эффекту (Рисунок 118).



Глубинное культивирование на 28 сутки выращивания; м, г – сухая масса мицелия, грамм.

Рисунок 118 – Влияние разных концентраций ионов серебра (AgNO_3) на рост и накопление биомассы ксилотрофными базидиомицетами *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa* (Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)



Глубинное культивирование на 28 сутки выращивания; м, г – сухая масса мицелия, грамм.

Рисунок 119 – Влияние разных концентраций ионов селена (Na_2SeO_3) на рост и накопление биомассы ксилотрофными базидиомицетами *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa* (Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

Низкие концентрации селена (Na_2SeO_3) стимулировали рост всех видов грибов и накопление биомассы при глубинном культивировании, в то время как более высокие обладали ярко выраженным ингибирующим эффектом (Рисунок 119).

Как уже было отмечено выше, появление красной окраски у колоний микроорганизмов, растущих на селенсодержащих средах, свидетельствует о накоплении культурами элементарного селена в аморфной красной модификации (Das *et al.*, 2009; Iravani, 2011). При глубинном культивировании с добавлением селенита натрия (Na_2SeO_3) мицелий всех базидиомицетов, кроме *G. lucidum*, приобретал оранжево-красное окрашивание. Среда культивирования при этом оставалась прозрачной, однако наблюдалось выпадение красного осадка (Рисунок 120Б). По всей видимости, наблюдается биологическое восстановление Se^{4+} до Se^0 из Na_2SeO_3 грибными культурами. Наночастицы не образовывались при участии компонентов среды, так как в контрольных, не инокулированных колбах, с синтетической средой и селенитом натрия, окрашивания и выпадения осадка не происходило. Таким образом, способностью к восстановлению наночастиц обладал именно мицелий грибов и экскретируемые в процессе их жизнедеятельности метаболиты. У культуры *P. ostreatus* покраснение мицелиальных гиф появлялось уже на третьи сутки, а у остальных видов после 10–12-суточного культивирования. В контрольных, не инокулированных, колбах, содержащих синтетическую среду и селенит натрия, окрашивания и выпадения осадка не происходило. У трутовика *G. lucidum* среда приобретала слабо желтоватый оттенок (Рисунок 120Б).



Контроль (А); 0.5 мМ Na_2SeO_3 (Б); 50 мкМ HAuCl_4 (В); 50 мкМ AgNO_3 (Г);
1 – *L. edodes*; 2 – *P. ostreatus*; 3 – *G. lucidum*; 4 – *G. frondosa*

Рисунок 120 – Восстановление ионов металлов и металлоидов при глубинном культивировании ксилотрофными базидиомицетами

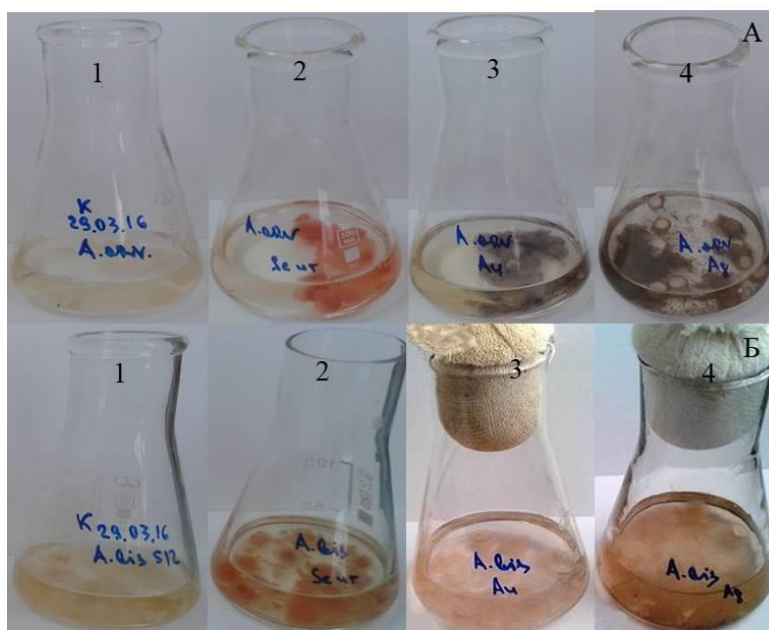
Из литературных источников известно, что различия в цвете суспензий наночастиц одного и того же химического элемента могут быть обусловлены их размером. Цвет наночастиц селена варьирует от желтого до ярко-красного и темно-розового, причем желтая окраска характерна для частиц около 20 нм, ярко-оранжевая – около 100 нм, красная – от 150 нм и больше, то есть чем больше диаметр, тем интенсивнее и краснее становится цвет суспензии наночастиц селена (Ahmad *et al.*, 2013). Желтый цвет обычно характерен для частиц диаметром от 20 до 40 нм. Это интересно, так как при твердофазном выращивании, в отличие от глубинного, с добавлением к среде селенита натрия субстрат на участках роста мицелия *G. lucidum* окрашивался в интенсивный красный цвет, что говорит о восстановлении Se^{4+} до Se^0 и накоплении аморфной формы элементного селена красной модификации с размером частиц диаметром от 100 до 300 нм.

Добавление в среду выращивания кислоты HAuCl_4 в диапазоне концентраций 10–100 мкМ при культивировании базидиомицетов на жидкой синтетической среде уже на вторые сутки приводило к сиреневому или красному окрашиванию грибных гиф, а также культуральной жидкости разной степени интенсивности (Рисунок 120В). Именно изменение цвета колоний микроорганизмов, растущих в присутствии золотосодержащих соединений, от различных оттенков сиреневого до красного, является признаком восстановления золота до элементного состояния. Согласно литературным данным, такое окрашивание характерно для бактерий, водорослей и низших грибов, растущих на золотосодержащих средах, и указывает на накопление наночастиц золота (Durán *et al.*, 2007; Philip, 2009). Разница в цвете зависит от размера и формы синтезированных частиц. Часто уже по цвету можно предположить, какой формы и размера будут восстановленные наночастицы. Сиреневый цвет соответствует частицам размером 50 нм и часто разнообразной формы, красный цвет дают однородные сферические наночастицы диаметром не более 20 нм. Наиболее сильную окраску приобретали *L. edodes* и *P. ostreatus*, что говорит о хорошей способности данных культур к биоредукции соединения HAuCl_4 с последующим накоплением коллоидного золота Au^0 в среде и мицелии.

При внесении в среду ионов серебра цвет культуральной жидкости, а также гиф грибов, заметно темнел, начиная со вторых суток выращивания, а к 14-суточному возрасту приобретал рыжевато-бурую окраску, наиболее интенсивную у *G. frondosa*. У трутовика *G. lucidum* наблюдалось, кроме того, выпадение бурого осадка (Рисунок 120Г). Признаком появления наночастиц серебра, по литературным источникам, является желтовато-коричневое окрашивание биомассы микроорганизмов (Popescu *et al.*, 2010). Контрольные культуры базидиомицетов, которые выращивались при глубинном культивировании при аналогичных условиях эксперимента, но без добавления в среду соединений золота, серебра и селена, имели кремово-белый цвет на протяжении всего времени исследования (Рисунок 120А). Стоит отметить, что выращивание культур проводилось в темноте и при температуре не выше 26°C,

так как некоторые металлы, например серебро, способны восстанавливаться до Ag^0 при нагревании и воздействии света. Не были способны к восстановлению наночастиц и компоненты сред выращивания, так как цветных реакций, свидетельствующих о накоплении элементарных частиц, на не инокулированных колбах и чашках Петри не наблюдалось.

Сходная динамика роста наблюдалась и для глубинных культур почвенных сапротрофов *A. bisporus* и *A. arvensis*, растущих на средах с золотом, серебром и селеном. При глубинном культивировании шампиньонов на средах с добавлением соединений золота, серебра и селена наблюдалось изменение окраски мицелия с кремово-белой (контроль) на розово-сиреневую, бурую и оранжево-красную, соответственно; кроме того, на средах с серебром и золотом цвет изменяла также культуральная жидкость (Рисунок 121А, Б). При этом у *A. bisporus* по сравнению с *A. arvensis* было более интенсивным окрашивание мицелия, а суспензия окрашенных частиц в культуральной жидкости – более устойчивой. Установлено, что сиреневое, бурое и оранжево-красное окрашивание является показателем образования наночастиц элементарного золота, серебра и селена (Philip 2009; Popescu et al., 2010; Iravani, 2011).



Контроль (1); 0.5 mM Na_2SeO_3 (2); 50 мкМ HAuCl_4 (3); 50 мкМ AgNO_3 (4).

Рисунок 121 – Восстановление ионов металлов и металлоидов при глубинном культивировании почвенными сапротрофами *A. arvensis* (А) и *A. bisporus* (Б)

Таким образом, изучено и выявлено влияние соединений золота, серебра и селена в диапазоне концентраций 0.5×10^{-3} до 5 мМ на параметры роста и накопление биомассы ксилотрофных базидиомицетов *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *G. frondosa* и почвенных сапротрофов *A. arvensis* и *A. bisporus* в зависимости от концентрации и природы изучаемых веществ. Установлено, что при твердофазном и глубинном выращивании с добавлением ионов

металлов (золота и серебра) для всех базидиомицетов рост мицелия ухудшался по мере возрастания их концентраций в среде культивирования.

Были определены оптимальные концентрации металлов, при которых наблюдается интенсивное биообразование наночастиц и незначительное ингибирование роста грибных культур. Для HAuCl_4 эта концентрация составляет 50 мкМ, а AgNO_3 – 0.5 мМ. Показано, что низкие концентрации Na_2SeO_3 стимулировали рост грибов при глубинном и твердофазном культивировании, высокие – обладали значительным ингибирующим эффектом. Оптимальные концентрации для данных веществ также были установлены и составили 0.5 мМ. Кроме того, установлено, что способностью к восстановлению наночастиц обладают не компоненты среды, а именно грибные гифы и экскретируемые в процессе жизнедеятельности клеток низко- и высокомолекулярные соединения, в том числе и экстра- и внутриклеточные ферменты.

7.3 Биоредукция соединений HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 ксилотрофными базидиомицетами *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *G. frondosa* с образованием наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 , условия восстановления, характеристика и локализация

7.3.1 Образование наночастиц золота ксилотрофными базидиомицетами. ПЭМ

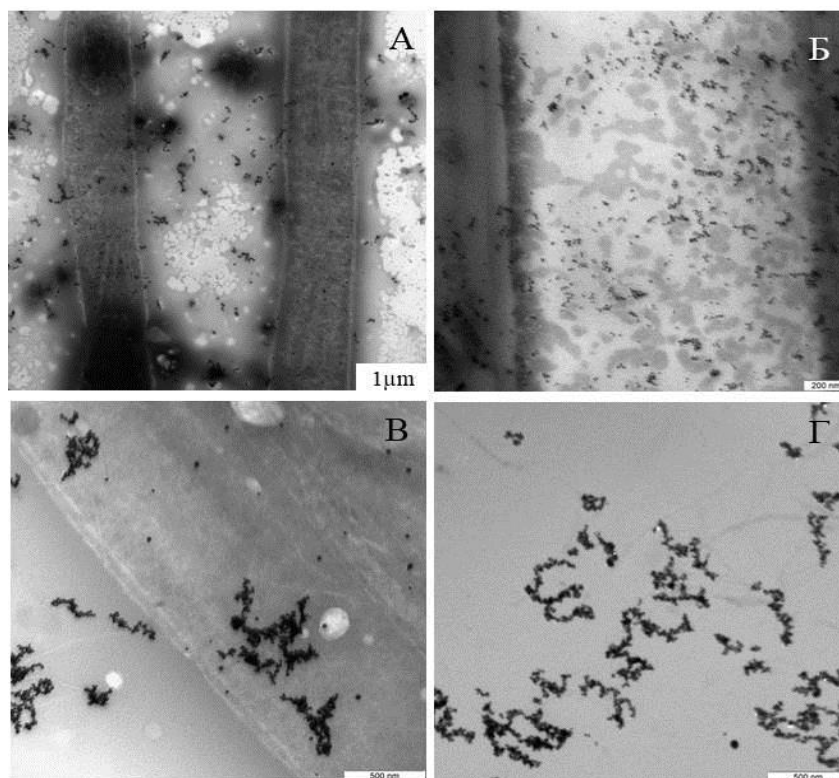
В последние годы появляются сообщения о способности микроорганизмов, в том числе некоторых низших грибов (Kitching *et al.*, 2015), а также ряда базидиомицетов *V. volvacea* (Philip, 2009), *P. florida* (Bhat *et al.*, 2013) к восстановлению ионов золота до элементного состояния с биосинтезом наночастиц. Такая способность была обнаружена как у живых культур, так и у фильтратов культуральной жидкости и экстрактов мицелия. Для выяснения способности базидиомицетов к восстановлению золотохлористоводородной кислоты с образованием наночастиц исследовали культуральные жидкости и грибные гифы, выращенные в присутствии 50 мкМ HAuCl_4 . Культивирование в присутствии золотосодержащего соединения приводило к изменению как цвета грибных гиф, так и среды выращивания. Перед нами встал вопрос, с чем связано восстановление соединения до элементного состояния – с грибной культурой или с химическим восстановлением под действием компонентов среды выращивания, а может с культуральной жидкостью, содержащей различные низко- и высокомолекулярные соединения жизнедеятельности гриба, в том числе и экстраклеточных ферментов. Для выяснения данного вопроса был проведен следующий эксперимент. Были взяты четыре типа колб: первые содержали синтетическую среду с золотохлористоводородной кислотой; вторые – дистиллированную воду с тем же соединением, третьи – культуральную жидкость, отфильтрованную от грибной культуры, полученную в результате выращивания шиитаке на синтетической среде в стандартных условиях без добавления HAuCl_4 , четвертые содержали дистиллированную воду и 14-суточный контрольный мицелий *L. edodes*, выращенный на синтетической среде в

стандартных условиях без добавления HAuCl_4 и затем несколько раз отмытый от среды культивирования дистиллированной водой. К третьему и четвертому типам колб была добавлена золотохлористоводородная кислота в концентрации 50 мкМ. Все колбы были помещены в одинаковые условия, по истечении времени эксперимента мы получили следующие результаты. Ни в первом случае, ни во втором случае на 14 сутки инкубирования восстановления золотосодержащего соединения до элементного золота, изменения цвета и выпадения осадка не происходило, что говорит о непричастности дистиллированной воды или синтетической среды к процессу восстановления. В третьем случае – культуральная жидкость приобретала сиреневато-красное окрашивание, что свидетельствовало о присутствии в ней продуктов жизнедеятельности гриба, способных восстанавливать соединения золота до элементного состояния. В четвертом варианте эксперимента происходило, с нашей точки зрения, самое интересное: дистиллированная вода, в которой находился мицелий, оставалась прозрачной, а грибные гифы имели интенсивную сиренево-красную окраску, подтверждая, таким образом, предположение, что восстановление связано непосредственно с мицелием шиитаке. После интенсивного встряхивания и центрифугирования вода оставалась прозрачной, что позволило предположить внутриклеточную локализацию восстановленных частичек золота или, по крайней мере, очень сильное сцепление с поверхностью грибных гиф. Итак, можно сделать вывод о восстановлении и последующем накоплении частиц элементного золота либо на поверхности, либо внутри мицелиальных гиф *L. edodes*, либо в культуральной среде с насыщенной метаболитами грибной культуры.

Было проведено исследование гиф *L. edodes*, выращенных в присутствии 50 мкМ HAuCl_4 в течение 14 суток, методом негативного контрастирования. Не отмытый от культуральной среды мицелий шиитаке был нанесен на никелевые сеточки. Как видно на представленном рисунке, на поверхности гиф мицелия, а также около них наблюдали электронноплотные образования сферической формы, отсутствующие в контроле. При этом размер частиц варьировал от 10 до 50 нм с преимущественным содержанием частиц диаметром около 20 нм (Рисунок 122).

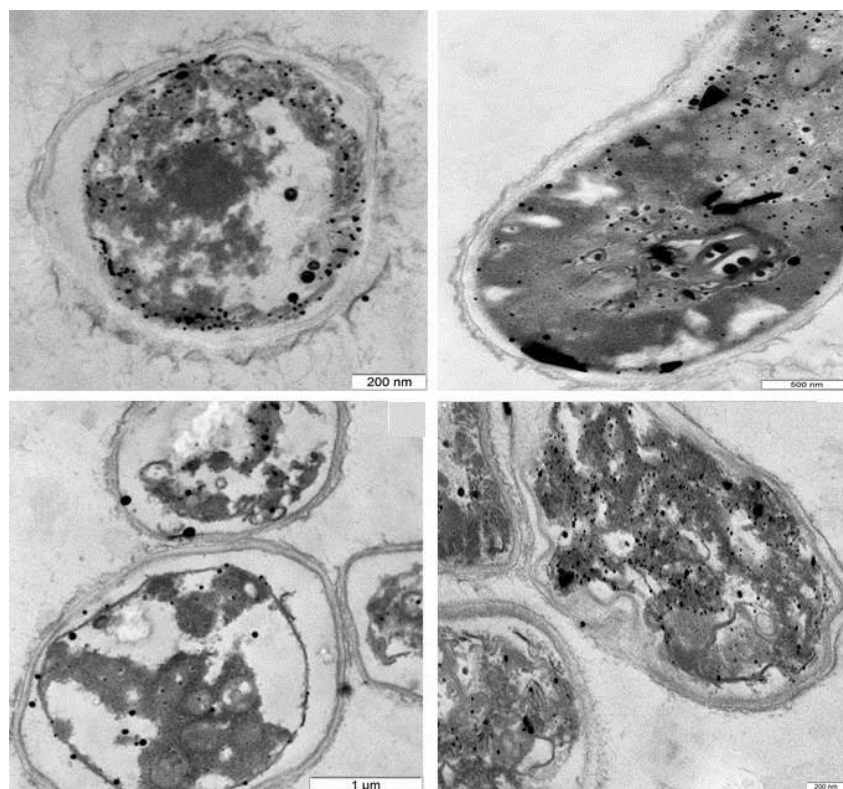
Известно, что различные микроорганизмы способны восстанавливать золото как внутриклеточно, так и внеклеточно (Narayanan and Sakthivel, 2010). Было отмечено, что при использовании живых культур грибов наночастицы чаще образовывались внеклеточно, и реже – внутри клеток или в клеточной стенке и цитоплазматической мембране (Kitching *et al.*, 2015).

Для подтверждения внутриклеточной локализации и способности грибов накапливать наночастицы золота внутри гиф, мы провели ряд исследований с применением методов электронной микроскопии. Гифы (на примере *L. edodes*) заливали в эпоксидную смолу для последующего получения ультратонких срезов. Результаты, полученные с помощью ПЭМ, подтвердили наличие в цитоплазме клеток образований сферической формы (Рисунок 123).



Глубинное культивирование, 14 суток. Масштабная линейка – 200, 500 нм и 1 мкм.

Рисунок 122 – ПЭМ золотых наночастиц и гиф *L. edodes*, выращенных в присутствии 50 мкМ HAuCl_4
(Vetchinkina *et al.*, 2018 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.018>)

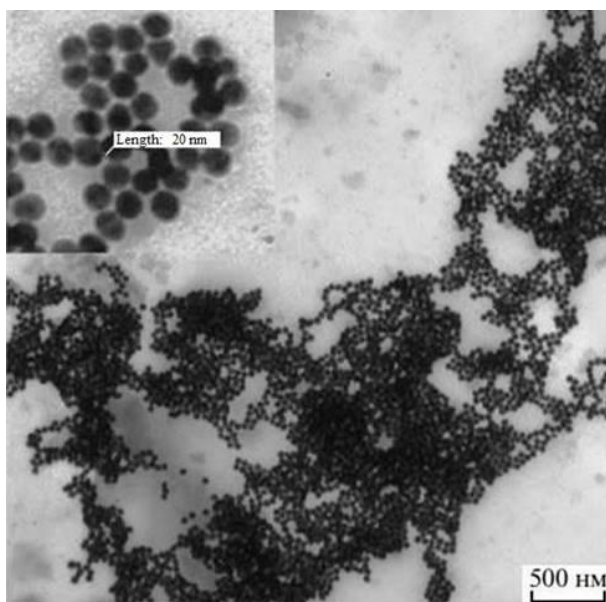


Глубинное культивирование, 14 суток. Масштабная линейка – 200, 500 нм и 1 мкм.

Рисунок 123 – ПЭМ срезов гиф *L. edodes*, с наночастицами золота (Au^0)
(Vetchinkina *et al.*, 2013 <http://doi.org/10.1134/S0003683813040121>)

Основная масса наночастиц имела размер от 10 до 15 нм, однако встречалось небольшое количество частиц 30–40 нм. Мы практически не обнаружили частиц на поверхности или внутри клеточной стенки, что может говорить о том, что частицы не проникали через клеточную стенку, а образовывались непосредственно в цитоплазме, скорее всего под действием внутриклеточных ферментов. Ранее наблюдавшиеся сцепленные частицы с поверхностью мицелиальных гиф, по-видимому, были удалены в процессе пробоподготовки, так как условия данного процесса довольно жесткие.

Для изучения наночастиц грибной мицелий, содержащий восстановленное золото, механически разрушали и отделяли от частиц, далее наночастицы ресуспендировали в дистиллированной воде и наносили на никелевые сеточки с подложкой. Отделенные фильтрованием и отмытые частицы золота представляли собой довольно большое количество наносфер правильной формы, близких по размеру ~20 нм (Рисунок 124).

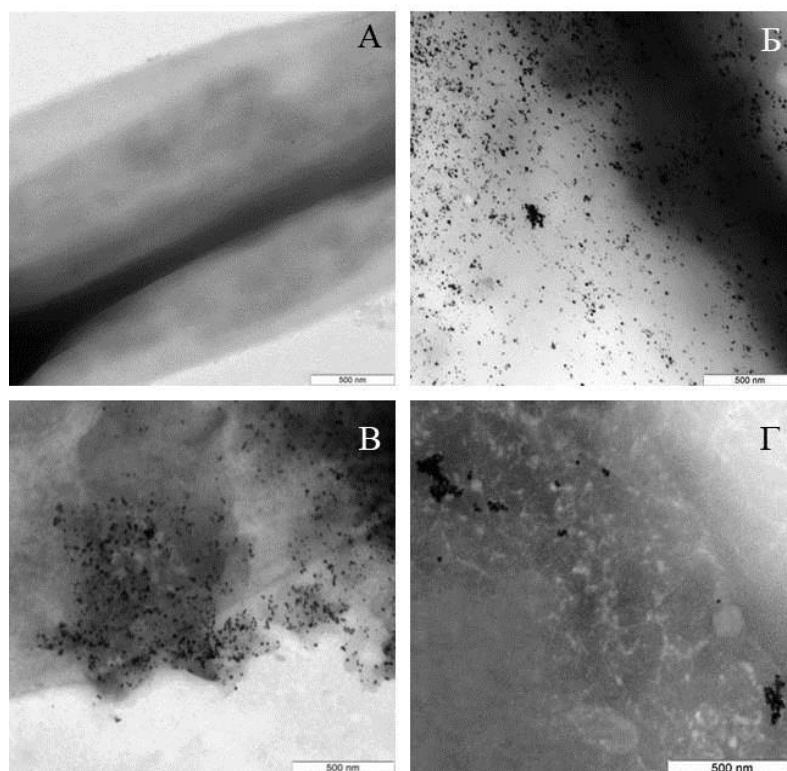


Масштабная линейка – 500 нм.

Рисунок 124 – ПЭМ сферических наночастиц золота, полученных после разрушения мицелия базидиомицета *L. edodes*
(Vetchinkina *et al.*, 2013 <http://doi.org/10.1134/S0003683813040121>)

Элементное золото синтезировали все базидиомицеты, без заметных различий в форме и размере, преимущественно на поверхности клеток и в среде выращивания. Как видно на представленном рисунке (Рисунок 125) на поверхности гиф, а также около них, поскольку мицелий базидиомицетов предварительно не отмывали от культуральной среды, наблюдали электронно-плотные образования, отсутствующие в контроле. В основном наночастицы были представлены сферами правильной формы и размером 5–15 нм, встречалось небольшое количество частиц 30–50 нм. Поскольку накопление элементного золота в мицелии коррелирует с повышением концентрации HAuCl_4 в среде культивирования, можно предположить, что

трансформация соединения с образованием Au^0 необходима *L. edodes* для снижения токсического действия, что характерно для многих микроорганизмов (Garbisu *et al.*, 1996).



Масштабная линейка – 500 нм

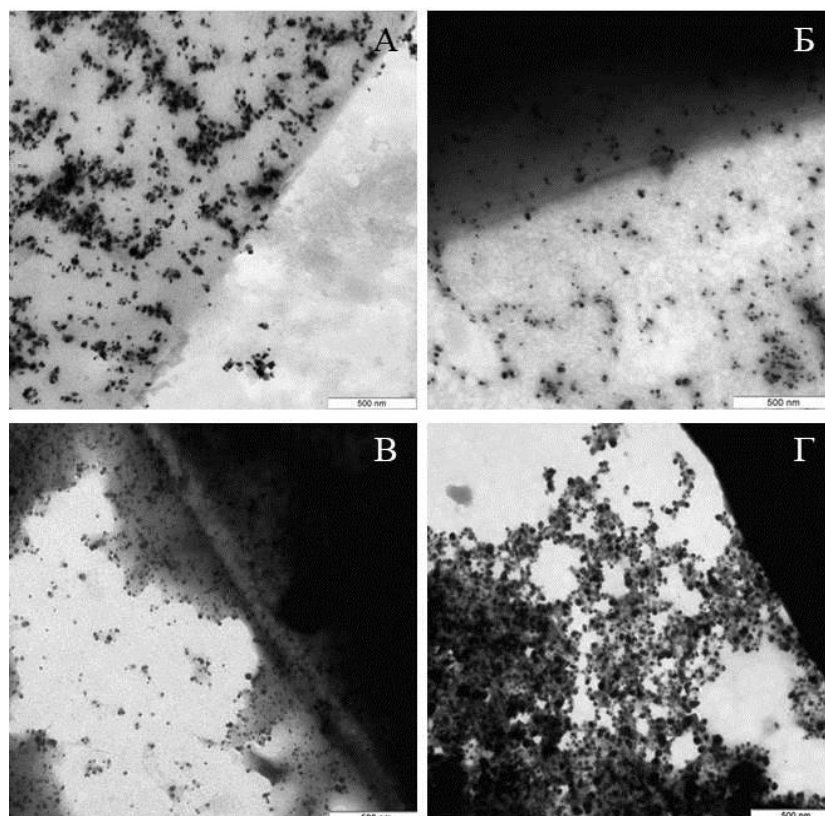
Рисунок 125 – ПЭМ мицелиальных гиф базидиомицетов и биологически синтезированных из HAuCl_4 золотых наночастиц (Au^0); Контроль (А), *P. ostreatus* (Б), *G. frondosa* (В), *G. lucidum* (Г) (Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

Таким образом, культивирование в присутствии золотосодержащего соединения приводило к изменению, как цвета грибной культуры, так и среды выращивания. Мы выяснили, что компоненты синтетической среды к процессу восстановления не причастны. А культуральная жидкость и содержащиеся в ней различные соединения жизнедеятельности гриба, в том числе и экстраклеточные белки, способны восстанавливать соединения золота до элементного состояния. Также мы подтвердили наше предположение, что синтез золотых наночастиц связан непосредственно с мицелием *L. edodes*, наносферы Au^0 были локализованы не только внеклеточно, но и в большом количестве накапливались внутри клеток. В таком случае, опираясь на вышесказанное, можно говорить о том, что происходит биохимическое восстановление, напрямую связанное с метаболизмом базидиомицета, не зависящее от химического восстановления под действием определенных компонентов среды.

7.3.2 Образование наночастиц серебра ксилотрофными базидиомицетами. ПЭМ

Наряду с золотом, серебро – один из наиболее перспективных в плане биологического получения наночастиц элементов. Наночастицы серебра, синтезированные грибами и

бактериями, могут иметь самую разнообразную форму, размер и локализацию (Narayanan and Sakthivel, 2011). Все представленные культуры были способны к биосинтезу наночастиц серебра, без заметных видовых различий. Большое количество сфер неправильной формы, с преобладающим диаметром 5–20 нм, накапливалось в среде выращивания. Причем основная масса наночастиц слипалась в конгломераты и лежала на белковой основе. По всей видимости, в синтезе Ag^0 принимают участие белки, продуцируемые грибными клетками в культуральную среду (Рисунок 126).



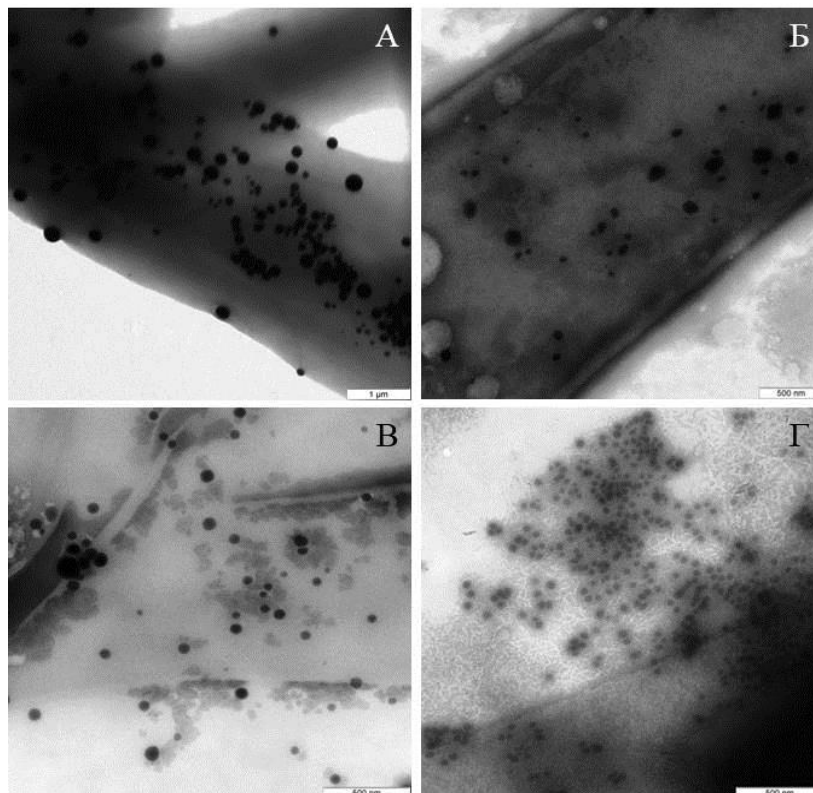
Масштабная линейка – 500 нм

Рисунок 126 – ПЭМ мицелиальных гиф базидиомицетов и биологически синтезированных из AgNO_3 наночастиц серебра (Ag^0); *L. edodes* (А), *P. ostreatus* (Б), *G. frondosa* (В), *G. lucidum* (Г) (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

7.3.3 Образование наночастиц селена ксилотрофными базидиомицетами. ПЭМ

Наночастицы селена грибные культуры синтезировали по-разному: *L. edodes* и *G. frondosa* накапливали элементный селен либо внутри клеток мицелия, либо частицы были сцеплены с поверхностью мицелиальных гиф. Единичные сферические образования наблюдались вне клеток, что, возможно, является результатом разрушения гиф и освобождения частиц. Диаметр биологически синтезированного Se^0 составлял от 50 до 150 нм, редко до 250 нм, все частицы представлены правильными сферами (Рисунок 127А, Б). Базидиомицеты *G. lucidum* и *P. ostreatus*, в отличие от предыдущих культур, синтезировали наночастицы в

основном в культуральной среде, у вешенки – немного на поверхности мицелия. Наблюдали образование наносфер правильной формы диаметром 50–100 нм (Рисунок 127В). Кроме того для наночастиц, образованных культурой *G. lucidum*, сильно отличался размер наносфер, диаметр составлял от 20–50 нм (Рисунок 127Г), отсюда и различие в цвете среды выращивания при глубинном культивировании (слабо-желтое у *G. lucidum*, у остальных культур – оранжево-красное) (Рисунок 120Б).



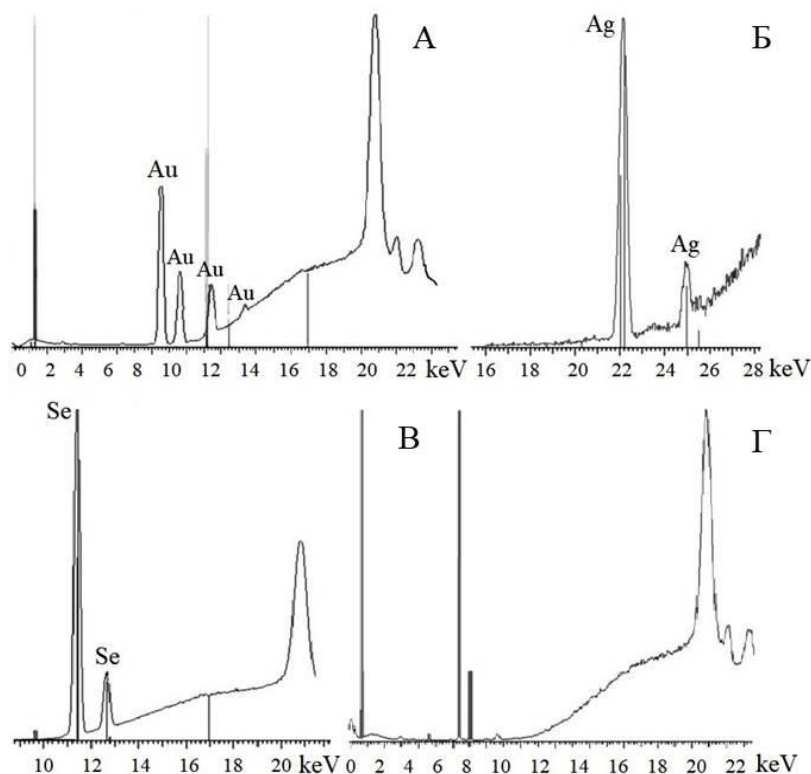
Масштабная линейка – 500 нм и 1 мкм.

Рисунок 127 – ПЭМ мицелиальных гиф базидиомицетов и биологически синтезированных из Na_2SeO_3 наночастиц селена (Se^0); *L. edodes* (А), *G. frondosa* (Б), *P. ostreatus* (В), *G. lucidum* (Г) (Vetchinkina et al., 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

7.4 Исследование наночастиц золота, серебра и селена в среде культивирования ксилотрофных базидиомицетов методом рентгеновской флуоресценции

Для подтверждения того, что образующиеся в среде выращивания ксилотрофных базидиомицетов наночастицы, представляют собой золото, серебро и селен, культуральную жидкость с частицами исследовали с помощью метода рентгеновской флуоресценции. Были полученные спектры, в которых отмечено появление интенсивных эмиссионных линий, золото было определено по линиям при $\text{La}1 - 9.713$; $\text{L}\beta1 - 11.443$; $\text{L}\beta2 - 11.585$; $\text{Ln} - 10.308$; $\text{Ly}1 - 13.382$ keV; серебро по 2-м линиям при $\text{La}1 - 22$ и $\text{L}\beta1 - 25$ keV; наличие селена было отражено в спектре в появлении интенсивных эмиссионных линий $\text{La}1 - 11.22$ и $\text{L}\beta1 - 12.49$ keV (Рисунок 128А–В). Данные элементы детектировались у всех видов базидиомицетов. При этом

спектры, снятые для контрольных культур базидиомицетов, выращенных на средах, без добавления данных соединений, показали отсутствие выше обозначенных эмиссионных линий (Рисунок 128Г).



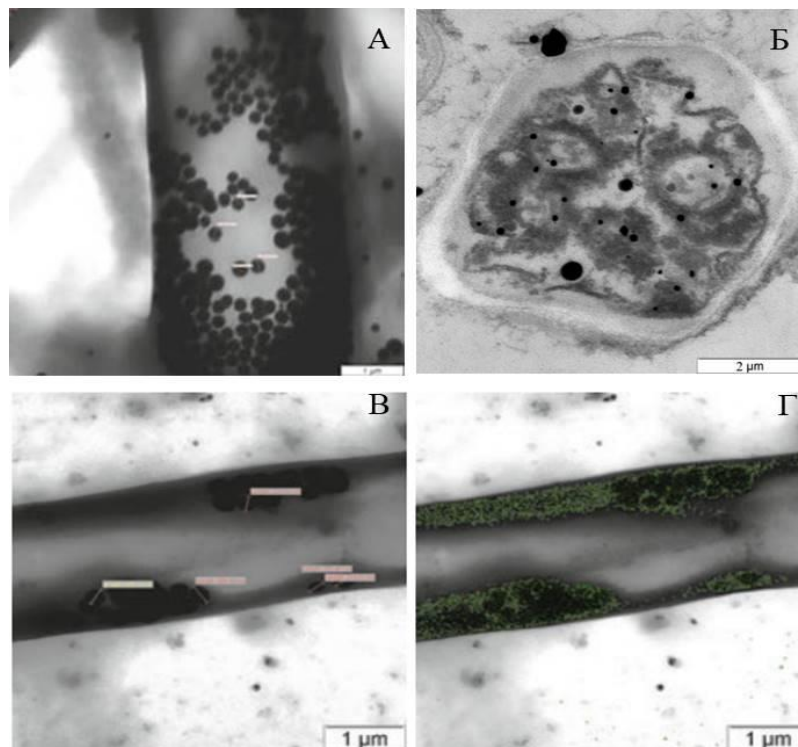
Спектры элементов Au (А), Ag (Б) и Se (В); контроль (Г).

Рисунок 128 – Рентгенофлуоресцентный анализ наночастиц золота, серебра и селена, образованных ксилотрофными базидиомицетами в среде выращивания (Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

7.5 Характеристика наночастиц с помощью электронно-спектроскопического изображения (ESI) и спектроскопии энергетических потерь электронов (EELS)

Аккумулировать селен способны различные микроорганизмы, но не все накапливают элемент в виде наночастиц. До недавнего времени, в особенности у грибов, исследовалось накопление селена только в органической форме в составе селенсодержащих аминокислот и белков (Du *et al.*, 2007; Maseko *et al.*, 2013; Assunção *et al.*, 2014). Для подтверждения того, что базидиомицеты (на примере *L. edodes*) способны накапливать элементный селен в виде наночастиц, мы провели ряд экспериментов с применением методов ПЭМ, для получения микрофотографий мицелия, в том числе поперечных срезов с накопленными внутри клеток электронплотными нанообразованиями (Рисунок 129Б). И спектроскопии энергетических потерь электронов (EELS), для подтверждения того, что данные частицы являются селеном. С использованием электронного микроскопа в режиме электронно-спектроскопического изображения (EELS в режиме Electron spectroscopic imaging – ESI analysis) была получена карта распределения селена, и было показано, что включения образованы селеном (Рисунок 129Г). В

исследуемых образцах выявлен Se^0 путем получения спектра, характерного для данного элемента (Рисунок 130Б); спектр оказался идентичным спектру элементного селена, заложенному в базу программного обеспечения Libra 120 (Carl Zeiss) (Рисунок 130А).



Масштабная линейка – 1 мкм.

Рисунок 129 – ПЭМ клеток *L. edodes* (А, В), поперечного среза гифы (Б) с наночастицами селена (Se^0) и карта распределения селена, созданная EELS (Libra 120 «Carl Zeiss») (Г) (Vetchinkina *et al.*, 2013 <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2689-5>)

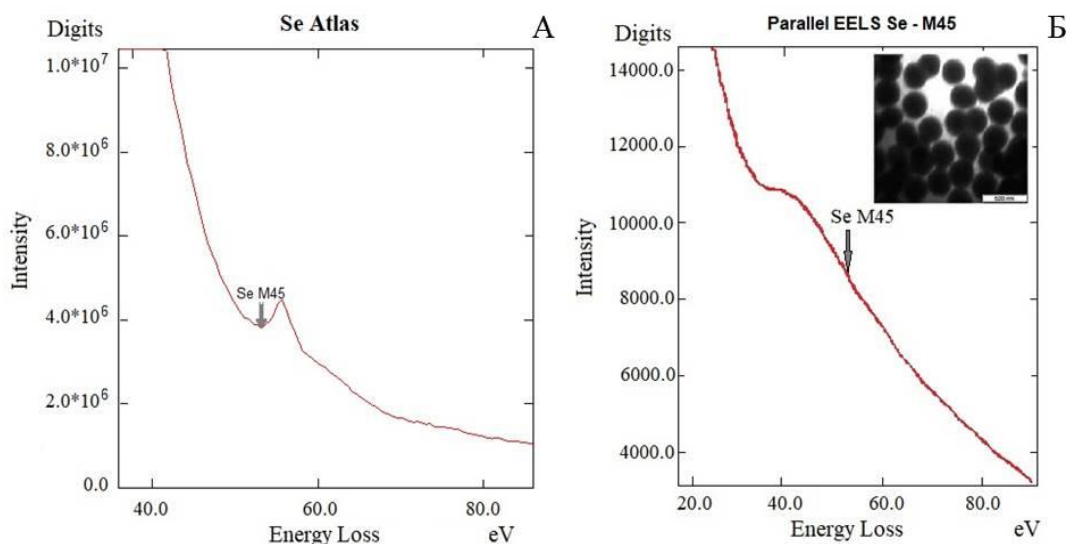


Рисунок 130 – ПЭМ наночастиц селена (Se^0), полученных после разрушения мицелия *L. edodes* и спектр частиц EELS (Б). Контрольный спектр Se^0 из атласа ESI EELS (Libra 120 «Carl Zeiss») (А) (Vetchinkina *et al.*, 2013 <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2689-5>)

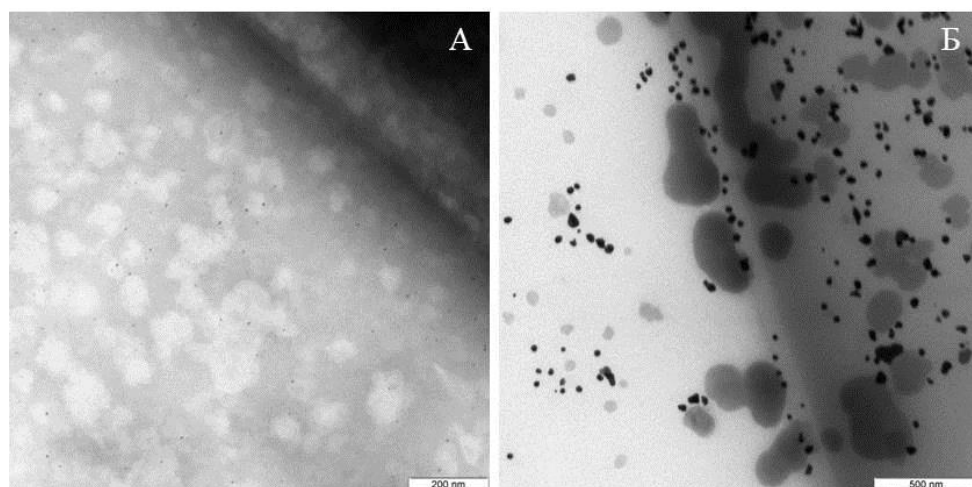
В контрольных культурах, выращенных при глубинном культивировании без добавления к среде ионов металлов и металлоидов, электронно-плотных образований внутри, на поверхности

гиф, а также в культуральной среде, методами электронной микроскопии обнаружено не было.

7.6 Биоредукция соединений HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 почвенными базидиомицетами *A. arvensis* и *A. bisporus* с образованием наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 , условия восстановления, характеристика и локализация

7.6.1 Образование наночастиц золота почвенными базидиомицетами. ПЭМ

Сапротрофные грибы обладают способностью разлагать различные органические и неорганические субстраты, секретируя в окружающую среду гидролитические ферменты и органические кислоты (Fungal Applications, 2016). Чрезвычайно эффективные ферментативные системы сапротрофных грибов, наряду с ксилотрофами, позволяют им разрушать сложные небелковые полимеры, такие как лигноцеллюлоза и хитин, труднодоступные или полностью недоступные для большинства прокариот. Благодаря своей высокой ферментативной активности, а также простоте выращивания и нетоксичности мицелия, культуры съедобных базидиомицетов являются благоприятным объектом для получения наночастиц, оставаясь, тем не менее, недостаточно изученными в этой области по сравнению с бактериями и низшими грибами. Шампиньоны – грибы, принадлежащие к роду *Agaricus* – имеют большое хозяйственное значение. Большая часть видов шампиньонов пригодна в пищу, а шампиньон двуспоровый (*Agaricus bisporus*) широко выращивается в промышленных масштабах и является одним из самых популярных культивируемых грибов в мире. В немногочисленных научных публикациях, посвященных исследованию получения наночастиц при помощи шампиньонов, используются только плодовые тела этих грибов, приобретенные коммерчески или собранные в природных условиях. Так, для экстрактов плодовых тел *A. bisporus* показана способность к восстановлению серебра с образованием наночастиц (Narasimha *et al.*, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2013; El-Sonbaty, 2013; Manzoor-ul-haq *et al.*, 2014; Sudhakar *et al.*, 2014).



Масштабная линейка – 200 и 500 нм.

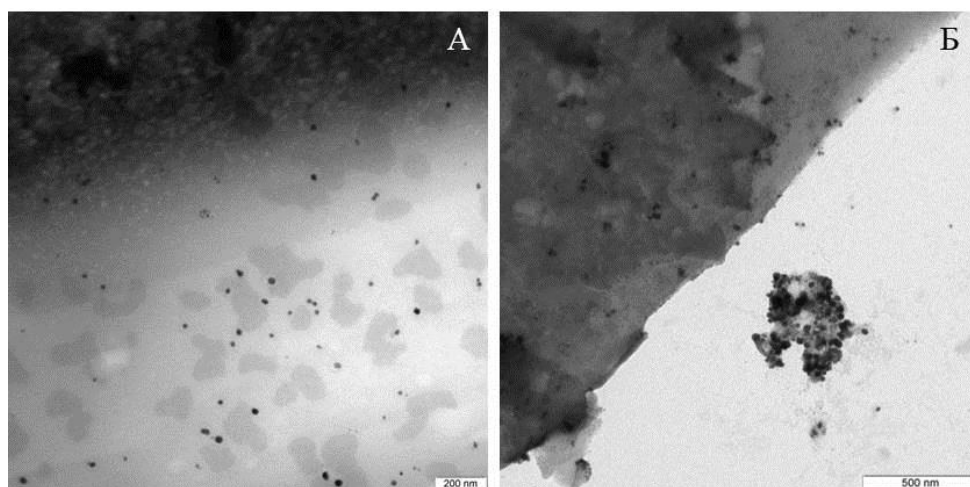
Рисунок 131 – ПЭМ мицелиальных гиф почвенных базидиомицетов и биологически синтезированных из HAuCl_4 золотых наночастиц (Au^0); *A. bisporus* (А) и *A. arvensis* (Б)

Кроме того, сообщается о получении наночастиц золота методом микроволнового синтеза с использованием экстракта плодовых тел шампиньона двуспорового в качестве восстанавливающего и стабилизирующего агента (Eskandari-Nojehdehi *et al.*, 2016). В то же время, отсутствуют работы с использованием полученных в лабораторных условиях чистых культур данных грибов, вегетативного мицелия и культуральной жидкости *A. bisporus*. Также остаются неизученными в плане миконанотехнологий другие виды рода *Agaricus*.

В результате проведенных нами исследований, при инкубации культуральной жидкости *A. bisporus* с золотохлористоводородной кислотой образовывались мелкие наносферы золота диаметром 2–5 нм; у *A. arvensis* золотые наночастицы достигали 50 нм в диаметре и были неправильной сферической формы (Рисунок 131).

7.6.2 Образование наночастиц серебра почвенными базидиомицетами. ПЭМ

При взаимодействии нитрата серебра с почвенными сапротрофами, синтезировались отдельно расположенные мелкие однородные частицы сферической формы, в случае с *A. bisporus* (Рисунок 132А) или неправильной сферической формы в конгломератах, в случае с *A. arvensis* (Рисунок 132Б). Размер наночастиц в первом случае составлял около 10 нм, во втором – 30–50 нм.

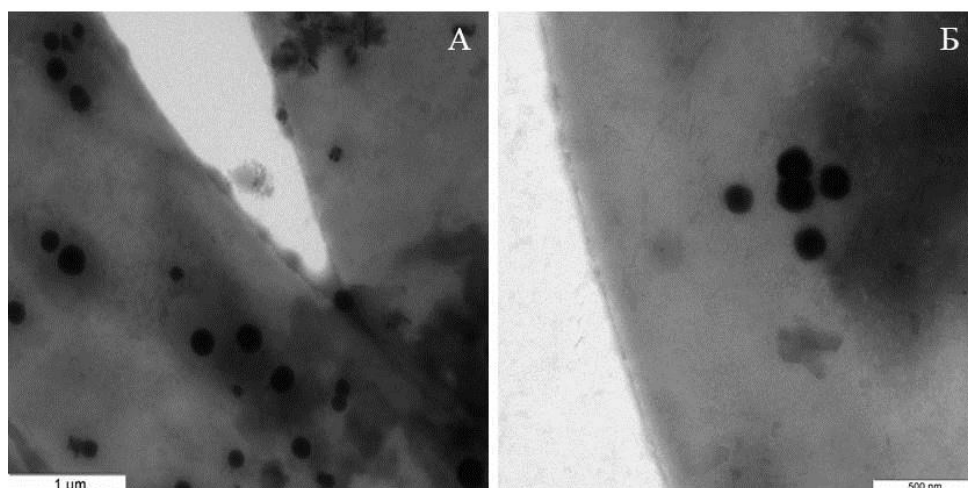


Масштабная линейка – 200 и 500 нм.

Рисунок 132 – ПЭМ мицелиальных гиф почвенных базидиомицетов и биологически синтезированных из AgNO_3 серебряных наночастиц (Ag^0); *A. bisporus* (А) и *A. arvensis* (Б) (Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

7.6.3 Образование наночастиц селена почвенными базидиомицетами. ПЭМ

При выращивании *A. arvensis* и *A. bisporus* с Na_2SeO_3 в условиях глубинного культивирования, в среде и на поверхности гиф, по данным ПЭМ, были обнаружены наночастицы селена, которые не агрегировали между собой. Частицы представляли собой правильные сферы, как крупные, так и мелкие, диаметром от 30 до 300 нм. Заметных различий в синтезе наночастиц селена между видами рода *Agaricus* обнаружено не было (Рисунок 133А, Б).

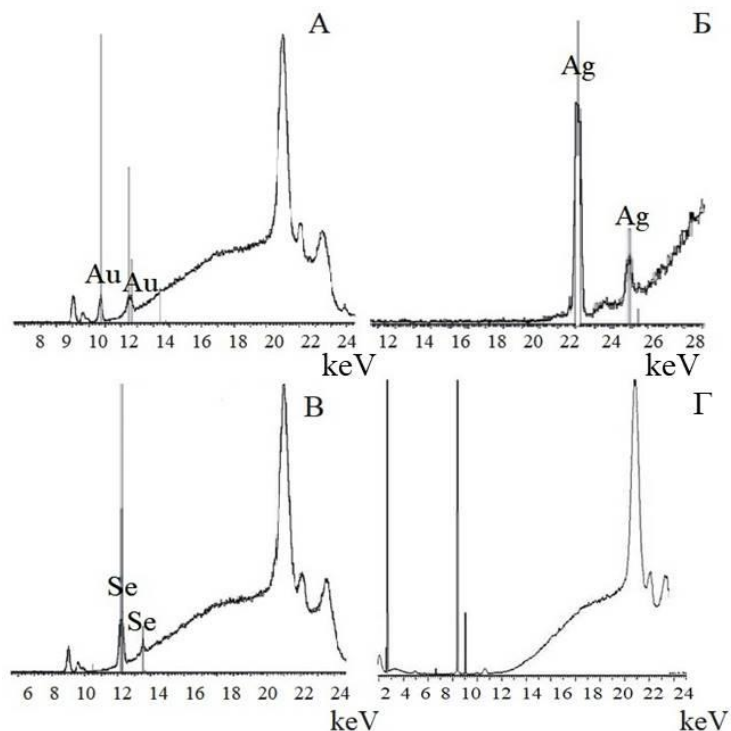


Масштабная линейка – 500 нм и 1 мкм.

Рисунок 133 – ПЭМ мицелиальных гиф почвенных базидиомицетов и биологически синтезированных из Na_2SeO_3 селеновых наночастиц (Se^0); *A. bisporus* (А) и *A. arvensis* (Б)

7.7 Исследование наночастиц золота, серебра и селена в среде культивирования почвенных базидиомицетов методом рентгеновской флуоресценции

Для электронно-плотных нанообразований, синтезированных в среде выращивания почвенных сапротрофов *A. bisporus* и *A. arvensis*, были получены спектры, в которых отмечено, также как и для ксилотрофных грибов, появление эмиссионных линий, характерных для изучаемых элементов (Рисунок 134).



Спектры элементов Au (А), Ag (Б) и Se (В); контроль (Г).

Рисунок 134 – Рентгенофлуоресцентный анализ наночастиц золота, серебра и селена, образованных ксилотрофными базидиомицетами в среде выращивания (Loshchinina, Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.002>)

Можно отметить меньшую интенсивность спектров, по сравнению со спектрами, снятыми для ксилотрофных базидиомицетов, что возможно говорит о меньшей концентрации элементов в среде культивирования (Рисунки 128 и 134). Наличие золота было определено по линиям при $L\alpha 1 - 9.713$; $L\beta 1 - 11.443$; $L\beta 2 - 11.585$; $L\gamma - 10.308$; $Ly 1 - 13.382$ keV; наличие серебра по линиям при $L\alpha 1 - 22$ и $L\beta 1 - 25$ keV; присутствие селена было отражено в спектре в появлении интенсивных эмиссионных линий при $L\alpha 1 - 11.22$ и $L\beta 1 - 12.49$ keV (Рисунок 134А–В). Данные элементы были выявлены как у почвенного базидиомицета *A. bisporus*, так и у гумусового сапротрофа *A. arvensis*. Спектры, снятые для контрольных культур, показали отсутствие данных эмиссионных линий (Рисунок 134Г).

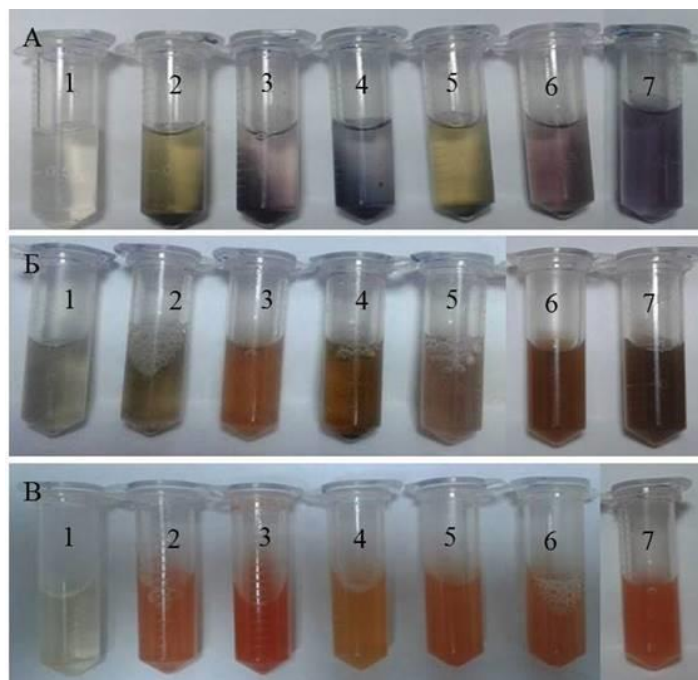
7.8 Восстановление ионов металлов и металлоидов внеклеточными и внутриклеточными экстрактами ксилотрофных и почвенных базидиомицетов

Физико-химические свойства, биологическая активность и степень токсичности наночастиц зависят от их размера и формы (Peng *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2003; Gatoo *et al.*, 2014; Kulkarni & Muddapur, 2014; Ivask *et al.*, 2014; Shang *et al.*, 2014), и эта зависимость требует новых методов получения наночастиц с необходимыми свойствами и характеристиками. Синтез наночастиц базидиомицетами менее изучен по сравнению с синтезом низшими грибами и бактериями, и о нем стали сообщать лишь недавно. В большинстве исследований использовались грибные культуры *in vivo*; однако такие культуры содержат множество неопознанных ферментов и других веществ, и результаты часто невоспроизводимы. Более того, не проводилось никаких сравнений способностей грибов или их метаболитов эффективно создавать однородные, стабильные наночастицы необходимого химического состава, формы и размера.

В нашей работе было проведено исследование по выяснению, как фильтраты культуральной жидкости и внутриклеточные экстракты ксилотрофных *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *G. frondosa* и почвенных базидиомицетов *A. bisporus*, *A. arvensis* могут быть использованы для синтеза наночастиц Au, Ag и Se *in vitro*. Также был изучен синтез наночастиц с экстрактами разных стадий морфогенеза грибов. При инкубации $HAuCl_4$, $AgNO_3$ и Na_2SeO_3 с фильтратами культуральной жидкости (внеклеточными экстрактами) и внутриклеточными экстрактами используемых грибов растворы приобретали характерную красно-сиреневую, рыже-коричневую и оранжево-красную окраску (Рисунок 135).

Такая окраска, как уже упоминалось, свидетельствует о синтезе и накоплении элементарных Au^0 , Ag^0 и Se^0 , соответственно (Philip, 2009; Popescu *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2009; Igarani, 2011). Оттенки и интенсивность окраски растворов различались в зависимости от вида грибов и, в частности, от типа экстракта. Эти различия указывали на то, что образовались частицы разной формы и размера. Данные результаты, о способности вне- и внутриклеточных экстрактов к восстановлению ионов металлов и металлоидов, включая биоформирование

наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 , согласуются с нашими более ранними результатами, полученными с базидиомицетами, выращенными в погруженном состоянии с HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 . Мы показали *in vivo*, что живые культуры могут производить наночастицы и откладывать их в больших количествах на поверхности и внутри гиф мицелия, а также внеклеточно.

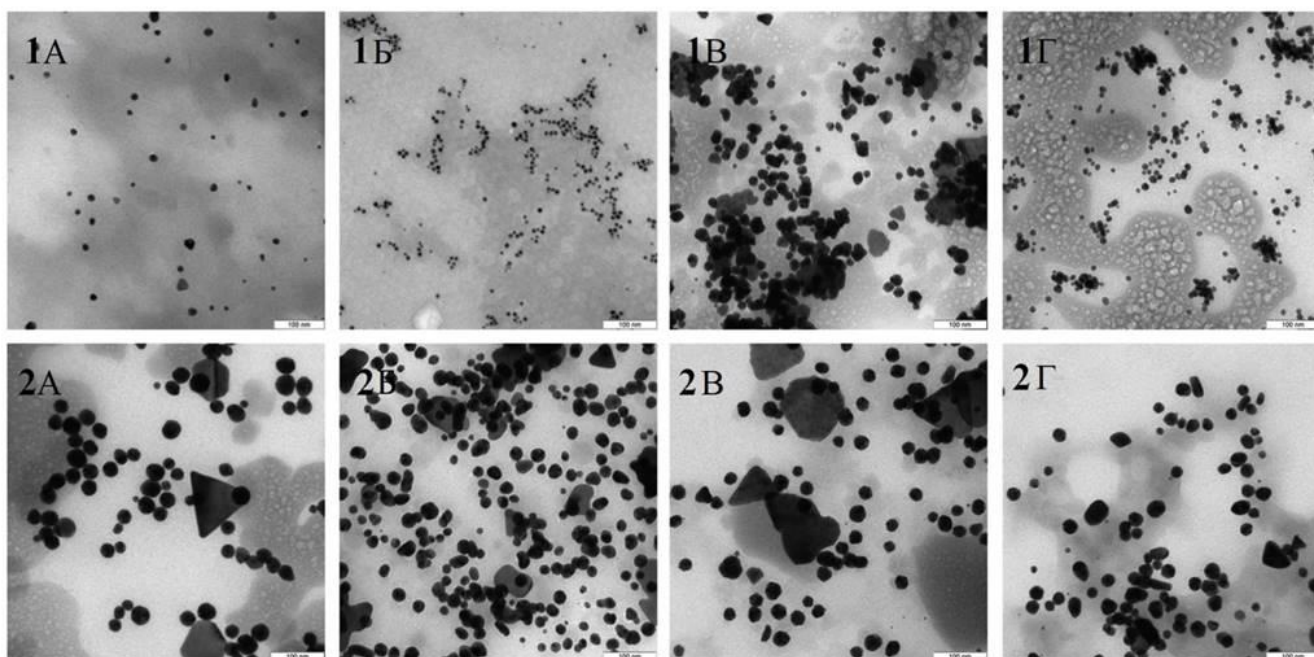


А – золото, Б – серебро, В – селен; 1 – контроль, 2 – *P. ostreatus*, 3 – *L. edodes*, 4 – *G. lucidum*, 5 – *G. frondosa*, 6 – *A. bisporus*, 7 – *A. arvensis*.

Рисунок 135 – Биосинтез наночастиц с использованием культуральных жидкостей базидиомицетов

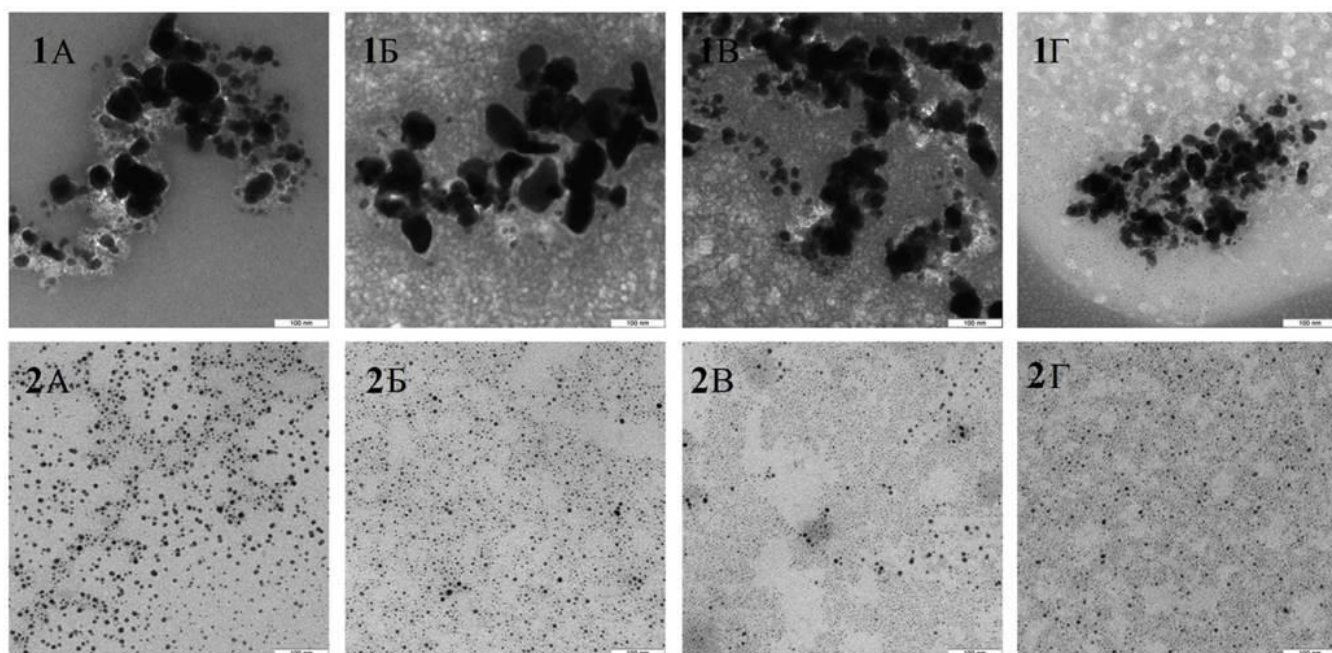
7.8.1 Восстановление Au^0 , Ag^0 и Se^0 внеклеточными и внутриклеточными экстрактами ксилотрофных базидиомицетов. ПЭМ

По результатам ПЭМ было показано, что в зависимости от типа экстракта и восстанавливаемого соединения наночастицы, полученные разными грибами, сильно различаются по форме и размерам. Восстановление HAuCl_4 внеклеточными экстрактами позволило получить достаточно однородные, преимущественно сферические частицы диаметром от 2 до 20 нм (Рисунок 136-1). У *G. lucidum* частицы были крупнее, менее однородны и часто слипались в агрегаты (Рисунок 136-1В). Частицы золота, полученные с использованием внутриклеточных экстрактов, были в семь раз крупнее, чем частицы, полученные с использованием внеклеточных экстрактов. Некоторые частицы гексагональной, тетрагональной и треугольной формы были еще крупнее (50–100 нм) (Рисунок 136-2). Синтезированные наночастицы Au^0 имели пик плазмонного резонанса при 550 нм. ζ -потенциалы коллоидного Au^0 находились в пределах от –15 до –27 мВ. Коллоиды наночастиц Au^0 были стабильны (исключение *G. lucidum*), частицы не агрегировали и не флоккулировали в течение 90 дней при 4°C.



Масштабная линейка – 100 нм.

Рисунок 136 – ПЭМ наночастиц Au^0 , полученных из HAuCl_4 с внеклеточными (1) и внутриклеточными (2) экстрактами *L. edodes* (А), *P. ostreatus* (Б), *G. lucidum* (В) и *G. frondosa* (Г) (Vetchinkina et al., 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)



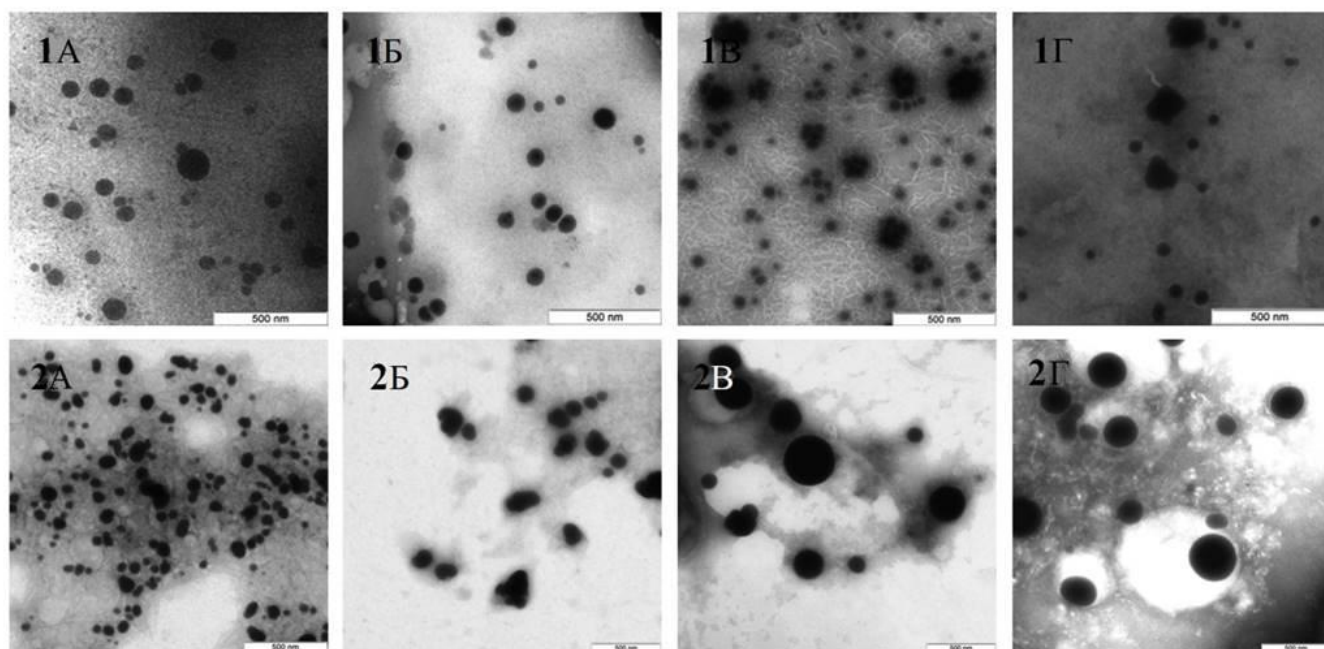
Масштабная линейка – 100 нм.

Рисунок 137 – ПЭМ наночастиц Ag^0 , полученных из AgNO_3 с внеклеточными (1) и внутриклеточными (2) экстрактами *L. edodes* (А), *P. ostreatus* (Б), *G. lucidum* (В) и *G. frondosa* (Г) (Vetchinkina et al., 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

При восстановлении AgNO_3 внеклеточными экстрактами образовавшиеся частицы были крупными, неправильной формы и агрегированными (Рисунок 137-1). ζ -потенциалы

коллоидных растворов Ag^0 находились в пределах от -9 до -12 мВ. С экстрактами мицелия образовывались очень мелкие однородные частицы диаметром от 1 до 5 нм (Рисунок 137-2). ζ -потенциал этих частиц составлял 20 мВ. Коллоиды были стабильны, частицы не агрегировали и не флоккулировали в течение 30 дней при 4°C . UV-vis-спектроскопия суспензии наночастиц Ag^0 в культуральной жидкости показала основной пик поглощения при 370 нм.

Частицы Se^0 , образующиеся с экстрактами грибов, имели правильную сферическую форму (Рисунок 138). У *L. edodes* (Рисунок 138-1А, 2А) и *P. ostreatus* (Рисунок 138-1Б, 2Б) различия между использованием внеклеточных и внутриклеточных экстрактов были небольшими, а диаметр частиц колебался от 50 до 150 нм. Внутриклеточные экстракты *G. lucidum* (Рисунок 138-2В) и *G. frondosa* (Рисунок 138-2Г) образовывали частицы большего диаметра (около 200–300 нм), а их внеклеточные экстракты – наносферы размером 20–50 нм, часто агрегированные (Рисунок 138-1В, 1Г). Синтезированные наночастицы Se^0 имели пик плазмонного резонанса при 350 нм. ζ -потенциалы коллоидного Se^0 находились в пределах от -12 до -18 мВ.



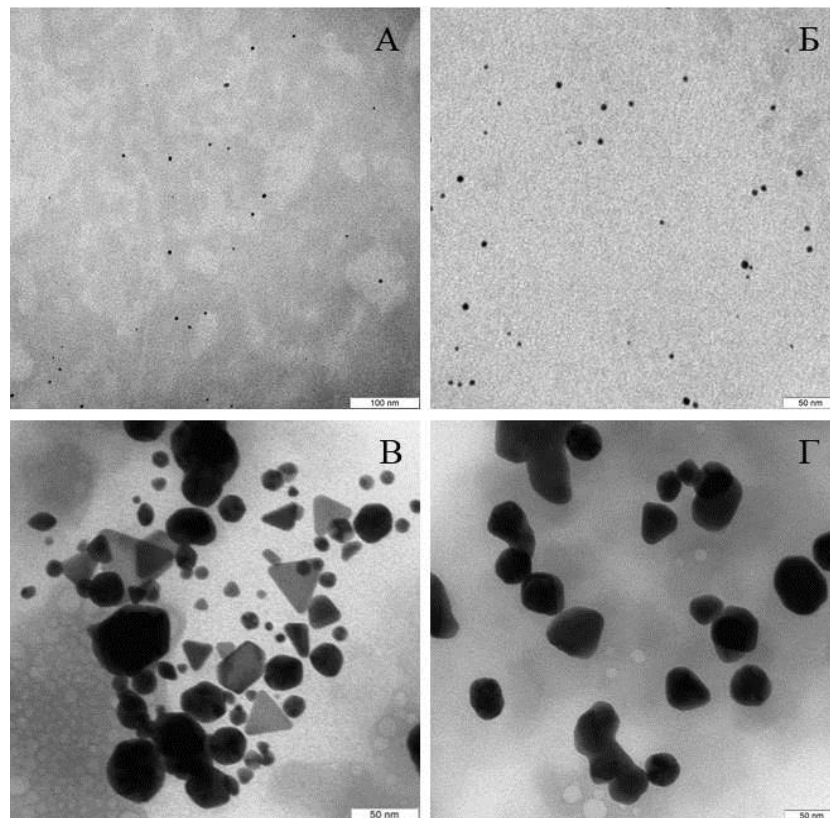
Масштабная линейка – 500 нм.

Рисунок 138 – ПЭМ наночастиц Se^0 , полученных из Na_2SeO_3 с внеклеточными (1) и внутриклеточными (2) экстрактами *L. edodes* (А), *P. ostreatus* (Б), *G. lucidum* (В) и *G. frondosa* (Г) (Vetchinkina et al., 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

7.8.2 Восстановление Au^0 , Ag^0 и Se^0 внеклеточными и внутриклеточными экстрактами почвенных базидиомицетов. ПЭМ

Также изучали биосинтез наночастиц при помощи экстрактов культур почвенных сапротрофов *A. bisporus* и *A. arvensis*, образцы внутриклеточных экстрактов из мицелия и бесклеточных культуральных жидкостей инкубировали с 0.5мМ AgNO_3 , Na_2SeO_3 и 50мкМ

HAuCl₄. При добавлении соединений золота, серебра и селена к культуральным жидкостям и к экстрактам мицелия шампиньонов наблюдалось изменение окраски образцов и образование суспензий красно-сиреневого, бурого и оранжево-красного цвета, соответственно. Оттенок цвета, скорость развития и интенсивность окраски, устойчивость полученных суспензий наночастиц различались в зависимости от вида, типа экстракта и вносимого элемента, что может свидетельствовать об образовании наночастиц разного размера и формы.



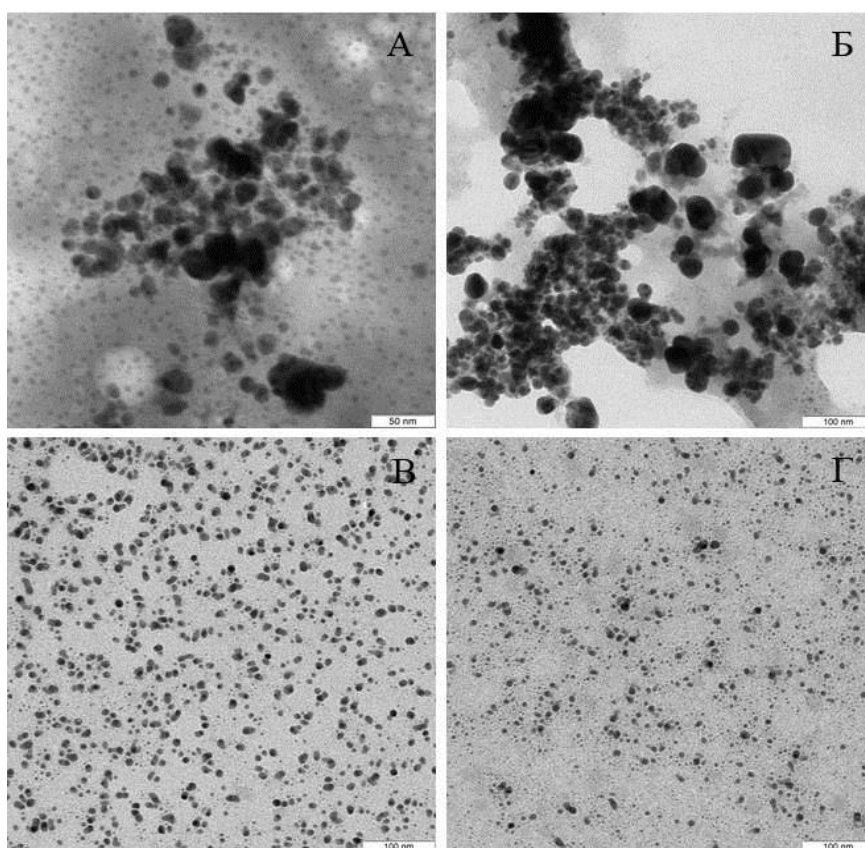
Масштабная линейка – 50 и 100 нм.

Рисунок 139 – ПЭМ наночастиц Au⁰, полученных из HAuCl₄ с внеклеточными (А, Б) и внутриклеточными (В, Г) экстрактами *A. bisporus* (А, В) и *A. arvensis* (Б, Г) (Loshchinina, Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.002>)

Необходимо отметить, что изменение цвета при инкубации с соединениями золота, серебра и селена с образцами экстрактов и культуральных жидкостей происходило значительно быстрее (через 10–15 минут с HAuCl₄ и AgNO₃ и через 30 минут с Na₂SeO₃), чем при выращивании культур на средах с добавлением данных соединений, где появление окрашивания происходило не ранее, чем через несколько суток. Полученные суспензии наночастиц также исследовали с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии. Было установлено, что форма, размер и степень агрегации частиц между собой различаются в зависимости от используемого экстракта и вида шампиньонов. При инкубации культуральной жидкости шампиньонов с HAuCl₄ образовывались мелкие наносферы золота диаметром 2–5 нм; у *A. arvensis* отдельные частицы достигали 10 нм (Рисунок 139А, Б). В то же время золотые

наночастицы, полученные с помощью мицелиальных экстрактов, резко отличались по размеру и форме. У *A. bisporus* наночастицы были в несколько раз крупнее, чем при использовании культуральной жидкости, и содержали некоторое количество еще более крупных частиц (30–100 нм) шести-, четырех- и треугольной формы (Рисунок 139В). С экстрактом *A. arvensis* образовывались наночастицы неправильной формы размером 25–50 нм (Рисунок 139Г).

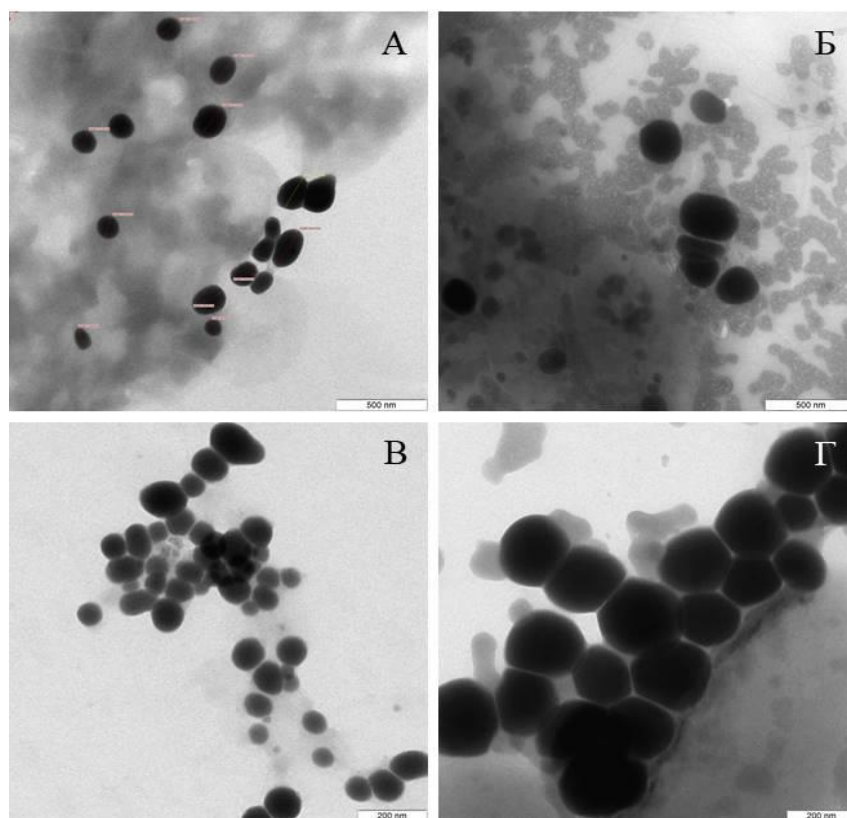
Обратная картина наблюдалась в опыте с серебром. При взаимодействии нитрата серебра с культуральной жидкостью *A. bisporus* и *A. arvensis* синтезировались частицы сферической или неправильной формы, слипавшиеся в конгломераты (Рисунок 140А, Б), тогда как с мицелиальными экстрактами образовывались мелкие однородные частицы 1–10 нм (Рисунок 140В, Г).



Масштабная линейка – 50 и 100 нм.

Рисунок 140 – ПЭМ наночастиц Ag^0 , полученных из AgNO_3 с внеклеточными (А, Б) и внутриклеточными (В, Г) экстрактами *A. bisporus* (А, В) и *A. arvensis* (Б, Г) (Loshchinina, Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.002>)

В результате инкубирования Na_2SeO_3 с культуральной жидкостью шампиньонов образовывались сферические частицы селена, диаметр которых у *A. bisporus* составил 100–250 нм, а у *A. arvensis* – 150–550 нм (Рисунок 141А, Б). С мицелиальными экстрактами шампиньонов синтезировались частицы меньшего размера, диаметром 40–140 нм и 100–250 нм, соответственно (Рисунок 141В, Г).



Масштабная линейка – 200 и 500 нм.

Рисунок 141 – ПЭМ наночастиц Se^0 , полученных из Na_2SeO_3 с внеклеточными (А, Б) и внутриклеточными (В, Г) экстрактами *A. bisporus* (А, В) и *A. arvensis* (Б, Г) (Loshchinina, Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.002>)

7.9 Фенолоксидазы ксилотрофных *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *G. frondosa* и почвенных *A. arvensis*, *A. bisporus* базидиомицетов, активность и участие в биоредукции соединений металлов

Результаты наших исследований показывают, что восстановление ионов и последующий синтез наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 напрямую связаны с метаболизмом грибов. Внеклеточные экстракты, содержащие белки и ферменты, и внутриклеточные экстракты одинаково эффективно восстанавливают соединения до элементарного состояния с образованием наночастиц. В микробном восстановлении соединений металлов могут участвовать микробные ферменты (Durán *et al.*, 2015; Faramarzi & Forootanfara, 2011; Sanghi *et al.*, 2011; El-Batalet *et al.*, 2015). Мощную окислительно-восстановительную систему ксилотрофных грибов образуют фенолоксилирующие ферменты – Мп-пероксидазы, лакказы и тирозиназы. Поэтому логично предположить, что эти ферменты будут играть важную роль в синтезе наночастиц.

Внутри- и внеклеточные экстракты исследовали на активность Мп-пероксидаз, лакказ и тирозиназ, поскольку эти ферменты присутствуют у грибов как вне-, так и внутриклеточно (Vetchinkina *et al.*, 2008). Фенолоксидазы были наиболее активны в погруженной культуре *L. edodes*. В глубинных культурах *P. ostreatus*, *G. lucidum* и *G. frondosa* активность фенолоксидазы

была в несколько раз ниже в зависимости от вида гриба и фермента (Рисунок 142А, Б). Такую разницу в активности можно объяснить использованием разных условий роста. При выращивании *G. lucidum* в погруженном состоянии на минеральной среде без древесного субстрата его фенолоксидазная активность была относительно низкой. Это указывает на то, что данные условия роста были необычны для этого гриба, обладающего сильным фенолоксидазным комплексом. Напротив, *L. edodes* оказался лучше приспособлен к росту в этих условиях. В экстрактах *L. edodes*, обладающих более высокой фенолоксидазной активностью, наночастицы восстанавливались и синтезировались быстрее. Уже через несколько минут инкубации растворы приобретали интенсивную красно-сиреневую (Au^0) и рыжую (Ag^0) окраску. Восстановление экстрактами других грибов происходило медленнее и занимало несколько часов.

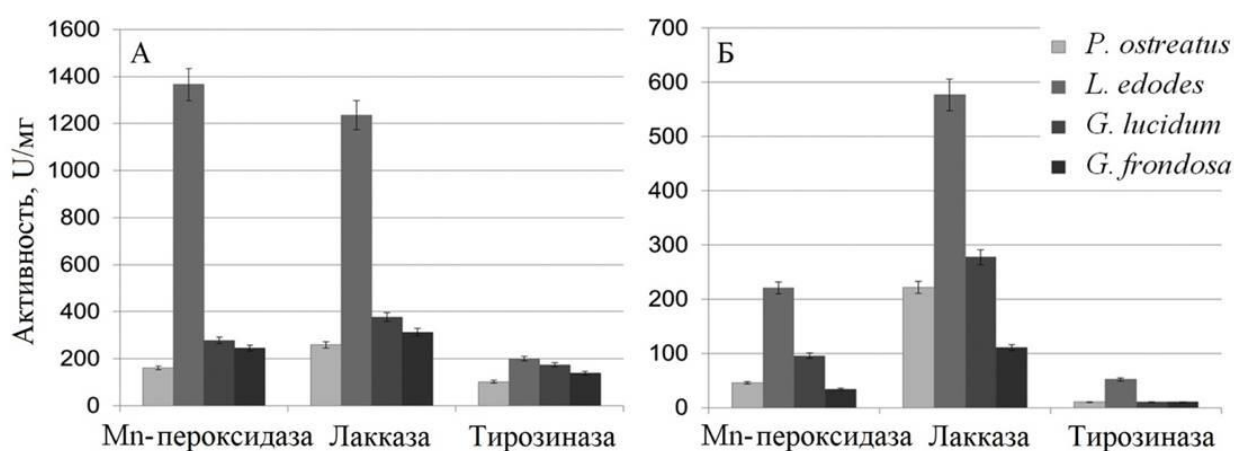


Рисунок 142 – Активность Мп-пероксидазы, лакказы и тирозиназы во внеклеточных (А) и внутриклеточных (Б) экстрактах ксилотрофных базидиомицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. lucidum* и *G. frondosa*

(Vetchinkina et al., 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

Исследование активности фенолоксилирующих ферментов (лакказ, Мп-пероксидаз, тирозиназ) в экстрактах и культуральных жидкостях *A. bisporus* и *A. arvensis* также показало наличие высокой внутри- и внеклеточной фенолоксидазной активности у обоих видов. При этом активность тирозиназы в культуральной жидкости у двух изученных видов шампиньона была практически одинаковой, а активность внеклеточных Мп-пероксидаз и лакказ – в 2–2.4 раза больше у *A. arvensis* (Рисунок 143А). Для внутриклеточных ферментов наблюдалась обратная картина: Мп-пероксидазная и лакказная активность у *A. bisporus* и *A. arvensis* были на одном уровне, тогда как активность тирозиназы – в 2.8 раза больше у *A. bisporus* (Рисунок 143Б). Можно предположить, что в биосинтезе золотых и серебряных наночастиц шампиньонами, так же как и у ксилотрофных грибов, принимают участие ферменты фенолоксидазного комплекса.

Возможно, что другие ферменты и белки, присутствующие в экстрактах, также принимают участие в биовосстановлении и синтезе частиц, и что на эти реакции влияют все восстановители вместе. Но несколько исследований показали, что ферментативный синтез с

фенолоксидазами является наиболее вероятным механизмом. Например, в восстановлении ауровых соединений участвуют лакказа аскомицета *P. variable* (Faramarzi & Forootanfara, 2011), а также лакказы и лигниназы базидиомицета *P. chrysosporium* (Sanghi *et al.*, 2011). Наночастицы Ag^0 , ассоциированные с наночастицами хлорида Ag, были получены из раствора нитрата серебра $AgNO_3$ с полуочищенной лакказой *T. versicolor* (Durán *et al.*, 2014).

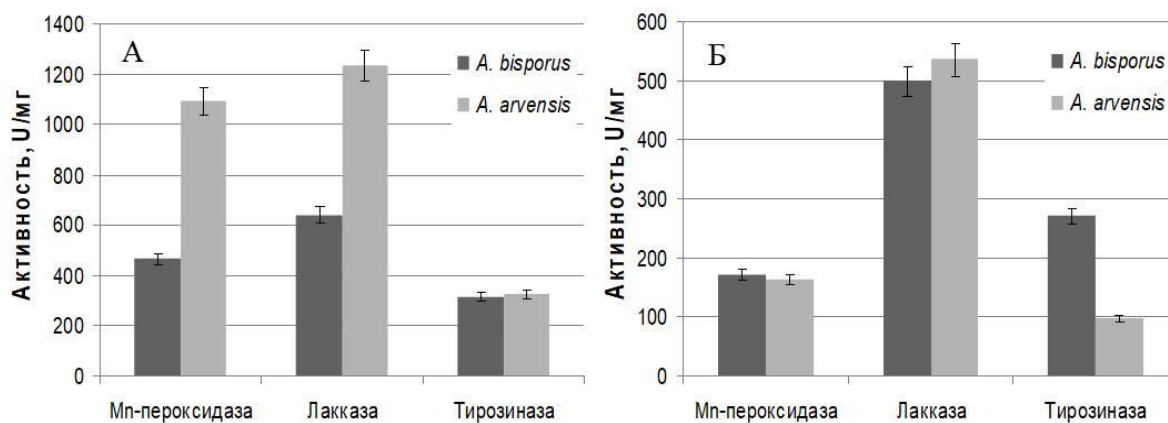


Рисунок 143 – Активность Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы во внеклеточных (А) и внутриклеточных (Б) экстрактах *A. bisporus* и *A. arvensis* (Loshchinina, Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.002>)

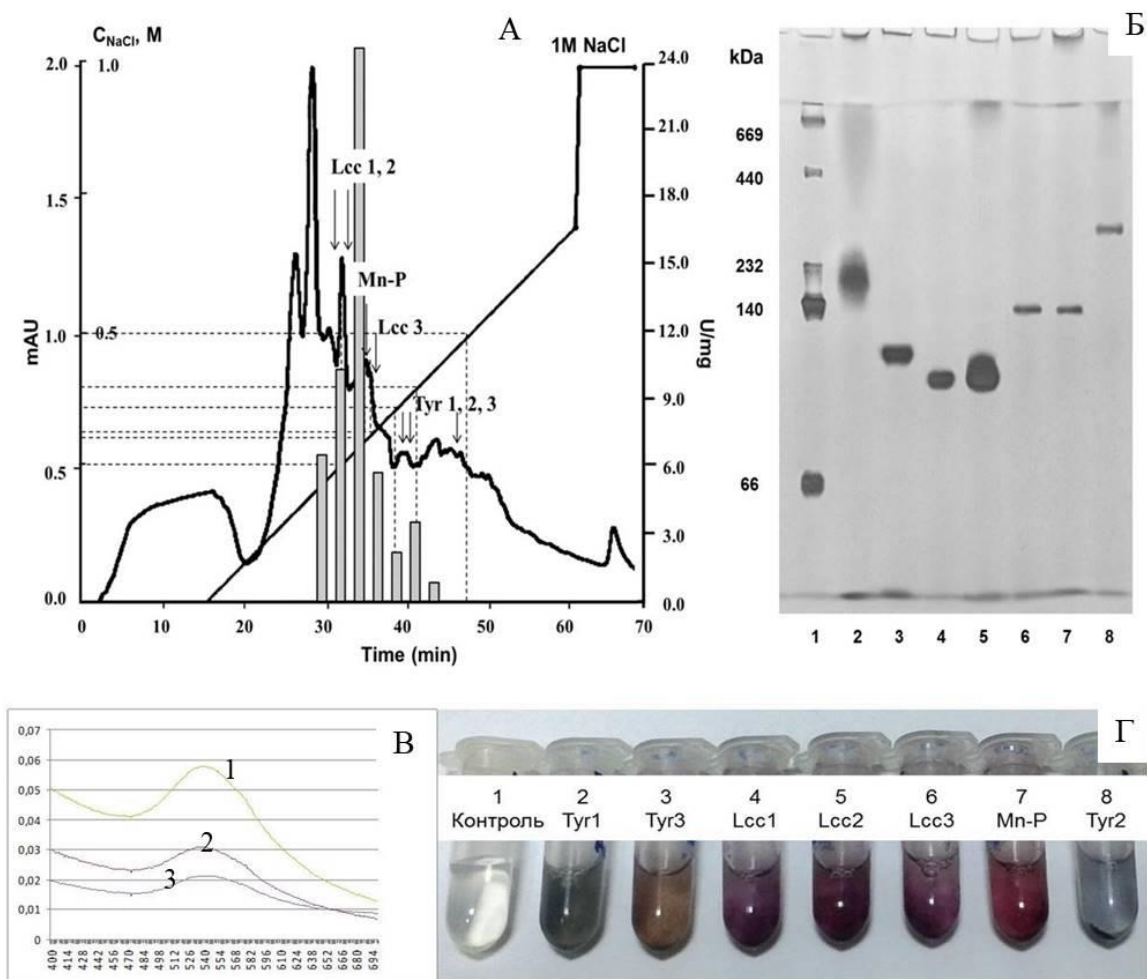
7.10 Синтез наночастиц с помощью грибных фенолокисляющих ферментов и его возможный механизм

В последние годы предпринимались попытки определить, какие именно метаболиты грибов ответственны за механизмы образования наночастиц. В единичных научных публикациях сообщается о способности биосинтеза наночастиц различных элементов, в том числе золота, широкого спектра грибных ферментов (Durán *et al.* 2015). Было высказано предположение, что в процессе биовосстановления золота участвуют оксидоредуктазы низших грибов (Ramezani *et al.*, 2010), лакказы аскомицетов *P. variable* и (Faramarzi and Forootanfar, 2011) и базидиомицета *P. ostreatus* (El-Batal *et al.*, 2015), а также лакказы и лигниназы *P. chrysosporium* (Sanghi *et al.*, 2011). Однако практически все исследования в этой области, в том числе упомянутые выше, проводятся с фильтратами культуральной жидкости, экстрактами мицелия, тогда как работы, с чистыми ферментными препаратами, выделенными и очищенными из исследуемых культур, отсутствуют.

Результаты нашей работы указывают на прямую связь между восстановлением ионов золота, последующим синтезом наночастиц и метаболизмом ксилотрофных базидиомицетов. Компоненты синтетической среды не участвуют в редукции, тогда как культуральная жидкость, содержащая продукты метаболизма грибов, включая внеклеточные белки, восстанавливает золото до его элементного состояния. Более того, наночастицы золота не только локализованы внеклеточно, но и могут синтезироваться и накапливаться в больших количествах внутри клеток. Можно предположить, что восстановление соединений золота происходит за счет фенолоксидаз, ферментов, которые у ксилотрофных грибов образуют очень сильную окислительно-

восстановительную систему. Кроме того, ранее нами было установлено, что у базидиомицетов фенолоксидазы локализуются как внутри-, так и внеклеточно (Vetchinkina *et al.*, 2008).

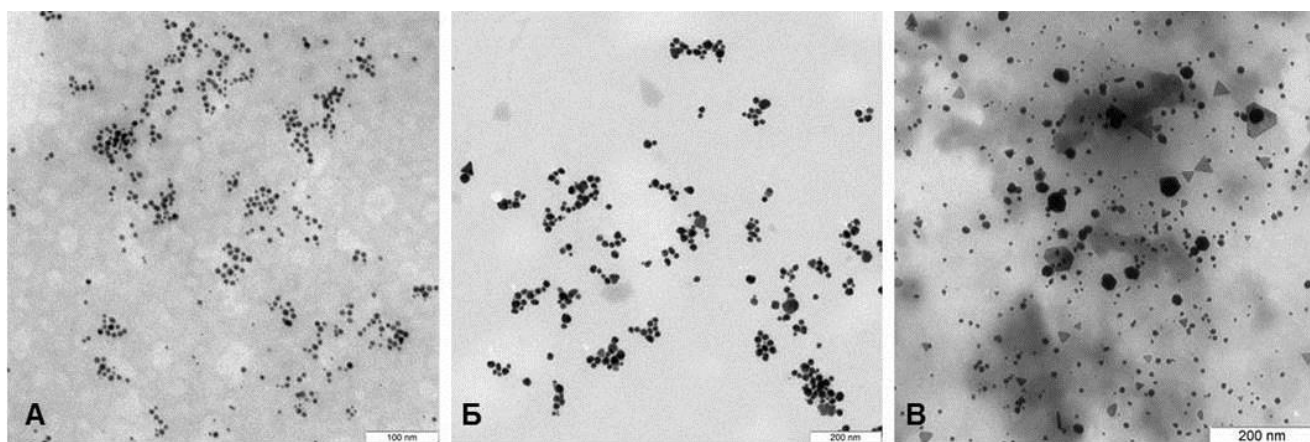
Для подтверждения предположения о том, что именно фенолоксиляющие ферменты базидиомицетов способны восстанавливать ионы металлов до элементного состояния с последующим биосинтезом наночастиц, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, из глубинной культуры гриба *L. edodes* были выделены и очищены фенолоксидазы – внутриклеточные лакказы, тирозиназы и Mn-пероксидазы. Активность ферментов определяли по способности деградировать специфичные фенольные субстраты (Glenn and Gold, 1985; Pomerantz and Murthy, 1974; Slomczynski *et al.*, 1995). Три белка, элюированные с колонки концентрацией соли NaCl 0.25–0.33 М, обладали лакказной активностью; удельная активность фермента составляла 5.8–10.2 ед/мг (Рисунок 144А).



Выделение и очистка внутриклеточных ферментов глубинной культуры *L. edodes* методом ВЭЖХ (А); хроматографически чистые лакказы (Lcc), тирозиназы (Tyr) и Mn-пероксидазы (Mn-P); нативный электрофорез ферментов в ПААГ (Б); спектры экстинкции Au⁰ биосинтезированных Mn-пероксидазой (1) лакказой (2) и тирозиназой (3) (В); суспензии наночастиц Au⁰, синтезированных под действием Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы (Г).

Рисунок 144 – Биологический синтез золотых наночастиц с помощью грибных фенолоксидаз (Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

С помощью нативного электрофореза в ПААГ установлено, что лакказы имеют примерно одинаковую молекулярную массу 100–120 кДа. Внутриклеточная Мп-пероксидаза представляла собой белок с удельной активностью 24.7 ед./мг и молекулярной массой около 200 кДа, элюированный 0.3 М концентрацией соли. Две тирозиназы молекулярной массой 140 кДа были выделены при концентрации 0.35–0.40 М NaCl, а еще одна, массой около 300 кДа – 0.5 М концентрацией соли. Удельные активности тирозиназ составили 2.1, 3.3 и 0.9 ед./мг соответственно (Рисунок 144Б). Водные растворы очищенных ферментов фенолоксидаз (внутриклеточных лакказ, тирозиназ и Мп-пероксидаз) инкубировали с 50 мкМ HAuCl_4 или 0.5 мМ AgNO_3 при комнатной температуре. Уже спустя несколько минут, в зависимости от фермента, наблюдалось появление сиреневого или красного окрашивания растворов (Рисунок 144Г). Это является признаком синтеза и накопления Au^0 или Ag^0 , причем другие белки, взятые в качестве контроля (бычий сывороточный альбумин, ряд лектинов из грибов), не обладающие фенолоксидазной активностью, не восстанавливали металлы до элементного состояния. Для подтверждения того, что суспензия наночастиц представляет собой именно Au^0 , снимали спектры экстинкции данных образцов. Полученные спектры имели максимум поглощения при длине волны 540 нм, что соответствует коллоидному золоту (Рисунок 144В). Надо отметить, что лакказы восстанавливали наночастицы, суспензии которых имели сиреневый оттенок, а Мп-пероксидазы – красный (Рисунок 144Г). По цвету коллоидного раствора можно определить, какой формы и размера восстановленные наночастицы – сиреневый цвет соответствует частицам разнообразной формы с преимущественным размером 50 нм, красный цвет дают более однородные сферические наночастицы диаметром менее 20 нм.



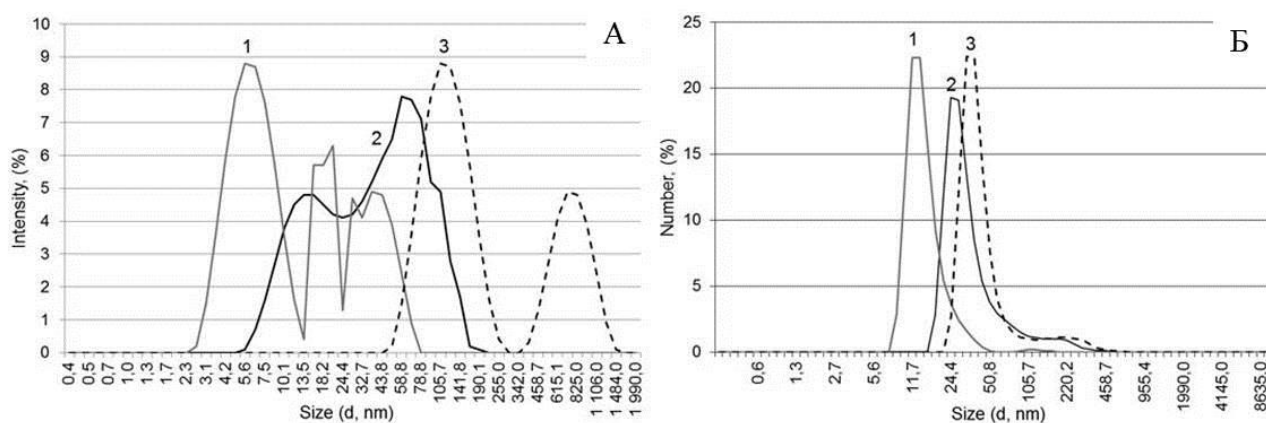
Масштабная линейка – 100 и 200 нм.

Рисунок 145 –ПЭМ золотых наночастиц Au^0 , полученных из HAuCl_4 путем восстановления Мп-пероксидазой (А), тирозиназой (Б) и лакказой (В) базидиомицета *L. edodes* (Vetchinkina *et al.*, 2017 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>)

Данное предположение подтвердили результаты просвечивающей электронной микроскопии. Как видно на представленном рисунке (Рисунок 145), наночастицы,

синтезированные под действием Мп-пероксидазы, представляют собой правильные сферы диаметром 5–20 нм (Рисунок 145А). Электронно-плотные образования сферической формы диаметром около 20 нм были образованы при помощи ферментов тирозиназ; с небольшим содержанием треугольников и тетраэдров, при помощи лакказ, размер частиц варьировал от 5 до 120 нм, с преимущественным содержанием около 30 нм (Рисунок 145Б, В).

Размер частиц золота был также оценен методом динамического светорассеяния. Полученные результаты по размеру наночастиц подтвердили данные электронной микроскопии (Рисунок 146А, Б). Дзета-потенциал коллоидного золота, синтезированного с помощью тирозиназы, составлял –19.1 мВ, лакказы –22.7 мВ и Мп-пероксидазы –23.8 мВ. ζ -потенциал определяет степень и характер взаимодействия между частицами дисперсной системы. Чем больше электрокинетический потенциал, тем устойчивее коллоид. Если данная величина («+» или «–») ≥ 30 мВ, то дисперсия будет устойчива по отношению к агрегации. В нашем случае дзета-потенциал золотых коллоидных растворов, был близок к 30 мВ, что говорит об их электростатической стабилизированности и не склонности к коагуляции или флоккуляции.



Наночастицы Au⁰ синтезированные Мп-пероксидазой (1) лакказой (2) и тирозиназой (3).

Рисунок 146 – Распределение по размеру (А) и средний размер (Б) частиц Au⁰, синтезированных из HАuCl₄ с помощью фенолоксидаз *L. edodes* (Vetchinkina *et al.*, 2014 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.018>)

Несмотря на установление способности ряда микроорганизмов восстанавливать Au³⁺, неясно, как именно протекают процессы биоредукции золотосодержащих веществ. Возможно, что у разных микроорганизмов за синтез наночастиц ответственны различные биомолекулы. Основываясь на полученных результатах по способности фенолоксидаз к биоредукции Au³⁺ до Au⁰, нами предложены вероятные схемы протекания данных реакций. Мп-пероксидазы относятся к гемсодержащим оксидоредуктазам и катализируют окислительное расщепление многих ароматических, гетероциклических, хлорорганических веществ. Активность Мп-пероксидаз зависит от наличия Мп²⁺, окисляющегося ферментом до Мп³⁺, который далее независимо воздействует на субстрат. Однако при проведении нами данного эксперимента

реакционная смесь содержала только водные растворы фермента и AgNO_3 или HAuCl_4 . Поэтому вероятно, что биовосстановление ионов Ag^+ и Au^{3+} протекает не по основному каталитическому циклу. Мы предположили, что осуществление биоредукции серебра и золота с участием Мп-пероксидаз возможно по одному из следующих механизмов.

Мп-пероксидаза в качестве простетической группы в каждой молекуле фермента содержит один протопорфирин IX с атомом Fe^{3+} . Однако подобно другим пероксидазам, при низких значениях pH способна восстанавливаться в ферри-форму со степенью окисления Fe^{2+} . Мы предполагаем, что внеклеточное восстановление AuCl_4^- осуществляется именно простетической группой каталитического центра фермента, при этом биоредукция идет в обход основного каталитического цикла. В подтверждение данной теории в эксперименте мы не вносили ионы Mn^{2+} и H_2O_2 в реакционную смесь основных субстратов фермента. В результате окислительно-восстановительной реакции происходит образование элементного золота, при этом фермент переходит в «покоящуюся» полностью окисленную форму (Vetchinkina *et al.*, 2014).

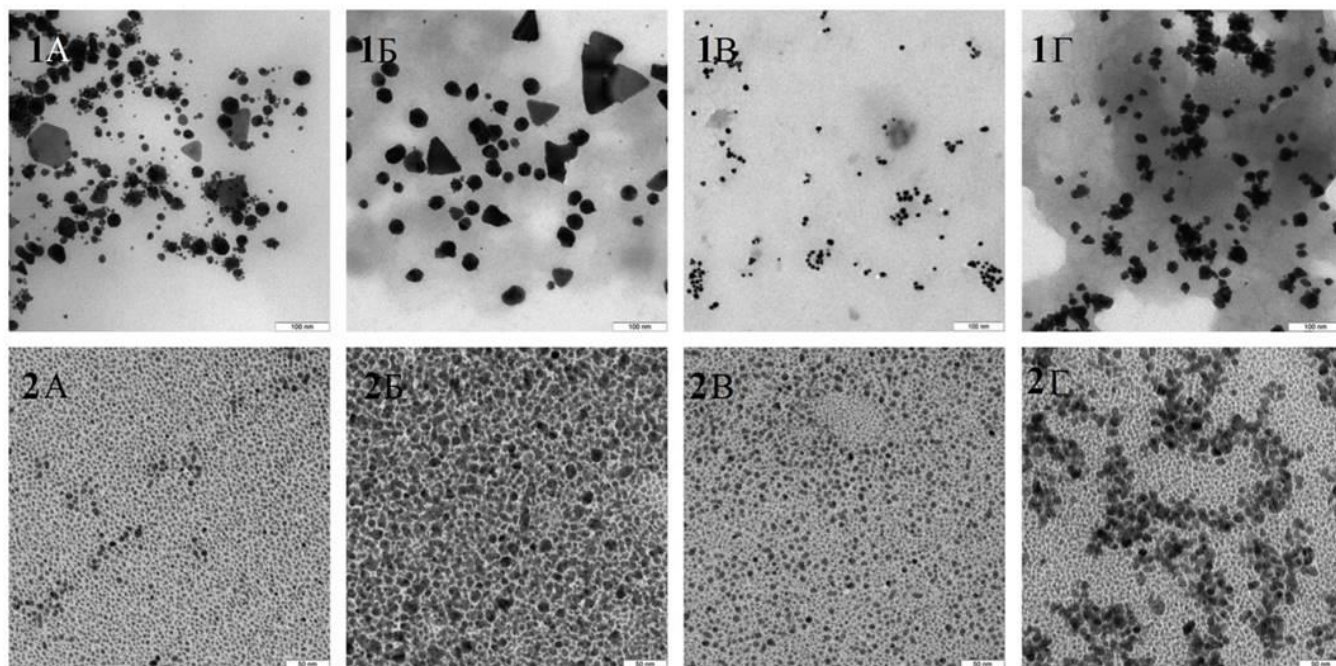
Рядом с активным центром фермента располагается остаток гистидина, являющий пятым лигандом в его молекуле. Вероятнее всего, этот остаток может образовывать своеобразную ловушку для ионов серебра. Известно, что комплекс гистидин-серебро обладает высокой константой устойчивости и энтальпии. Остаток цистеина, располагающийся в молекуле фермента рядом участком удерживания металла, может принимать участие в биоредукции серебра. Восстановление золота лакказой или тирозиназой, предположительно, идет опосредованно через образование ферментом эндогенной перекиси. При взаимодействии фермента с молекулярным кислородом в отсутствие редуцированного субстрата в одном из четырех активных центров идет образование пероксида водорода (Perna *et al.*, 2020).

Биообразование наночастиц Se из Na_2SeO_3 не зависело от активности фенолоксидаз. Возможно, в синтезе наночастиц неметаллов участвуют другие ферменты, такие как НАДН-зависимые нитрат- и нитритредуктазы. Селен существует в нескольких формах конденсированного состояния: кристаллическом (тригональном, гексагональном, α -, β - и γ -моноклинном, ромбоэдрическом, ромбическом, а также α - и β -кубическом Se), ультрадисперсном аморфном Se (красном, коричневом и черном), стекловидный Se и жидкие формы, полученные в результате плавления кристаллических модификаций (Minaev *et al.*, 2005). Красная окраска характерна для аморфной формы и для моноклинной кристаллической формы Se (Johnson *et al.*, 1999). Изменение цвета экстрактов грибов в присутствии Na_2SeO_3 до различных оттенков розового и красного, свидетельствует о восстановлении Se^{IV} до Se^0 и накоплении красного селена Se^0 . «Зеленый» синтез с помощью бактерий и грибов дает наночастицы как красного аморфного Se (Dhanjal & Cameotra, 2010; Sarkar *et al.*, 2011; Mollania *et al.*, 2016), так и кристаллического Se (Zhang *et al.*, 2011; Srivastava and Mukhopadhyay, 2013).

7.11 Синтез наночастиц с помощью внутриклеточных экстрактов из разных морфоструктур базидиомицетов

У *L. edodes* состав фенолоксидазного комплекса (внутриклеточные Мп-пероксидазы, лакказы и тирозиназы) и активность этих ферментов различаются на разных стадиях онтогенеза (Vetchinkina *et al.*, 2008; 2015). В этом исследовании оттенки цвета и стабильность суспензий различались в зависимости от того, какая морфологическая структура участвовала в восстановлении. Активность фенолоксидаз была максимальной в коричневой мицелиальной пленке базидиомицета. В этих экстрактах мы наблюдали наиболее интенсивный синтез множества мелких однородных наночастиц с образованием устойчивых коллоидных растворов Au^0 и Ag^0 . Металлические наночастицы часто синтезируют с использованием экстрактов плодовых тел грибов (Narasimha *et al.*, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2013; El-Sonbaty, 2013; Manzoor-ul-haq *et al.*, 2014; Sudhakar *et al.*, 2014). У этого подхода есть несколько сильных сторон: плодовые тела можно купить, они производят обильную биомассу для приготовления экстрактов, а сам метод не требует много времени и средств. В нашей работе экстракты плодовых тел разных грибов дали разные наночастицы Au^0 и Ag^0 . Частицы образовывались относительно быстро: цвет раствора менялся уже в течение 1–2 часов. В нескольких исследованиях с использованием экстрактов плодовых тел *A. bisporus* сообщалось о более длительных периодах синтеза – от 12 до 72 часов (Dhanasekaran *et al.*, 2013). Кроме того, размер частиц имел достаточно большой разброс (Narasimha *et al.*, 2011; Dhanasekaran *et al.*, 2013; El-Sonbaty, 2013; Manzoor-ul-haq *et al.*, 2014; Sudhakar *et al.*, 2014).

При использовании экстрактов непигментированного мицелия синтезированные частицы Au^0 имели неправильную сферическую форму и размер 2–50 нм. Также образовалось небольшое количество нанотреугольников (50–80 нм) и шестиугольников (20–90 нм) (Рисунок 147-1А). В случае с экстрактами пигментированного мицелия образовывались сферические частицы размером 10–40 нм и множество треугольников (размером до 100 нм) (Рисунок 147-1Б). Экстракты коричневой мицелиальной пленки давали однородные, преимущественно сферические частицы размером от 5 до 10 нм (Рисунок 147-1В). Экстракты примордиев восстанавливали HAuCl_4 с образованием частиц неправильной формы 10–30 нм, большая часть которых агрегировала (Рисунок 147-1Г). Наночастицы Ag^0 были более мелкими и однородными (Рисунок 147-2). Экстракты непигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки образовывали устойчивую суспензию частиц размером от 1 до 10 нм (Рисунок 147-2А, В). Напротив, частицы, образованные с использованием экстрактов пигментированного мицелия, были крупнее (5–20 нм) (Рисунок 147-2Б). Несколько иная картина наблюдалась для экстрактов из примордий *L. edodes*, наряду с мелкими однородными наночастицами (2–5 нм) наблюдалось множество частиц размером от 10 до 20 нм, слипшихся в агрегаты (Рисунок 147-2Г).

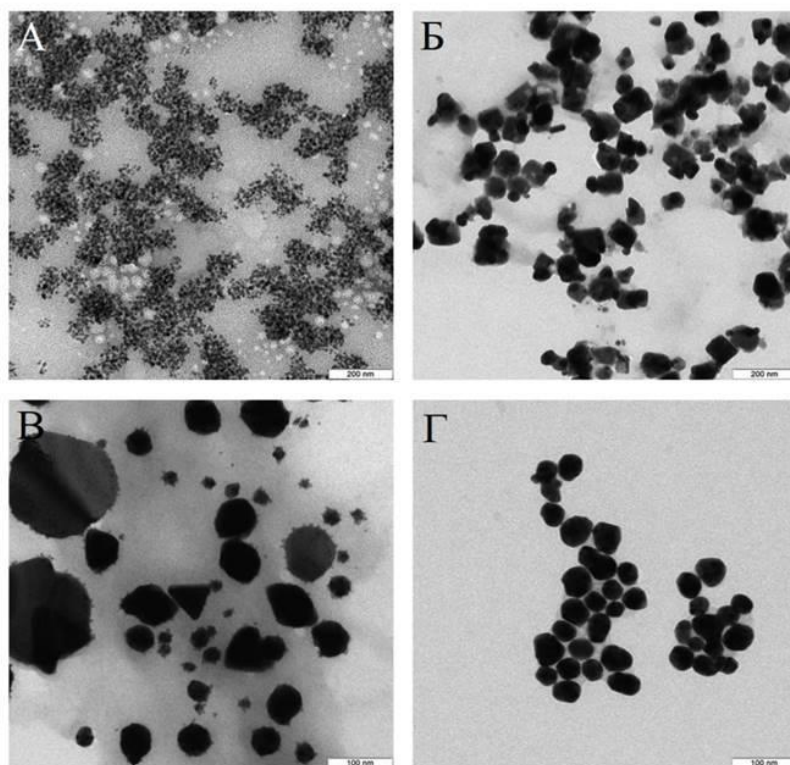


Непигментированный мицелий (А), пигментированный мицелий (Б), коричневая мицелиальная пленка (В) и примордии (Г). Масштабная линейка – 100 нм (Au^0) и 50 нм (Ag^0).

Рисунок 147 – ПЭМ наночастиц Au^0 (1) и Ag^0 (2), полученных из HAuCl_4 и AgNO_3 , соответственно, с помощью внутриклеточных экстрактов разных морфоструктур *L. edodes* (Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

В экстрактах плодовых тел *L. edodes* обнаружено множество мелких сферических наночастиц серебра Ag^0 размером от 10 до 15 нм (Рисунок 148А). У *G. lucidum* частицы были крупными (50–100 нм), преимущественно кубическими и прямоугольными (Рисунок 148Б). Инкубация HAuCl_4 с экстрактами плодовых тел *L. edodes* привела к образованию неоднородных частиц, среди них много крупных неправильных сфер размером до 170 нм, треугольников 60–90 нм и неправильных сфер размером 15–50 нм (Рисунок 148В). При использовании экстрактов плодовых тел *G. lucidum* синтезировались сферы размером 30–50 нм (Рисунок 148Г).

Сравнение результатов показывает, что наночастицы Au^0 и Ag^0 , полученные с экстрактами мицелиальной пленки *L. edodes*, однородны, имеют маленький размер и сферическую форму; следовательно, они хорошо подходят для биотехнологических применений. По данным литературы, противораковое и антимикробное действие наночастиц Ag^0 сильно зависит от их размера, формы и концентрации. Частицы меньшего диаметра лучше проникают через мембраны и повреждают бактериальные клетки (Kim *et al.*, 2012; Franci *et al.*, 2015). Характеристики наночастиц Au^0 также сильно зависят от их размера и формы. Наночастицы Au^0 небольшого размера (10–30 нм), которые также имеют сферическую и однородную форму, могут быть использованы в биомедицине, например, для лечения микробных инфекций, а также при диагностике и лечении рака (Chauhan *et al.*, 2011; Sherwani *et. al.*, 2015).



Масштабная линейка – 100 нм (Au⁰) и 200 нм (Ag⁰).

Рисунок 148 – ПЭМ наночастиц Ag⁰ (А, Б) и Au⁰ (В, Г), полученных из AgNO₃ и HAuCl₄, соответственно, с использованием внутриклеточных экстрактов плодовых тел *L. edodes* (А, Б) и *G. lucidum* (В, Г)

(Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

Полученные данные свидетельствуют о том, что использование экстрактов разных стадий морфогенеза базидиальных макромицетов позволяет получать наночастицы металлов Au⁰ и Ag⁰ заданного размера, формы и степени агрегации.

7.12 Характеристика наночастиц золота, серебра и селена, биообразованных при помощи микосинтеза

Биологически синтезированные наночастицы могут иметь разнообразную форму и размер, начиная от простых наносфер и частиц неопределенной формы до сложных и необычных структуры, как видно из наших исследований. Мы исследовали биоредукцию нескольких соединения золота, серебра и селена с образованием наночастиц, с помощью живых культур, внутри- и внеклеточных экстрактов (в том числе из разных морфоструктур) и отдельных ферментных препаратов базидиальных грибов. Наши биологические объекты – перспективные культивируемые съедобные и лекарственные ксилотрофные *L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *G. frondosa* и гумусовые базидиомицеты *A. bisporus*, *A. arvensis*, которые доступны в чистых культурах, широко используются для приготовления пищевых продуктов, биологически активных добавок и лекарств. Форма и размер наночастиц золота, серебра и селена, полученных с помощью грибов, представлены в сводной таблице (Таблица 33).

Таблица 33 – Форма и размер наночастиц золота (Au⁰), серебра (Ag⁰) и селена (Se⁰) образованных посредством «зеленого синтеза» с помощью грибов

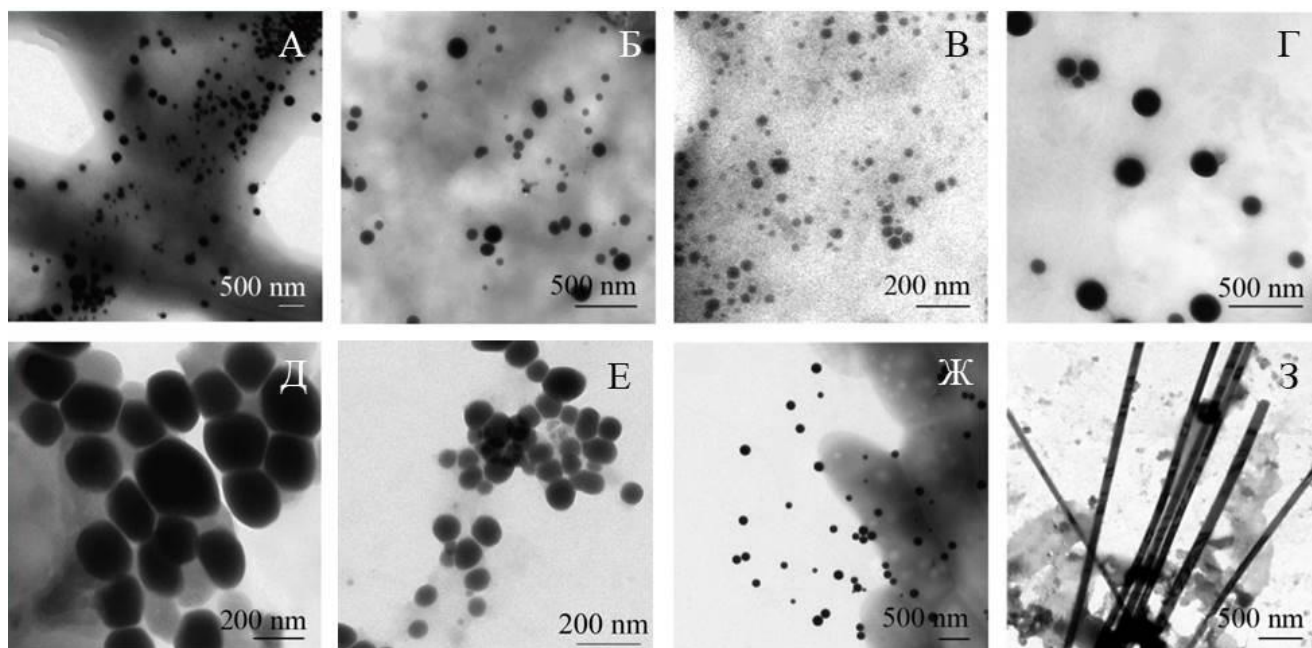
Наночастицы	Организм	Способ приготовления	Размер (нм)	Морфология
Se	<i>P. ostreatus</i>	культуральная жидкость	50–150	сферы
		мицелиальный экстракт	50–150	неправильные сферы
	<i>L. edodes</i>	культуральная жидкость	50–150	сферы
		мицелиальный экстракт	50–150	неправильные сферы
	<i>G. frondosa</i>	культуральная жидкость	20–50	сферы
		мицелиальный экстракт	100–300	сферы
	<i>G. lucidum</i>	культуральная жидкость	20–50	сферы
		мицелиальный экстракт	100–300	сферы
	<i>A. bisporus</i>	культуральная жидкость	100–250	сферы
		мицелиальный экстракт	40–140	сферы
Ag	<i>P. ostreatus</i>	среда культивирования	10–20	сферы
		культуральная жидкость	10–100	неправильные сферы
		мицелиальный экстракт	1–10	сферы
	<i>L. edodes</i>	среда культивирования	10–20	сферы
		культуральная жидкость	10–100	неправильные сферы
		мицелиальный экстракт	1–10	сферы
		бесклеточный фильтрат 2-х недельной культуры	50–250	большие шары, собранные из маленьких сфер
	<i>G. frondosa</i>	среда культивирования	10–20	сферы
		культуральная жидкость	10–100	неправильные сферы
		мицелиальный экстракт	1–10	сферы
	<i>G. lucidum</i>	среда культивирования	10–20	сферы
		культуральная жидкость	10–100	неправильные сферы
		мицелиальный экстракт	1–10	сферы
		внутриклеточный экстракт плодовых тел	20–200	частицы близкие к кубической форме
	<i>A. bisporus</i>	среда культивирования	10–20	сферы
		культуральная жидкость	10–100	неправильные сферы
		мицелиальный экстракт	1–10	сферы
	<i>A. arvensis</i>	среда культивирования	10–20	сферы
		культуральная жидкость	10–100	неправильные сферы
		мицелиальный экстракт	1–10	сферы
Au	<i>P. ostreatus</i>	среда культивирования	5–50	сферы
		культуральная жидкость	2–20	сферы
		мицелиальный экстракт	10–50 30–200	сферы, трех-, четырех- шестиугольники
	<i>L. edodes</i>	среда культивирования	5–50	сферы
		культуральная жидкость	2–20	сферы
		мицелиальный экстракт	10–50 30–200	сферы, трех-, четырех-

				шестиугольники
		внутриклеточная Mn-пероксидаза	5–20	сферы
		внутриклеточные лакказы и тирозиназа	5–30 5–120	неправильные сферы, тетраэдры, треугольники
	<i>G. frondosa</i>	среда культивирования	5–50	сферы
		культуральная жидкость	2–20	сферы
		мицелиальный экстракт	10–50 30–100	сферы, трех-, четырёх- шестиугольники
	<i>G. lucidum</i>	среда культивирования	5–50	сферы
		культуральная жидкость	5–60	неправильные сферы
		мицелиальный экстракт	10–50 30–100	сферы, трех-, четырёх- шестиугольники
	<i>A. bisporus</i>	среда культивирования	5–50	сферы
		культуральная жидкость	2–10	сферы
		мицелиальный экстракт	10–50 30–100	сферы, трех-, четырёх- шестиугольники
	<i>A. arvensis</i>	среда культивирования	5–50	сферы
		культуральная жидкость	2–10	сферы
		мицелиальный экстракт	25–50	неправильные сферы

(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Все базидиомицеты и их метаболиты, использованные в этом исследовании, участвовали в биодеградациии Na_2SeO_3 с образованием однородных частиц, представленных исключительно наносферами (Рисунок 149). Наночастицы селена, образующиеся при биодеградациии Na_2SeO_3 под воздействием культуральной жидкости ксилотрофных базидиомицетов *L. edodes* и *P. ostreatus*, имели правильную сферическую форму и диаметр от 50 до 150 нм (Рисунок 149А). При внутриклеточных экстрактах мицелия этих видов образовывались наночастицы того же размера, но менее правильной формы (Рисунок 149Б). Гомогенные наносферы размером около 20–50 нм были синтезированы с использованием бесклеточных фильтратов культуральных жидкостей *G. lucidum* и *G. frondosa*. Некоторые из них агрегировали (Рисунок 149В), и с внутриклеточными экстрактами мицелия образовывались крупные сферические частицы размером около 100–300 нм (Рисунок 149Г). Диаметр сферических частиц селена, образуемых гумусовым сапротрофом *A. bisporus*, составлял 100–250 нм, а *A. arvensis* – 150–550 нм (Рисунок 149Д). С использованием внутриклеточных белковых экстрактов *A. bisporus* и *A. arvensis* синтезированы наночастицы размером 40–140 нм и 100–250 нм соответственно (Рисунок 149Е).

Большинство исследований показали, что наночастицы селена, синтезируемые живыми организмами, представляют собой преимущественно наносферы различного диаметра (Tugarova *et al.*, 2014; Wadhwani *et al.*, 2016). Сообщений о биологическом получении наночастиц другой



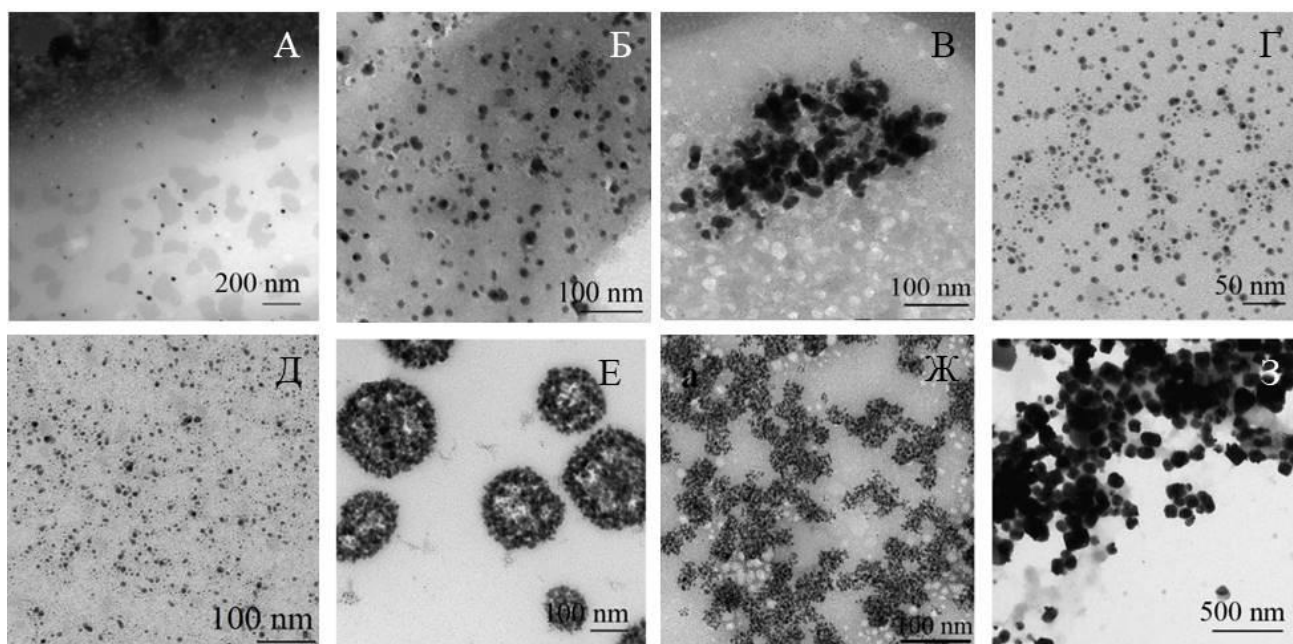
Масштабная линейка – 200, 500 нм и 1 мкм.

Образование наночастиц с помощью культуры *L. edodes* (А), внутриклеточного экстракта *P. ostreatus* (Б), бесклеточного фильтрата культуральной жидкости *G. lucidum* (В), внутриклеточного экстракта *G. frondosa* (Г), культуральной жидкости *A. arvensis* (Д), внутриклеточного экстракта *A. bisporus* (Е); с помощью культуры *A. brasilense* Sp245 (Ж) и после автоклавирования (З).

Рисунок 149 – ПЭМ наночастиц селена (Se^0), биообразованных из Na_2SeO_3 с помощью базидиальных грибов и бактерий *A. brasilense* (Vetchinkina et al., 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

формы довольно мало (Wang et al., 2010; Zhang et al., 2011; Srivastava and Mukhopadhyay, 2013; Ahmad et al., 2015). Например, бактерии рода *Azospirillum brasilense* способны восстанавливать Na_2SeO_3 с образованием наночастиц селена правильной сферической формы размером от 50 до 300 нм (Рисунок 149Ж). Автоклавирование этих наночастиц селена при давлении 1 атмосфер в течение 30 минут позволило получить нанопроволоки шириной от 20 до 150 нм и длиной более 10 мкм (Рисунок 149З). Контролем служил водный раствор 1мМ Na_2SeO_3 в малатно-солевой среде. В этих образцах ни до, ни после автоклавирования частицы не были обнаружены. Селеновые нанопроволоки не образовывались культурами грибов в описанных выше условиях и после автоклавирования (например, *L. edodes*). По-видимому, биофабрикация происходит с помощью бактериальных метаболитов при высокой температуре (Vetchinkina et al., 2019).

Наночастицы серебра имеют самый широкий диапазон размеров и форм. Различные методы позволяют получать серебряные наносферы, нанопризмы, нанопластины, нанодиски, наностержни, нанопроволоки и нанокубы (Mukherji et al., 2018). Наночастицы, полученные с помощью растений и микроорганизмов, имеют преимущественно сферическую форму, тогда как синтез кубических, гексагональных, декаэдрических, треугольных, усеченно-треугольных, стержнеобразных или дискообразных частиц встречается значительно реже (Siddiqi et al., 2018).



Масштабная линейка – 50, 100, 200 и 500 нм.

Образование наночастиц с помощью культуры *A. bisporus* (А) и *G. frondosa* (Б), бесклеточного фильтрата культуральной жидкости *G. frondosa* (В), внутриклеточного экстракта *P. ostreatus* (Г) и *A. arvensis* (Д), культуральной жидкости *L. edodes* (наночастицы, собирающиеся в сферические конгломераты «серебряные шарики») (Е), экстрактов плодовых тел *L. edodes* (Ж) и *G. lucidum* (З).

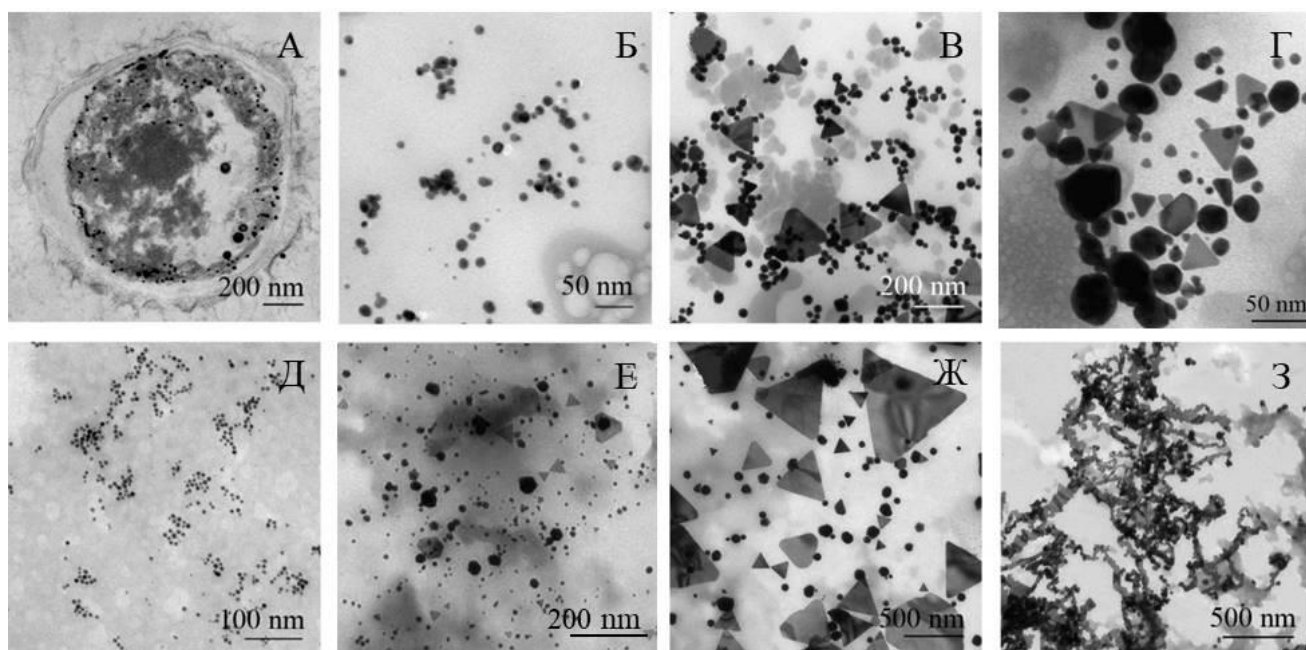
Рисунок 150 – ПЭМ наночастиц серебра (Ag^0), биообразованных из AgNO_3 с помощью базидиальных грибов
(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Погруженные культуры базидиомицетов на среде, содержащей ионы серебра, были способны синтезировать наночастицы серебра без каких-либо заметных межвидовых различий. Например, в питательной среде, вблизи и на поверхности гиф мицелия *A. bisporus* и *G. frondosa* накапливалось большое количество сферических наночастиц средним размером 10–20 нм (Рисунок 150А, Б). Синтез с культуральными жидкостями грибов (например, *L. edodes*) позволил получить более крупные частицы (10–100 нм) неправильной формы, часто слипающиеся в агрегаты и расположенные на белковой матрице (Рисунок 150В). Напротив, синтез с внутриклеточными экстрактами привел к образованию очень маленьких однородных частиц размером 1–10 нм (например, как у культур *P. ostreatus* и *A. arvensis*) (Рисунок 150Г, Д).

Большинство представленных в нашей работе синтезированных наночастиц серебра представляли собой сферы размером от 10 до 50 нм, полученные коллоиды были стабильны, частицы не агрегировали и не флокулировали более 10 дней, что делает их использование в прикладных аспектах перспективным. Биогенные наночастицы серебра также могут иметь различную форму, размер и другие характеристики в зависимости от биообъекта и используемых условий синтеза (Siddiqi *et al.*, 2018). Например, инкубация фильтрата культуральной жидкости из 2-х недельной культуры *L. edodes* с 50мМ раствором AgNO_3 ,

приводила к образованию наночастиц, агрегированных в крупные сферические структуры (серебряные шарики) с размерами от 50 до 250 нм (Рисунок 150Е). Также при использовании экстрактов из плодовых тел, можно получить наночастицы либо сферической (*L. edodes*) (Рисунок 150Ж), либо частицы с формой, близкой к кубической, например, когда мы использовали внутриклеточные экстракты плодовых тел *G. lucidum* (Рисунок 150З).

Наночастицы золота, полученные различными методами, имеют самую разнообразную форму, включая наносферы, наноклетки, наностержни, нанопроволоки, нанопластины, наноремни, наносоты, наноцветы, нанозвезды, нанокопья, нанолистья, наногантели, полые нанотрубки и полые сферы (Shah *et al.*, 2014; Vais *et al.*, 2016). Биогенные наночастицы золота также могут иметь различную форму, но в большинстве публикаций по биосинтезу наночастиц золота сообщается об образовании наносфер, треугольников и многоугольников (Ahmed *et al.*, 2016; Menon *et al.*, 2017). В наших исследованиях с различными биообъектами, их экстрактами и изолированными ферментами нам также удалось получить наночастицы золота различной формы и размера. Эксперименты *in vivo* продемонстрировали способность живых культур грибов и бактерий синтезировать наночастицы золота. Когда базидиомицеты выращивали в среде HAuCl_4 , большое количество наночастиц было обнаружено в культуральной среде, на поверхности клеток и внутри гиф мицелия (Рисунок 151А).



Масштабная линейка – 50, 100, 200 и 500 нм.

Наночастицы золота внутри гиф *L. edodes* (А); наночастицы золота, полученные из бесклеточного фильтрата культуральной жидкости *G. frondosa* (Б), внутриклеточных экстрактов мицелия *L. edodes* (В) и *A. bisporus* (Г); синтезированные с помощью Mn-пероксидазы (Д) и лакказы (Е) *L. edodes*; бактериальной Mn-пероксидазы *A. brasilense* Sp245 (Ж) и наноленты, сформированные в присутствии лакказы *A. brasilense* (З).

Рисунок 151 – ПЭМ наночастиц золота (Au^0), биообразованных из HAuCl_4 с помощью базидиальных грибов и бактерий *A. brasilense*
(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Большинство наночастиц представляли собой сферы размером 5–15 нм, а некоторые были и крупнее (30–50 нм). При использовании культуральной жидкости *L. edodes*, *P. ostreatus* и *G. frondosa* при инкубации с HAuCl_4 , образовывались однородные, мелкие, в основном сферические наночастицы размером от 2 до 20 нм (Рисунок 151Б). С *G. lucidum* образовывались частицы менее правильной формы, размером 5–60 нм. С помощью культуральных жидкостей *A. bisporus* и *A. arvensis* также удалось получить небольшие наносферы золота диаметром 2–10 нм. Частицы золота, полученные с использованием внутриклеточных экстрактов мицелия *L. edodes*, *P. ostreatus* и *A. bisporus*, сильно различались по размеру и форме. Сферы были в несколько раз больше, чем те, которые были получены с использованием внеклеточных экстрактов, а смесь частиц также содержала еще более крупные гексагональные, тетрагональные и треугольные частицы (30–200 нм) (Рисунок 151В, Г). Такая же, но менее выраженная разница между культуральной жидкостью и экстрактом наблюдалась у *G. lucidum* и *G. frondosa*. С экстрактом *A. arvensis* образовывались наночастицы неправильной формы размером около 25–50 нм.

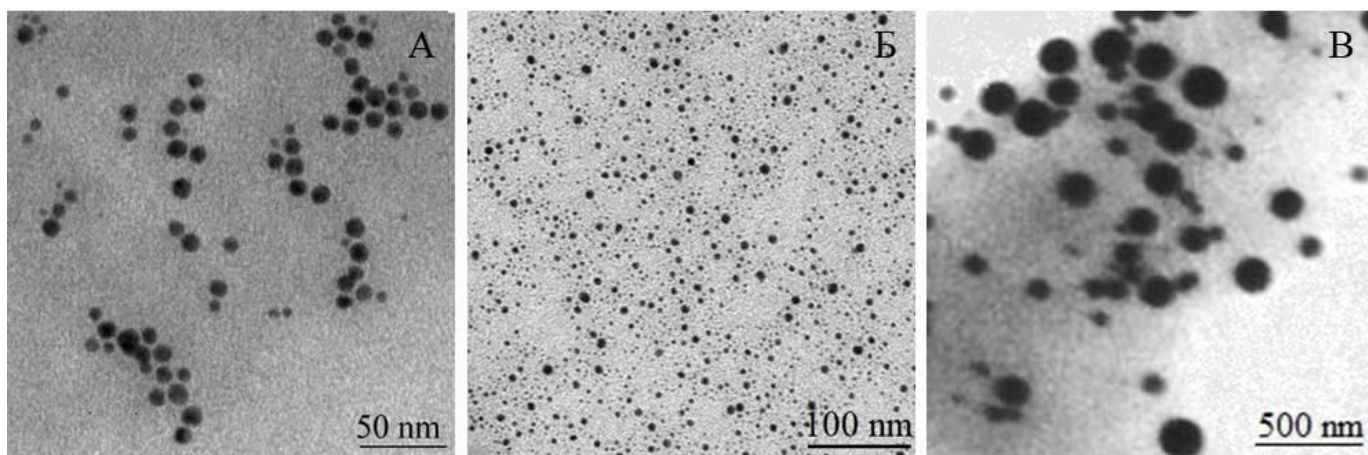
В ряде публикаций показано изменение морфологии биогенных наночастиц золота при изменении параметров процесса. Так, описан контролируемый биосинтез наночастиц золота с использованием гриба *A. niger* (Xie *et al.*, 2007). Форма и размер полученных наночастиц варьировала в зависимости от способа их получения (с использованием промытой грибной биомассы, отфильтрованной среды без мицелия или грибного экстракта), pH и температуры. При инкубации биомассы мицелия с HAuCl_4 образовывались треугольные частицы и золотые наносферы. На отфильтрованной среде, не содержащей мицелия, образовывались плоские треугольные, усеченно-треугольные и гексагональные нанопластинки с очень гладкими краями, а также наносферы. С экстрактом грибной биомассы образовывались преимущественно гексагональные нанопластинки со спиральной структурой (Xie *et al.*, 2007).

В наших исследованиях при инкубации HAuCl_4 с внутриклеточными фенолоксилирующими ферментами грибов наблюдалось интенсивное образование наночастиц золота. Частицы, полученные в присутствии Mn-пероксидазы базидиомицета *L. edodes*, представляли собой правильные сферы диаметром от 5 до 20 нм (Рисунок 151Д). Частицы, полученные с лакказами и тирозиназами, имели неправильную сферическую форму, присутствовало небольшое количество треугольников и тетраэдров. Размер этих частиц колебался от 5 до 120 нм, а большинство частиц имели размер 30 нм (Рисунок 151Е). Для сравнения можно оценить наночастицы, синтезированные с помощью бактериальной внеклеточной Mn-пероксидазой, которые в основном были представлены наносферами размером от 5 до 15 нм с небольшим количеством нанопризм (Kupryashina *et al.*, 2013; Vetchinkina *et al.*, 2019). Увеличение времени инкубации приводило к появлению большого количества треугольников и тетраэдров размером 50–500 нм (Рисунок 151Ж). Используя лакказу, выделенную из культуральной жидкости *A. brasilense*, мы смогли получить золотые наноленты (Рисунок 151З).

7.13 Исследование наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 с помощью методов динамического светорассеяния, рентгеновской флуоресценции, рентгенофазового анализа и дифракции электронов в выбранной области (SAED)

Для характеристики наночастиц, синтезированных культурами базидиомицетов при глубинном выращивании, культуральную жидкость и мицелий отделяли от частиц, ресуспендировали их в дистиллированной воде и проводили исследования с помощью методов рентгеновской флуоресценции, просвечивающей электронной микроскопии и динамического светорассеяния. Отделенные фильтрованием и отмытые частицы золота, представляли собой наносферы правильной формы, размер большинства которых был равен 5–10 нм (Рисунок 152А). Наночастицы серебра были представлены также правильными сферами с преобладающим диаметром 5–15 нм (Рисунок 152Б). Наночастицы элементного красного селена были правильными сферами диаметром от 20 до 200 нм (Рисунок 152В).

Размер биологически синтезированных частиц металлов был также оценен методом динамического светорассеяния. Полученные результаты по размеру наночастиц подтвердили данные электронной микроскопии. Дзета-потенциал коллоидного золота, синтезированного с помощью разных видов макробиот, составлял от –18 до –27 мВ, наночастиц серебра от 10 до –18 мВ, ζ - потенциал наночастиц коллоидного селена от –12 до –18 мВ.

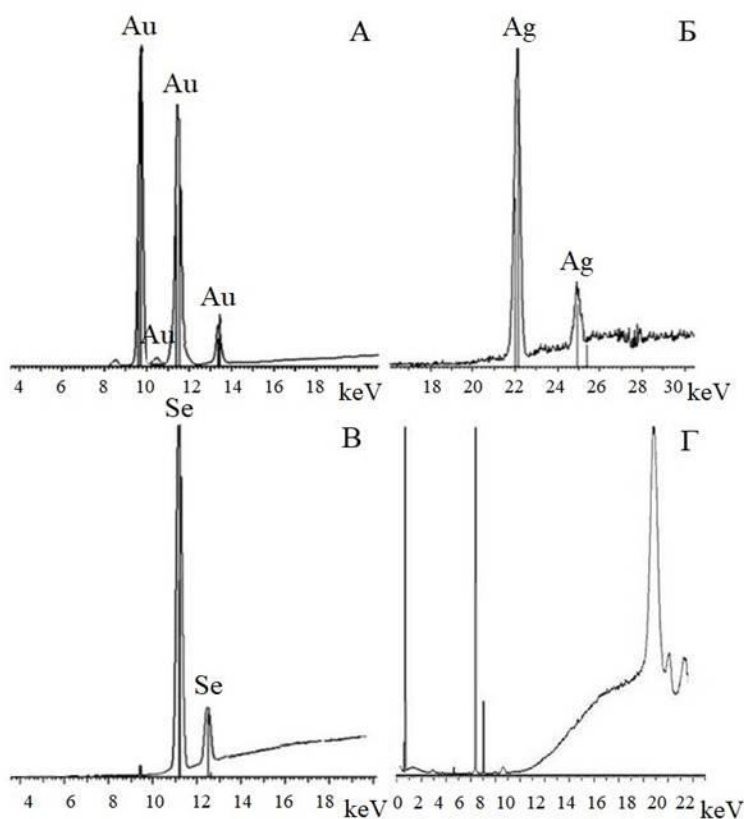


Масштабная линейка – 50, 100 и 500 нм.

Рисунок 152 – ПЭМ наночастиц золота (Au^0), серебра (Ag^0) и селена (Se^0) синтезированных с помощью ксилотрофных базидиомицетов

Дзета-потенциал определяет степень и характер взаимодействия между частицами дисперсной системы. Чем больше электрокинетический потенциал, тем устойчивее коллоид. Если данная величина (положительная или отрицательная) ≥ 30 мВ, то дисперсия будет устойчива по отношению к агрегации. В нашем случае ζ –потенциал, например, золотых коллоидных растворов, был близок к 30 мВ, что говорит об их электростатической стабильности и не склонности к коагуляции или флоккуляции.

Для дополнительного подтверждения того, что данные наночастицы представляют собой именно восстановленное золото, серебро и селен, они были исследованы методом рентгеновской флуоресценции. Для отделенных фильтрованием и отмытых электронно-плотных нанобразований были получены спектры, в которых отмечено появление интенсивных эмиссионных линий, характерных для выше перечисленных элементов (Рисунок 153А–В). Наличие золота было определено по линиям при $L\alpha_1$ – 9.713; $L\beta_1$ – 11.443; $L\beta_2$ – 11.585; $L\gamma_1$ – 13.382 keV; наличие серебра по 2-м линиям при $L\alpha_1$ – 22 и $L\beta_1$ – 25 keV; наличие селена было отражено в спектре в появлении интенсивных эмиссионных линий $L\alpha_1$ – 11.22 и $L\beta_1$ – 12.49 keV. При этом спектры, снятые для контрольных культур, выращенных на средах без добавления данных соединений, показали отсутствие этих эмиссионных линий (Рисунок 153Г).



Спектры элементов Au^0 (А), Ag^0 (Б) и Se^0 (В); контроль (Г).

Рисунок 153 – Рентгенофлуоресцентный анализ наночастиц золота (Au^0), серебра (Ag^0) и селена (Se^0) синтезированных с помощью грибов (Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

Для определения степеней окисления биологически восстановленных элементов (золота, серебра и селена), содержащихся в суспензиях наночастиц этих элементов, использовали метод рентгенофазового анализа на дифрактометре ДРОН-3.0. Металлы восстанавливались до нулевой степени окисления полностью, и сигналов от исходных соединений $HAuCl_4$ и $AgNO_3$ обнаружено не было. В образцах присутствовали 4 сигнала, относящихся к основному рефлексу Au^0

(межплоскостное расстояние 1.230, 1.441, 2.030 и 2.350 Å [4-784]) (Рисунок 154А) и 4 сигнала, относящихся к основному рефлексу Ag^0 (межплоскостное расстояние 1.232, 1.446, 2.049 и 2.356 Å [4-783]) (Рисунок 154Б). В образцах с суспензией наночастиц селена выявлено 7 сигналов, относящихся к основному рефлексу Se^0 (межплоскостное расстояние 1.768, 1.993, 2.014, 2.060, 2.171, 2.990 и 3.750 Å [6-0362]), а также сигналы от SeO_2 (2.529 и 4.171 Å [22-1314]).

В образцах наночастиц золота и серебра, полученных с помощью культуры *A. arvensis*, присутствовали 3 сигнала, относящихся к основному рефлексу Au^0 (межплоскостное расстояние 1.443, 2.028 и 2.345 Å [4-0784]) и 3 сигнала, относящихся к основному рефлексу Ag^0 (межплоскостное расстояние 1.445, 2.049 и 2.368 Å [4-0783]). Металлы восстанавливались до нулевой степени окисления полностью, и сигналов от исходных соединений HAuCl_4 и AgNO_3 обнаружено не было. В образцах с суспензией наночастиц селена у *A. arvensis* выявлено 5 сигналов, относящихся к основному рефлексу Se^0 (межплоскостное расстояние 1.773, 1.930, 1.993, 2.090 и 2.980 Å [6-0362]), а также один сигнал (2.392 Å [20-1155]) от исходного соединения Na_2SeO_3 (Loshchinina, Vetchinkina *et al.*, 2018).

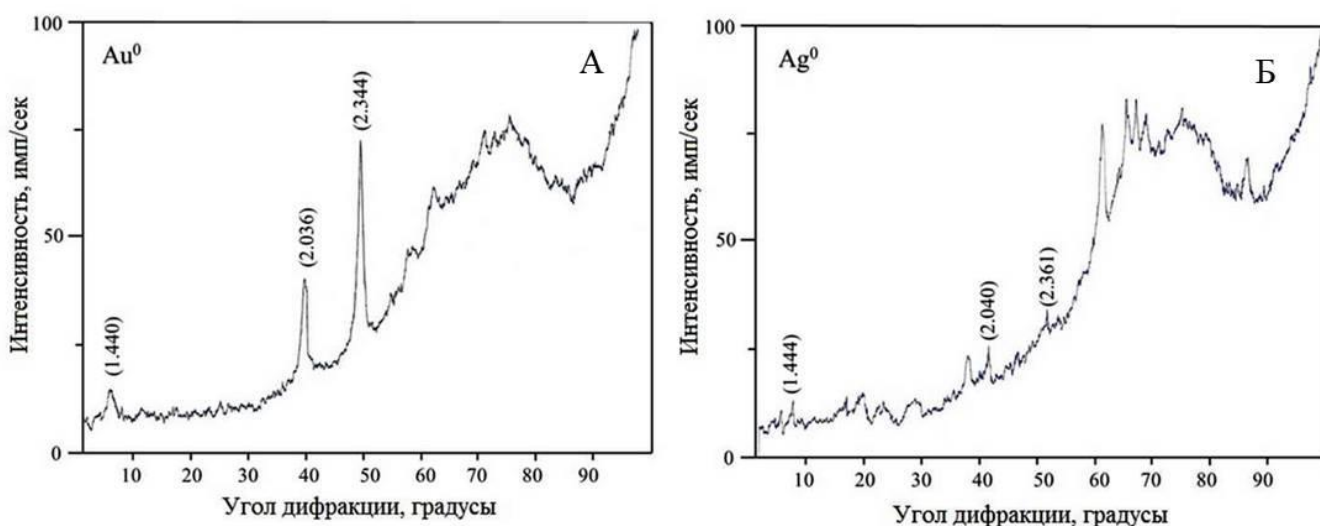


Рисунок 154 – Рентгенофазовый анализ (определение степеней окисления элементов) в суспензиях наночастиц золота (Au^0) (А) и серебра (Ag^0) (Б), полученных из HAuCl_4 и AgNO_3 с помощью базидиомицета *L. edodes* (Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

При помощи электронного микроскопа (Libra 120 «Carl Zeiss»), работающего при ускоряющем напряжении 120 keV с длиной камеры 360 нм, и методом дифракции электронов в выбранной области (SAED) были получены дифрактограммы наночастиц (Рисунок 155). Диаграмма колец дифракции из поликристаллического чистого золота и серебра с кристаллической структурой показана на рисунках 155А и Б, соответственно. Анализ SAED структуры наночастиц селена, синтезированных базидиомицетами, показал их некристаллическую (аморфную) природу, что было подтверждено ранее появлением красной окраски у среды культивирования и мицелия грибов с Na_2SeO_3 (Рисунок 155В). Изменение

цвета в присутствии селенсодержащих соединений на различные оттенки розового и красного указывает на восстановление селена (IV) до селена (0) из Na_2SeO_3 и накопление красной аморфной модификации Se^0 (Iravani, 2011). Межплоскостные расстояния для изучаемых нанобразований определенные с помощью метода SAED соответствовали данным рентгенофазового анализа.

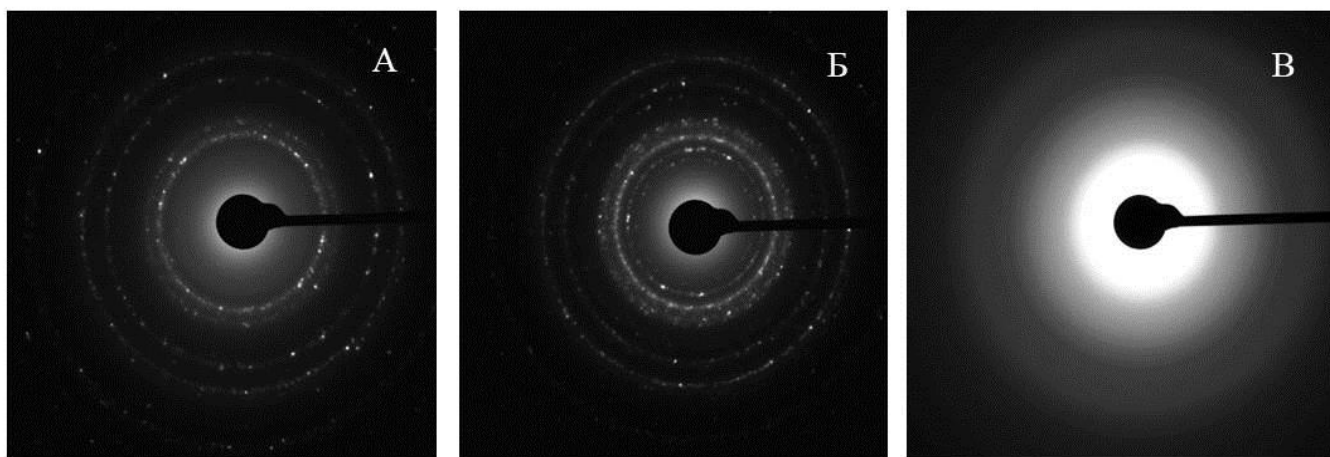
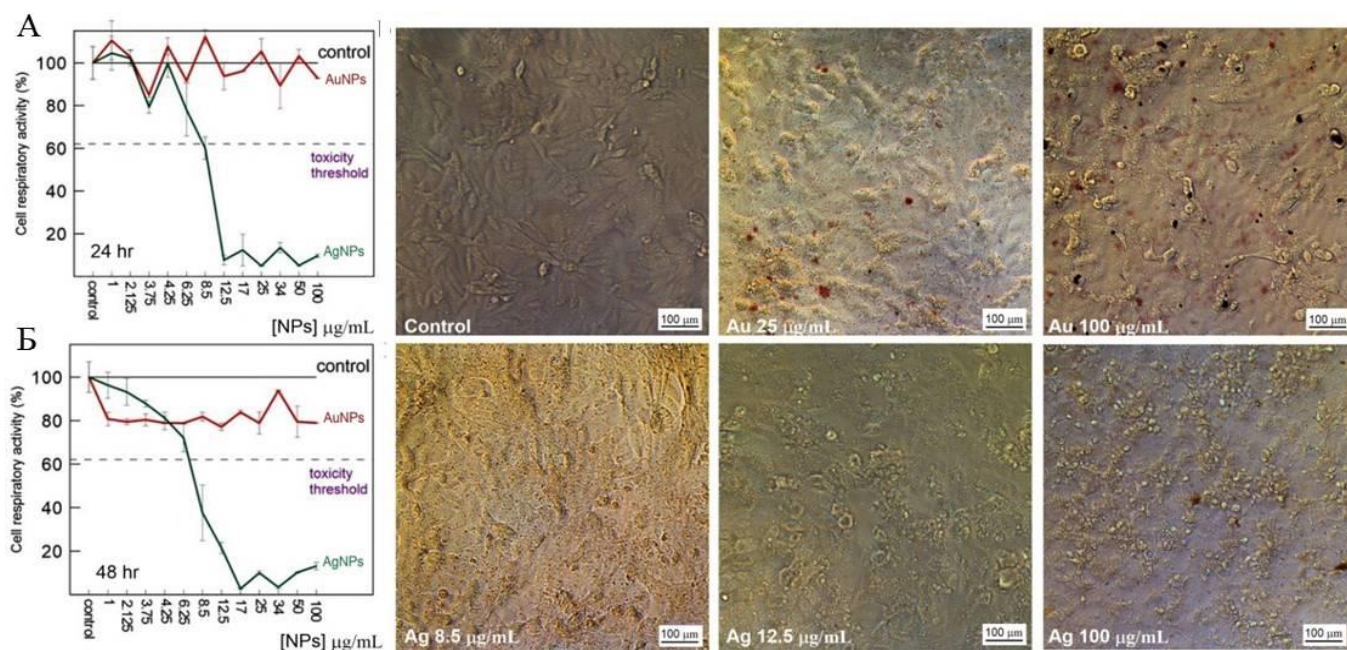


Рисунок 155 – Электронная дифракция выбранной области (SAED) с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ, Libra 120 «Carl Zeiss») с определением структуры наночастиц Au^0 (А), Ag^0 (Б) и Se^0 (В)
(Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

7.14 Изучение цитотоксичности биогенных наночастиц Au^0 и Ag^0

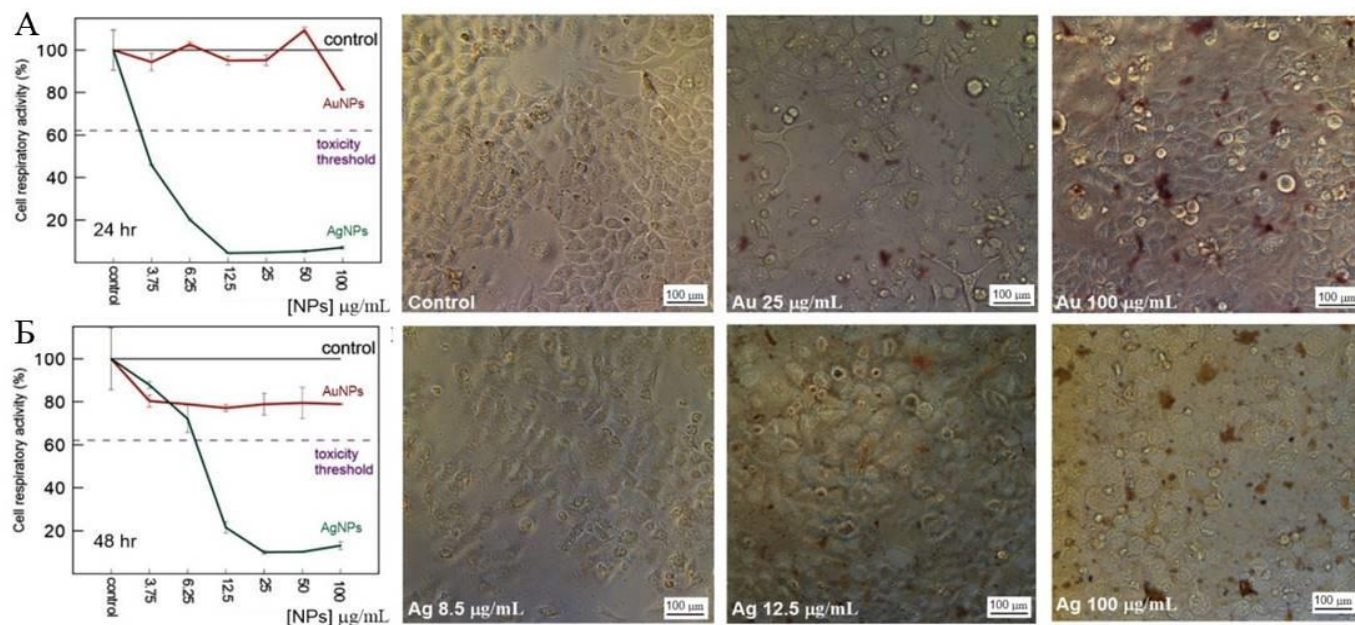
Исследование цитотоксичности биогенных наночастиц металлов (Au^0 и Ag^0) проводили с использованием общепринятого МТТ-теста на дыхательную активность животных клеток (клеточные линии почки африканской зеленой мартышки (Vero) и клетки карциномы шейки матки человека (HeLa)) (Niks and Otto, 1990). Концентрацию наночастиц определяли с помощью метода (Khlebtsov *et al.*, 2022). Согласно данным МТТ-теста, микогенные наночастицы золота Au^0 практически не снижали дыхательную активность тестируемых клеточных линий Vero (Рисунок 156) и HeLa (Рисунок 157) после 24 часов инкубации, что свидетельствовало о низком токсическом эффекте частиц в отношении животных клеток. После 48 часов инкубации среднее снижение дыхательной активности составило около 20% для всего диапазона концентраций от 1 до 100 мкг/мл наночастиц, что говорит о дозозависимом характере проявленной токсичности в пределах исследуемых концентраций.

Иная картина наблюдалась для наночастиц серебра Ag^0 . После инкубации в течение 24 и 48 часов у микогенных наночастиц серебра наблюдалось выраженное цитотоксическое действие по отношению к клеточным линиям Vero (Рисунок 156) и HeLa (Рисунок 157), проявлявшееся начиная с концентрации 3.75 мкг/мл для раковых клеток и 8.5 мкг/мл для клеток эпителия почки. Частичное или полное разрушение монослоя клеток показало наличие несвязанных мертвых клеток в лунках с образцами.



Дыхательная активность клеток Vero, проанализированная с помощью МТТ-анализа, инкубированных в течение 24 (А) и 48 часов (Б) с наночастицами Au^0 и Ag^0 , полученными с использованием бесклеточного фильтрата 14-суточной культуры *L. edodes*. Контроль – изображение чистых клеток Vero, полученные с помощью световой микроскопии и клеток, инкубированных в течение 24 часов с наночастицами в различных концентрациях. Масштабная линейка – 100 мкм.

Рисунок 156 – Цитотоксичность микогенных наночастиц Au^0 и Ag^0 по отношению линии Vero (Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)



Дыхательная активность клеток HeLa, проанализированная с помощью МТТ-анализа, инкубированных в течение 24 (А) и 48 часов (Б) с наночастицами Au^0 и Ag^0 , полученными с использованием бесклеточного фильтрата 14-суточной культуры *L. edodes*. Контроль – изображение чистых клеток HeLa, полученные с помощью световой микроскопии и клеток, инкубированных в течение 24 часов с наночастицами в различных концентрациях. Масштабная линейка – 100 мкм.

Рисунок 157 – Цитотоксичность микогенных наночастиц Au^0 и Ag^0 по отношению к линии HeLa (Vetchinkina *et al.*, 2018 <https://doi.org/201810.7717/peerj.5237>)

Таким образом, было показано, что биообразованные наночастицы элементного золота не обладают цитотоксичностью по отношению к животным клеткам в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл, что имеет существенное практическое значение, открывая возможность для широкого использования данных наночастиц. Наночастицы элементного серебра не обладают цитотоксичностью в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкг/мл.

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

Первоочередной задачей современной нанотехнологии является разработка надежных и эффективных методик получения монодисперсных наночастиц различного химического состава, размера и формы. В данном исследовании наряду с обнаружением способности к биологическому синтезу мономорфных наночастиц благородных металлов с помощью культуральной жидкости базидиомицетов, установлена возможность влиять на размер наночастиц и их процентное соотношение в зависимости от возраста грибной культуры и времени инкубации (Рисунок 158). Данные исследования проводили на примере базидиомицета *L.edodes*, который выращивали в течение 7 суток при температуре 26°C на синтетической среде в условиях глубинного выращивания. Культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием при 8000 *g* в течение 20 минут и фильтровали.

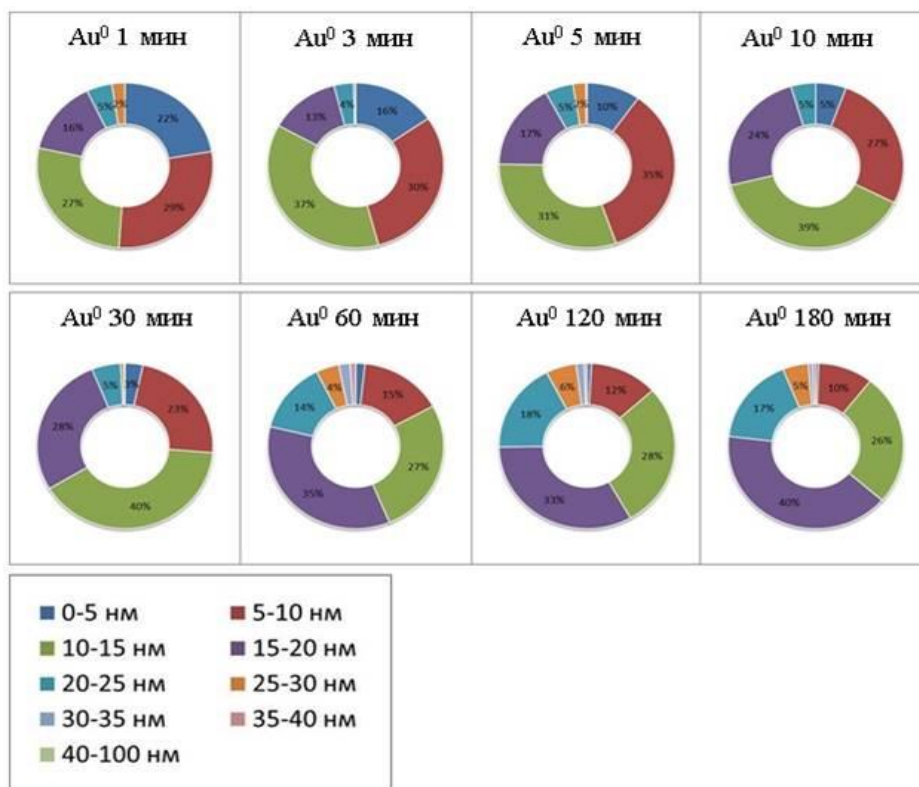


Рисунок 158 – Распределение по размеру (%) наночастиц золота(Au^0), полученных из HAuCl_4 с использованием культуральной жидкости 7-суточной культуры *L. edodes* в зависимости от времени инкубирования

(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Полученный бесклеточный фильтрат инкубировали в темноте при температуре 23–26°C с водным раствором HAuCl_4 в конечной концентрации 50 мкМ. Биоредукцию золотосодержащего соединения с образованием наночастиц оценивали через 1, 3, 5, 10, 30, 60, 120 и 180 минут при помощи просвечивающей электронной микроскопии, используя метод негативного контрастирования (Рисунок 159).

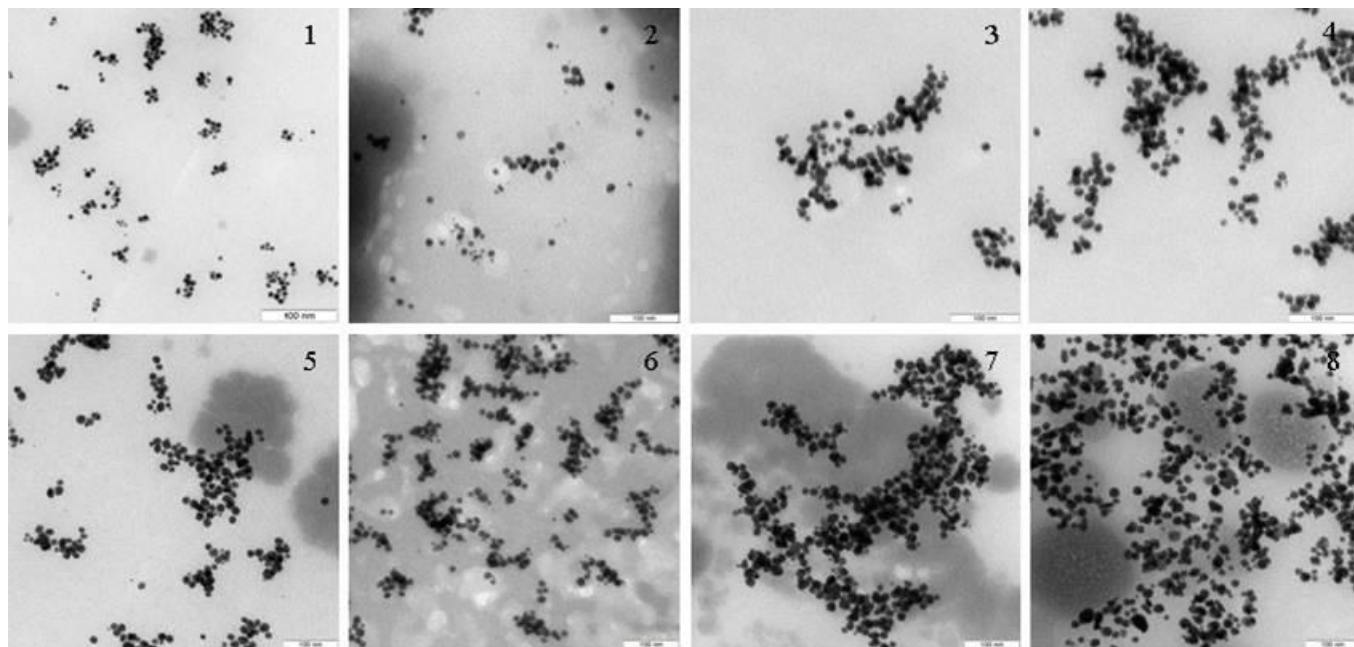


Рисунок 159 – ПЭМ наночастиц золота (Au^0), полученных из HAuCl_4 с использованием культуральной жидкости 7-суточной культуры *L. edodes* при разном времени инкубирования: 1 – 1 мин, 2 – 3 мин, 3 – 5 мин, 4 – 10 мин, 5 – 30 мин, 6 – 60 мин, 7 – 120 мин, 8 – 180 мин; масштаб – 100 нм

(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Оценку размера, формы и относительного количества электронно-плотных нанообразований проводили с помощью трансмиссионных электронно-микроскопических изображений. Содержание сверхмалых наночастиц (1–5 нм) при инкубировании от 1 до 30 минут уменьшается с 22 до 3% за счет увеличения количества наносфер диаметром 15–20 нм с 13 до 28%. При инкубировании более 30 минут (60–180 минут) сверхмалых частиц практически не наблюдалось, содержание наночастиц размером 5–10 нм уменьшалось с 35 до 10%, содержание наносфер размером 15–20 нм составляло 35–40%, содержание частиц диаметром 20–25 нм увеличивалось с 5 до 18%. Доля наночастиц диаметром 10–15 нм была достаточно стабильна и составляла от 27 до 40% на протяжении всего времени инкубирования. Средний размер наносфер с течением времени инкубации увеличивался с 10 до 20 нм, наночастицы были мономорфны (Рисунки 158 и 159). Также на размер наночастиц влияет возраст грибной культуры. Базидиомицет *L. edodes* выращивали в течение 14 суток при тех же условиях культивирования и биоредукцию золотосодержащего соединения с образованием наночастиц проводили и оценивали аналогично предыдущему эксперименту (Рисунок 160).

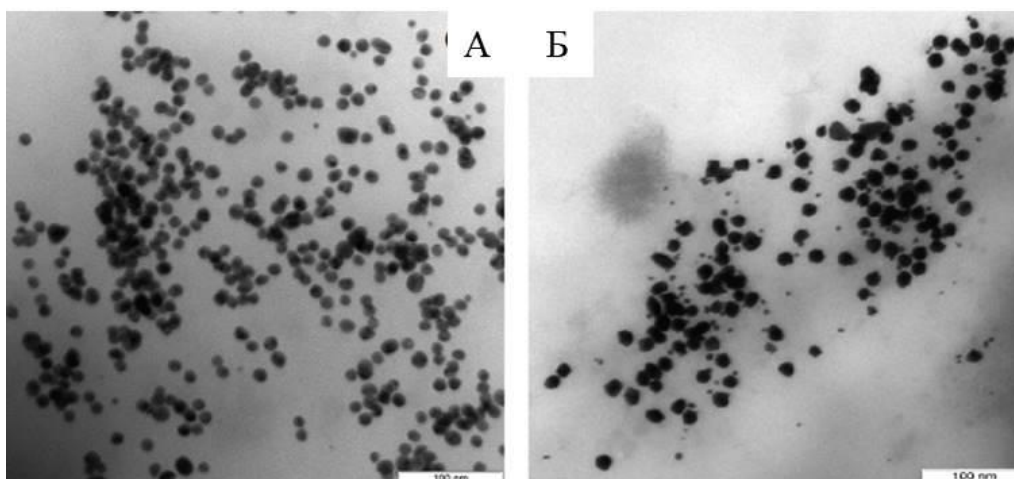


Рисунок 160 – ПЭМ наночастиц золота (Au^0), полученных из HAuCl_4 с использованием культуральной жидкости 7-суточной (А) и 14-суточной культуры (Б) *L. edodes* при 30 минутах инкубирования; масштаб – 100 нм
(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

По сравнению с фильтратом 7-суточной культуры, наблюдалось образование сферических наночастиц металлического золота большего размера, например, при инкубировании в течение 30 минут со средним диаметром 30 нм (Рисунок 160А, Б; 161).

Для подтверждения того, что данные наночастицы представляют собой восстановленное золото, они были исследованы методом рентгеновской флуоресценции. Наличие золота было определено по характерным для этого элемента эмиссионным линиям при $\text{La}1$ – 9.713; $\text{L}\beta 1$ – 11.443; $\text{L}\beta 2$ – 11.585; Ln – 10.308; $\text{Ly}1$ – 13.382 keV.



Рисунок 161 – Распределение по размеру (%) наночастиц золота (Au^0) из HAuCl_4 с использованием культуральной жидкости 7- и 14-суточной культуры *L. edodes* при 30 минутах инкубирования
(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Методом рентгенофазового анализа была определена степень окисления золота, которое восстанавливалось до нулевой степени окисления полностью, и сигналов от исходного HAuCl_4 или промежуточных соединений, содержащих ионы золота, обнаружено не было. В образцах присутствовали 4 сигнала, относящихся к основному рефлексу Au^0 (межплоскостное расстояние 1.230, 1.441, 2.030 и 2.350 Å [4-784]). Дзета-потенциал коллоидного золота, синтезированного с

помощью фильтрата культуральной жидкости макромицета в течение 30 минут инкубирования составил -25 мВ, что говорит об электростатической стабилизированности наночастиц и несклонности к коагуляции или флоккуляции. Дифракционная картина выбранной области наночастиц Au^0 продемонстрировала их кристаллическую структуру.

Аналогичные исследования были проведены в отношении биоредукции нитрата серебра AgNO_3 с образованием наночастиц Ag^0 и установлена возможность влиять на их размер и процентное соотношение в зависимости от возраста грибной культуры и времени инкубации. Базидиомицет *L. edodes* также выращивали в течение 7 суток при температуре 26°C на синтетической среде в условиях глубинного культивирования. Культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием при 8000 g в течение 20 минут и фильтровали. Полученный бесклеточный фильтрат инкубировали в темноте при температуре $23\text{--}26^\circ\text{C}$ с водным раствором AgNO_3 в конечной концентрации 0.5 mM . Биоредукцию нитрата серебра с образованием металлических наночастиц оценивали через 5, 10, 30, 60 и 120 минут при помощи просвечивающей электронной микроскопии, используя метод негативного контрастирования (Рисунок 162).

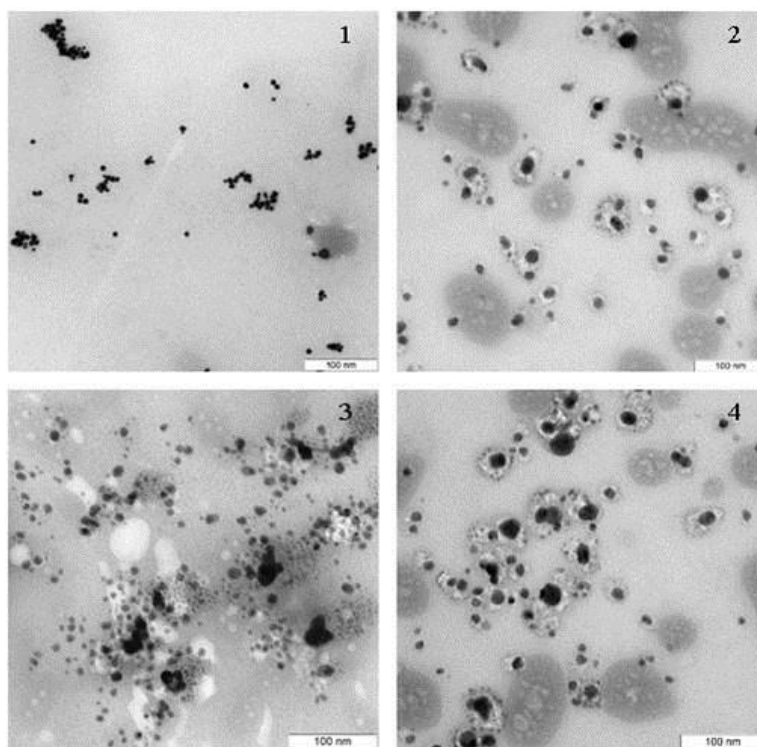


Рисунок 162 – ПЭМ наночастиц серебра (Ag^0), полученных из AgNO_3 с использованием культуральной жидкости 7-суточной культуры базидиомицета *L. edodes* при разном времени инкубирования: 1 – 5 мин, 2 – 10 мин, 3 – 30 мин, 4 – 60 мин; масштаб – 100 нм (Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Оценку размера, формы и относительного количества электронно-плотных нанообразований проводили с помощью трансмиссионных электронно-микроскопических изображений (Рисунок 164). Наночастицы Ag^0 начинали формироваться спустя 5 минут инкубирования бесклеточного фильтрата с нитратом серебра. При инкубировании в течение 5–10

минут формировались малые частицы металлического серебра, доля наночастиц диаметром 1–5 нм составляла 35%, 5–10 нм – 54%. При увеличении времени инкубирования сверхмалые наночастицы исчезали, доля наночастиц диаметром 5–10 нм уменьшалась до 24%, основное содержание было представлено наносферами 10–20 нм, спустя 60 минут появлялись наночастицы размером 25–30 нм. Наночастицы были мономорфны и представлены сферами. Более длительное инкубирование (>60 минут) приводило к слипанию наночастиц и образованию конгломератов.

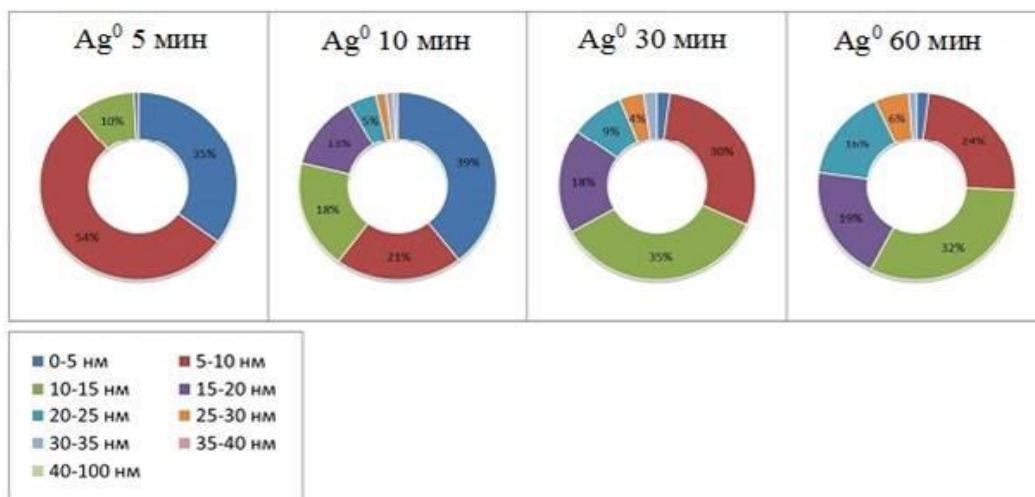


Рисунок 163 – Распределение по размеру (%) наночастиц серебра (Ag^0) из AgNO_3 с использованием культуральной жидкости 7-суточной культуры *L. edodes* в зависимости от времени инкубирования (Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Методом рентгеновской флуоресценции серебро было определено по характерным для этого элемента эмиссионным линиям при $\text{La}1$ – 22 и $\text{L}\beta 1$ – 25 keV. Методом рентгенофазового анализа была определена степень окисления серебра, которое восстанавливалось до нулевой степени окисления полностью, и сигналов от исходного или промежуточных соединений, содержащих ионы серебра, обнаружено не было. В образцах присутствовали 4 сигнала, относящихся к основному рефлексу Ag^0 (межплоскостное расстояние 1.232, 1.446, 2.049 и 2.356 Å [4-783]). Дзета-потенциал коллоидного серебра, синтезированного с помощью фильтрата культуральной жидкости макробицета в течение 30 минут инкубирования, измеряли с помощью метода динамического светорассеяния. Дзета-потенциал составил –18 мВ. Образцы наночастиц серебра анализировали с помощью метода дифракции электронов с выбранным участком. Дифракционная картина выбранной области наночастиц Ag^0 продемонстрировала их кристаллическую структуру.

Культуру базидиомицета *L. edodes* выращивали также в течение 14 суток при тех же условиях. Бесклеточный фильтрат инкубировали в темноте при температуре 23–26°C с водным раствором нитрата серебра AgNO_3 в конечной концентрации 0.5мМ. Биоредукцию нитрата серебра с образованием металлических наночастиц оценивали аналогично предыдущим исследованиям (Рисунок 164).

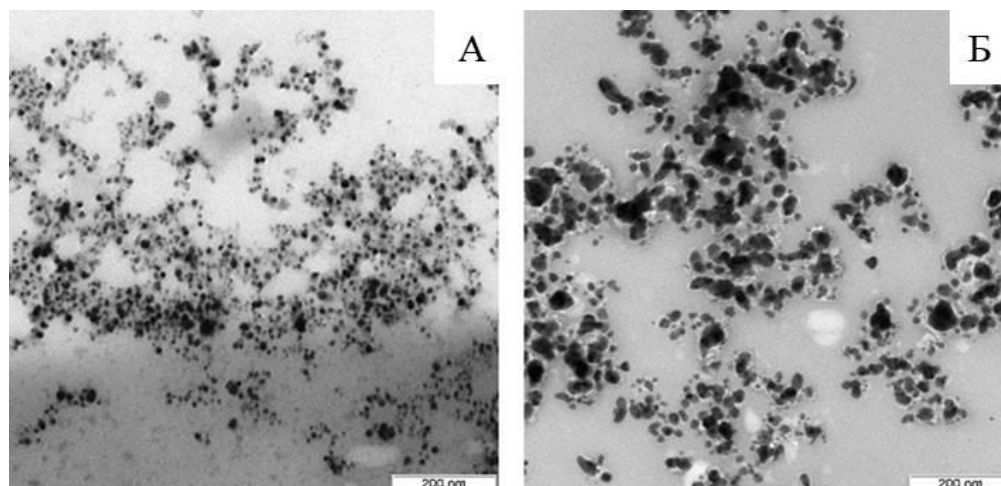


Рисунок 164 – ПЭМ наночастиц серебра (Ag^0), полученных из AgNO_3 с использованием культуральной жидкости 7- (А) и 14-суточной культуры (Б) *L. edodes* при 30 минутах инкубирования; масштаб – 200 нм
(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Наблюдалось образование наночастиц металлического серебра неправильной сферической формы. При инкубировании в течение 30 минут диаметр наночастиц варьировал от 10 до 100 нм, со значительным содержанием наносфер 20–30 нм (Рисунок 165). По сравнению с предыдущим экспериментом, где использовали фильтрат 7-суточной культуры, образованные наночастицы были больше по размеру (средний диаметр 35 нм) и менее однородны по форме и размеру.

Предлагаемый метод обеспечивает экологически безопасный способ биосинтеза наночастиц благородных металлов с помощью бесклеточного фильтрата нетоксичного и непатогенного культивируемого съедобного и лекарственного макромицета, является простым, доступным, сокращает время, снижает трудозатраты и удешевляет биотехнологический процесс биосинтеза наночастиц. Позволяет получить наночастицы серебра и золота требуемого размера и формы, изменяя возраст культуры и время инкубации. Получаемые в результате выполнения способа наночастицы золота и серебра являются мономорфными, не требуют дополнительной сортировки, легко отделяются от инкубационной смеси путем центрифугирования.

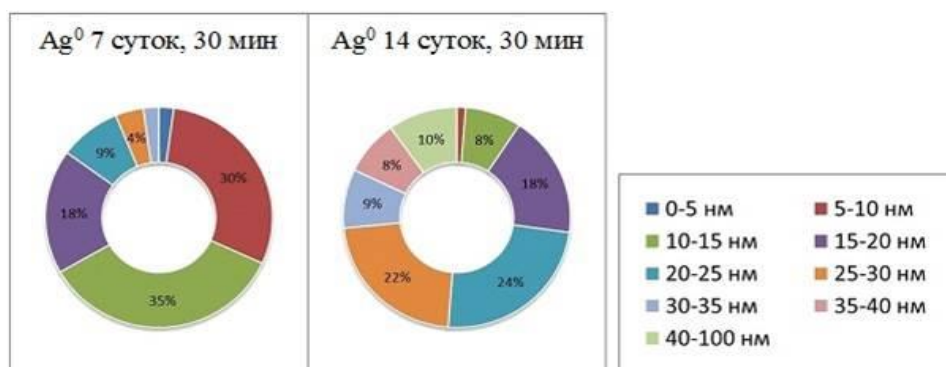


Рисунок 165 – Распределение по размеру (%) наночастиц серебра (Ag^0), полученных из AgNO_3 с использованием культуральной жидкости 7- и 14-суточной культуры *L. edodes* при 30 минутах инкубирования
(Vetchinkina *et al.*, 2019 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03345>)

Кроме того, в результате реализации способа обеспечивается полная деструкция используемых соединений благородных металлов, что исключает содержание промежуточных токсичных ионов. Также, образующиеся наночастицы элементного золота не обладают цитотоксичностью по отношению к животным клеткам в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл, а наночастицы серебра от 1 до 10 мкг/мл.

Таким образом, показана способность культивируемых базидиомицетов разных систематических групп *P. ostreatus*, *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum* и *A. bisporus* и *A. arvensis*, а также их мицелиальных экстрактов, культуральных жидкостей и отдельных ферментных препаратов, к восстановлению соединений металлов и металлоидов HAuCl_4 , AgNO_3 и Na_2SeO_3 до элементного состояния, с образованием наночастиц Au^0 , Ag^0 и Se^0 . Изучено влияние соединений данных металлов и металлоидов на параметры роста и накопление биомассы культурами, определены оптимальные условия культивирования и концентрации изучаемых ионсодержащих соединений для восстановления наночастиц. С использованием методов просвечивающей электронной микроскопии, рентгеновской флуоресценции, рентгенофазового анализа и динамического светорассеяния определены дзета-потенциал и однородность коллоидных растворов; степень окисления восстановленных элементов, размер, форма и локализация наночастиц, как в культуральной жидкости, так на поверхности и внутри мицелиальных гиф. Физические характеристики микогенных наночастиц различаются в зависимости от вида базидиомицета и типа экстракта.

Метод получения наночастиц с помощью мицелиальных экстрактов и культуральной жидкости съедобных грибов обладает преимуществами по сравнению с биосинтезом наночастиц живыми культурами грибов благодаря большей скорости образования наночастиц и простоте их выделения. Внеклеточное образование частиц упрощает процедуру их очистки и выделения, в то же время способность базидиомицетов внутриклеточно синтезировать и аккумулировать наночастицы позволит получать мицелий с высоким содержанием наночастиц.

Не вызывает сомнений, что биологический синтез наночастиц с помощью лекарственных ксилотрофных макромицетов, благодаря простоте, доступности и экологической безопасности, более перспективен по сравнению с существующими методами. Кроме того, выращивание лекарственных базидиальных грибов на обогащенных селеном средах может повысить их биологическую активность для последующего получения высокоэффективных пищевых добавок и лекарственных препаратов. Используя разработанный способ, подразумевающий сокращение продолжительности и упрощение процесса биологического синтеза наночастиц, путем влияния возраста грибной культуры и времени инкубации на биоредукцию соединений и скорость образование наночастиц можно получать однородные определенного размера и формы наночастиц благородных металлов, которые широко используются в медицинской, косметической, электронной, химической промышленности.

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 культивирования и необходимы при формировании морфогенных структур. Особое внимание уделено коричневой мицелиальной пленке – стадии, предшествующей образованию базидиом. Отмечено, что для культур *L. edodes*, *A. mellea* и *G. frondosa* формирование данной мицелиальной структуры было необходимо для последующего плодоношения.

Впервые в коричневых мицелиальных пленках выявлена высокая активности лектинов и ряда ферментов: пектатлиаз, пептидаз, гликозил-гидролаз (амилаз, инвертаз, хитиназ, ксиланаз, целлюлаз, эндоглюканаз, α -, β -глюкозидаз и α -, β -галактозидаз), оксидоредуктаз (лакказ, тирозиназ, лигнин пероксидаз, Mn-пероксидаз), входящих в состав целлюлозо- и лигнинолитического комплексов, а также принимающих участие в биогенезе клеточной стенки грибов.

С применением технологий высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 2500 было проведено секвенирование транскриптомов базидиомицета *L. edodes* на четырех стадиях жизненного цикла: непигментированного мицелия, коричневой мицелиальной пленки, примордия и плодового тела. В результате анализа дифференциальной экспрессии генов, охарактеризованы особенности метаболизма грибных клеток в процессе онтогенеза *L. edodes*. На стадии коричневой мицелиальной пленки по сравнению с непигментированным мицелием была выявлена активация метаболических путей, ответственных за передачу сигналов, управление клеточного ответа и адаптацию, выживаемость, регуляцию внутриклеточных процессов. Активировались функциональные категории, связанные с биосинтезом липидов и пигментов, различными транспортными и секреторными системами и регуляцией межклеточных контактов, процессами, связанными с дифференцировкой клеток, биогенезом клеточных стенок, регулированием в изменениях цитоскелета, инициацией процесса полового размножения.

На основе полученных результатов, впервые выявлена роль коричневой мицелиальной пленки *L. edodes*, как метаболически активной стадии, предшествующей плодоношению базидиомицета.

Изучение биологически активных метаболитов глубинного мицелия базидиомицетов *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum*, позволило выявить достоверное снижение метаболической активности ряда раковых клеточных линий млекопитающих (A549, Hep-2, HeLa, SPEV-2 и C6). Наибольшую цитотоксичность проявляли высокомолекулярная белковая фракция *G. frondosa*, ингибируя на 90–100% метаболическую активность всех раковых клеточных линий при концентрации 0.4 мг/мл. Гликопротеиновые фракции *G. lucidum* на 100% подавляли рост клеток

глиомы C6 при концентрации 0.25 мг/мл. Выявлены белковые фракции *L. edodes*, обладающие наибольшим цитотоксическим действием на опухолевые клетки, при концентрации 0.5 мг/мл жизнеспособность теряли 80–100% клеток C6, A549 и SPEV-2. Гликопротеины не пигментированного мицелия и коричневой мицелиальной пленки не уступали по противораковой активности гликопротеинам и полисахаридам плодовых тел, а в отношении линии C6, значительно их превосходили. Дифференциальная окраска ядер и цитоплазмы, визуализировала смерть раковых клеток путем апоптоза. Клетки имели типичные апоптотические морфологические особенности: сморщивание клеток, наличие апоптотических телец в цитоплазме, изменение формы ядер с дифрагментацией хроматина в ядре клетки.

Фракции гликопротеинов, способных значительно снижать метаболическую активность раковых клеточных линий, обладали высокой лектиновой активностью, что важно, поскольку лектины начинают рассматриваться как новые инструменты 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 грибов; отмечена активация иммунной системы и отсутствие токсического действия на слизистую желудочно-кишечного тракта. Полученные данные могут служить основанием для разработки на основе грибных белковых препаратов из глубинного мицелия базидиомицетов *L. edodes*, *G. frondosa* и *G. lucidum* средств, перспективных в комплексной терапии онкологических заболеваний.

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

Впервые показана способность фенолоксидаз грибов к биоредукции соединений металлов с синтезом наночастиц. Микосинтез наночастиц с помощью бесклеточных экстрактов и метаболитов предпочтительнее получения наночастиц посредством живых культур, так как упрощает процедуру их очистки и выделения. С другой стороны способность грибов внутриклеточно синтезировать и аккумулировать наночастицы позволит получать мицелий с высоким содержанием наночастиц. Например, выращивание лекарственных базидиомицетов на обогащенных селеном средах может повысить их биологическую активность для последующего получения высокоэффективных пищевых добавок и лекарственных препаратов.

Разработан метод получения наночастиц благородных металлов, который приводит к сокращению времени и упрощению процесса биологического синтеза наночастиц, путем изменения таких параметров, как возраст грибной культуры и времени инкубации. С помощью данного запатентованного метода можно получать устойчивые коллоиды однородных сферических наночастиц благородных 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АБТС – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)
- АМФК – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа
- АТФ – аденозинтрифосфат
- В – вакуоль
- ВАК – Высшая аттестационная комиссия
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматографии
- ГАА – гемагглютинирующая активность
- ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ – Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет» им. В.И. Разумовского
- ГГ – гликоген
- ГЖХ – газожидкостная хроматография
- ГНУ Инми НАН Беларуси – Государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
- ГП – гифальная пряжка
- L-ДОФА – L-дигидроксифенилаланина
- ДП – долипора
- ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены
- ИБФРМ РАН – Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
- ИТРО – индекс торможения роста опухоли
- КИББ КазНЦ РАН – Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук
- КМП – коричневая мицелиальная пленка
- КС – клеточная стенка
- ЛК – липидные капли
- М – мембрана
- МВТ – мультивизукулярные тела
- ММ – межклеточный матрикс
- МП – мицелиальная пленка
- МПС – миелоноподобные структуры
- МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия)
- МХ – митохондрия
- нДЭГ – дифференциально не экспрессирующиеся гены

НМ – непигментированный мицелий

НЧ – наночастицы

ОГ – “опорные” гифы

ОП – окаймленные пузырьки

ОС – осмиофильные сферы

ПААГ – полиакриламидный гель

ПМ – плотный мицелий

ПМП – пигментированная мицелиальная пленка

ППС – пора парентосомы

ПР – примордий

ПС – парентосома

ПТ – плодовое тело

ПФ – гранулы полифосфата

ПЦР-РТ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

Р – рибосомы

РМ – ризоморфы

РФФИ – Российский Научный Фонд

СГУ – Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

СДС-Na – додецилсульфат натрия

СП – септа

ТМС – триметилсилильные производные сахаров

УМ – уплотненный мицелий

ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина – Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

ФИЦ СЦ РАН – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук»

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЦКП – Центр коллективного пользования

ЦП – цитоплазма

ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

Я – ядро

BioCyc – Biology Cycles (ресурс Биологические Циклы)

- BUSCO – Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (сопоставительный анализ консервативных однокопийных генов-ортологов)
- cGMP-PKG – Cyclic Guanosine Monophosphate Protein Kinase G (циклический гуанозинмонофосфат активирующий протеинкиназу G)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ДМЕМ модифицированная среда Игла Дульбекко)
- DNS – Dinitrosalicylic reagent (динитросалициловый реагент)
- EELS – Electron Energy Loss Spectroscopy (спектроскопия энергетических потерь электронов)
- ESI – Analysis Electron Spectroscopic imaging (электронно-спектроскопическое изображение)
- EST – Expressed Sequence Tags (база данных экспрессируемых последовательностей тегов)
- GO – Gene Ontology (база данных онтологии генов)
- GPI-APs – Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (гликозилфосфатидил-инозитол заякоренные белки)
- JCPDS – Joint Committee on Powder Diffraction Standards (Объединенный комитет по порошковой дифракции)
- KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Киотской энциклопедии генов и геномов)
- KOG – Eukaryotic Orthology Groups families (база данных ортологических групп эукариот)
- MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase (митоген-активируемые протеинкиназы)
- NCBI – National Center for Biotechnology Information (база данных белков Национального центра биотехнологической информации)
- PGA – Polyglycolic acid (полигалактуроновая кислота)
- SAED – Selected Area Electron Diffraction (дифракция электронов в выбранной области)
- SAGE – Serial Analysis of Gene Expression (серийный анализ экспрессии генов)
- TEMED – Tetramethylethylenediamine (ТЕМЕД–N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин)
- UV-vis – Ultraviolet/Visible spectroscopy (ультрафиолетовая спектроскопия)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Антонова, С.С. Галектин-3 как представитель семейства лектинов: в норме и при патологии / С.С. Антонова, П.В. Юшков // Молекулярная медицина. – 2004. – № 1. – С. 60–64.
3. Бабицкая, В.Г. Физиологически активные соединения и биологическое действие глубинного мицелия базидиомицета *Ganoderma lucidum* (Kurt.: Fr.) P. Karst. / В.Г. Бабицкая, Г.В. Хлюстов, Л.В. Пленина // Биотехнология. – 2003. – № 4. – С. 35–44.
4. Бробст, К.М. Газожидкостная хроматография триметилсилильных производных сахаров / К.М. Бробст // Методы исследования углеводов / Под ред. Хорлина А.Я. – М.: Мир, 1975. – 445 с.
5. Васильева, О.А. Возможности использования галектина-3 в лабораторной диагностике / О.А. Васильева [и др.] // Клинико-лабораторный консилиум. – 2011. – № 2. – С. 12–15.
6. Ветчинкина, Е.П. Транскриптомный анализ разных морфоструктур базидиомицета *Lentinula edodes* и его применение для идентификации генов, связанных с синтезом биологически активных соединений медицинского назначения / Е.П. Ветчинкина, В.Ю. Горшков // Успехи медицинской микологии. – 2023. – Т. 25. – С. 303–310.
7. Ветчинкина, Е.П. Экспрессия гена специфического фактора транскрипции *exp1* в процессе морфогенеза ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* / Е.П. Ветчинкина [и др.] // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2015. – Т. 15. – С. 67–74.
8. Ветчинкина, Е.П. Морфологические особенности роста мицелия и плодоношения некоторых штаммов съедобного ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* / Е.П. Ветчинкина, Никитина В.Е. // Известия Самарского научного центра РАН. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 1085–1090.
9. Ветчинкина, Е.П. Гликопротеины и полисахариды вегетативного мицелия и плодовых тел лекарственных базидиомицетов *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* и *Ganoderma lucidum* с противоопухолевой и цитотоксической активностью / Е.П. Ветчинкина, А.С. Фомин, А.А. Широков // Успехи медицинской микологии. – 2022. – Т. 23. – С. 305–310.
10. Ветчинкина, Е.П. Выявление противоопухолевой активности глубинного мицелия и плодовых тел базидиальных грибов / Е.П. Ветчинкина [и др.] // Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т. 14. – С. 462–471.
11. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьяши, Л. Верецкий – М.: Мир, 1992. – 328 с.

12. Галицкая, А.А. Характеристика метаболитов гликопротеиновой природы ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* в условиях глубинного и поверхностного культивирования / А.А. Галицкая, Е.П. Ветчинкина [и др.] // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2010. – Т. 10, вып. 1. – С. 29–35.
13. Камзолкина, О.В. Эндоплазматическая система грибов: традиционные и современные представления / О.В. Камзолкина [и др.] // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 8. – С. 549–561.
14. Грушенко, М.М. Совместное использование фенол-сернокислотного и толудинового способов определения сахаров как метод изучения углеводного состава лигноуглеводного комплекса / М.М. Грушенко, Т.С. Аникеев, В.М. Резников // Лигноуглеводные комплексы древесины. – Рига, 1978. – С.32–35.
15. Игнатов, В.В. Углеводсвязывающие белки – лектины / В.В. Игнатов // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 2. – С. 14–15.
16. Лисяный, Н.И. Изучение противоопухолевого действия растительных лектинов на клетки глиом различной степени анаплазии / Н.И. Лисяный [и др.] // Нейрохирургический журнал. – 2009. – № 1. – С. 30–36.
17. Лобанок, А.Г. Состав и биологическая активность глубинного мицелия ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* / А.Г. Лобанок [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 1. – С. 69–73.
18. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
19. Сазанова, К.В. Продукция органических кислот грибами: обмен веществ, физиологическое и экологическое значение / К.В. Сазанова, Н.Г. Осмоловская, Д.Ю. Власов // Микология и фитопатология. – 2022. – Т. 56, № 4. – С. 231–244.
20. Строкова, Н.Г. Современные способы переработки хитинсодержащего сырья / Н.Г. Строкова, А.В. Подкорытова // Технология переработки водных биоресурсов. Труды ВНИРО. – 2018. – Т. 170. – С. 124–152.
21. Феофилова, Е.П. Новые биотехнологии получения биологически активных веществ из мицелиальных грибов / Е.П. Феофилова // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. 9. – С. 195–196.
22. Феофилова, Е.П. Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных препаратов из мицелиальных грибов / Е.П. Феофилова [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2013. – 152 с.
23. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
24. Чикаловец, И.В. Использование лектинов морских гидробионтов для диагностики ряда социально значимых заболеваний человека / И.В. Чикаловец [и др.] // Вестник ДВО РАН. –

2010. – № 5. – С. 1–6.

25. Щерба, В.В. Полисахариды ксилотрофных базидиомицетов / В.В. Щерба, В.Г. Бабицкая // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 11. – С. 90–95.

26. Abbasi, E. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties / E. Abbasi [et al.] // Critical Reviews in Microbiology. – 2016. – V. 42, N. 2. – P. 173–180.

27. Abdel-Kareem, M.M. Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using *Trichoderma hamatum*: Optimization, characterization and antimicrobial activity / M.M. Abdel-Kareem, A.A. Zohri // Letters in Applied Microbiology. – 2018. – V. 67. – P. 465–475.

28. Abdul-Hadi, S.Y. Rapid mycosynthesis and characterization of phenols-capped crystal gold nanoparticles from *Ganoderma applanatum* (*Ganodermataceae*) / S.Y. Abdul-Hadi [et al.] // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2020. – V. 27. – P. 101683.

29. Abikoye, E.T. Biosynthesis of silver nanoparticles in improved strain of *Auricularia polytricha* – an edible mushroom from Nigeria and its antimicrobial activities / E.T. Abikoye [et al.] // Covenant Journal of Physical and Life Sciences. – 2019. – V. 7, N. 1. – P. 47–55.

30. Acay, H. Utilization of *Morchella esculenta* – mediated green synthesis golden nanoparticles in biomedicine applications / H. Acay // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2021. – V. 51. – P. 127–136.

31. Acay, H. Determination of antioxidant and cytotoxic activities of king oyster mushroom mediated AgNPs synthesized with environmentally friendly methods / H. Acay, M. Baran // Medical Sciences. – 2020. – V. 9. – P. 760–765.

32. Adams, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases / D.J. Adams // Microbiology – 2004. – V. 150. – P. 2029–2035.

33. Adebayo, E.A. Fungi as veritable tool in current advances in nanobiotechnology / E.A. Adebayo [et al.] // Heliyon. – 2021. – V. 7. – e08480.

34. Agoramoorthy, G. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India / Agoramoorthy G. [et al.] // Brazilian Journal of Microbiology. – 2007. – V. 38, N. 4. – P. 739–742.

35. Aguilera-Aguirre, L. Whole transcriptome analysis reveals an 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-driven DNA repair-dependent gene expression linked to essential biological processes / L. Aguilera-Aguirre [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – V. 81. – P. 107–118.

36. Ahmad, M.S. Anticancer activity of biostabilized selenium nanorods synthesized by *Streptomyces bikiniensis* strain Ess_amA-I / M.S. Ahmad [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2015. – V. 10. – P. 3389–3401.

37. Ahmad, T. Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles / T. Ahmad [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2013. – V. 107. – P. 227–234.

38. Ahmed, S. Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach / S. Ahmed [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2016. – V. 161. – P. 141–153.
39. Akamatsu, S. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitros-amine-induced liver injury / S. Akamatsu [et al.] // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2004. – V. 27. – P. 1957–1960.
40. Akihisa, T. Dehydrotrametenonic acid and dehydroeburiconic acid from *Poria cocos* and their inhibitory effects on eukaryotic DNA polymerase alpha and beta / T. Akihisa [et al.] // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2004. – V. 68, N. 2. – P. 448–450.
41. Akihisa, T. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum* / T. Akihisa [et al.] // Chemistry and Biodiversity. – 2007. – V. 4, N. 2. – P. 224–231.
42. Akramiene, D. Effects of β -glucans on the immune system / D. Akramiene [et al.] // Medicina (Kaunas). – 2007. – V. 43, N. 8. – P. 597–606.
43. Akther, T. Mycosilver nanoparticles: synthesis, characterization and its efficacy against plant pathogenic fungi / T. Akther, S. Hemalatha // BioNanoScience. – 2019. – V. 9. – P. 296–301.
44. Al-Ansari, M.M. *Ganoderma lucidum* inspired silver nanoparticles and its biomedical applications with special reference to drug resistant *Escherichia coli* isolates from CAUTI / M.M. Al-Ansari [et al.] // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2020. – V. 27. – P. 2993–3002.
45. Albanese, A. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems / A. Albanese, P.S. Tang, W.C.W. Chan // Annual Review of Biomedical Engineering. – 2012. – V. 14. – P. 1–16.
46. Alghuthaymi, M.A. *Trichoderma*: An eco-friendly source of nanomaterials for sustainable agroecosystems / M.A. Alghuthaymi [et al.] // Journal of Fungi. – 2022. – V. 8. – P. 367.
47. Alharbi, R.M. Statically improved fungal laccase-mediated biogenesis of silver nanoparticles with antimicrobial applications / R.M. Alharbi, S.O. Alshammari, A.A. Abd El Aty // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2023. – V. 13, N. 1. – P. 241–253.
48. Ali, M.A. Advancements in plant and microbe-based synthesis of metallic nanoparticles and their antimicrobial activity against plant pathogens / M.A. Ali [et al.] // Nanomaterials. – 2020. – V. 10. – P. 1146.
49. Amin, B.H. Enhancement the mycosynthesis of selenium nanoparticles by using gamma radiation / B.H. Amin [et al.] // Dose-Response. – 2021. – V. 19, N. 4. – P. 155932582110593.
50. Ammar, H.A. Novel fabrication of gelatin-encapsulated copper nanoparticles using *Aspergillus versicolor* and their application in controlling of rotting plant pathogens / H.A. Ammar, G.H. Rabie, E. Mohamed // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2019. – V. 42. – P. 1947–1961.
51. Ammerpohl, O. Target gene discovery for novel therapeutic agents in cancer treatment / O. Ammerpohl, S. Tiwari, H. Kalthoff // Methods in Molecular Biology. – 2010. – V. 576. – P. 427–445.

52. Anders, S. HTSeq – a Python framework to work with high-throughput sequencing data / S. Anders, P.T. Pyl, W. Huber // *Bioinformatics*. – 2015. – V. 31, N. 2. – P. 166–169.
53. Anke, T. Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites / T. Anke // *Progress in Industrial Microbiology*. – 1989. – V. 27. – P. 51–66.
54. Anthony, K.J.P. Synthesis of silver nanoparticles using pine mushroom extract: A potential antimicrobial agent against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* / K.J.P. Anthony [et al.] // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2014. – V. 20. – P. 2325–2331.
55. Apte, M. Psychrotrophic yeast *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 mediates the synthesis of antimicrobial silver nanoparticles via cell-associated melanin / M. Apte [et al.] // *AMB Express*. – 2013. – V. 3, N. 1. – P. 32.
56. Arata, S. Continuous intake of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) aqueous extract suppresses cancer progression and maintains body temperature in mice / S. Arata [et al.] // *Heliyon*. – 2016. – V. 2, N. 5. – e00111.
57. Arora, R. Panepoxydone targets NF-κB and FOXM1 to inhibit proliferation, induce apoptosis and reverse epithelial to mesenchymal transition in breast cancer / R. Arora [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, N. 6. – e98370.
58. Arpha, K. Astraodoric acids A-D: new lanostane triterpenes from edible mushroom *Astraeus odoratus* and their *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and cytotoxic activity / K. Arpha [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – V. 60, N. 39. – P. 9834–9841.
59. Arun, G. Green synthesis of silver nanoparticles using the mushroom fungus *Schizophyllum commune* and its biomedical applications / G. Arun, M. Eyini, P. Gunasekaran // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2014. – V. 19. – P. 1083–1090.
60. Arunthirumeni, M. Biocontrol efficacy of mycosynthesized selenium nanoparticle using *Trichoderma* sp. on insect pest *Spodoptera litura* / M. Arunthirumeni, V. Veerammal, M.S. Shivakumar // *Journal of Cluster Science*. – 2022. – V. 33. – P. 1645–1653.
61. Asghari-Paskiabi, F. *Fusarium oxysporum*, a bio-factory for nano selenium compounds: synthesis and characterization / F. Asghari-Paskiabi [et al.] // *Iranian Journal of Science*. – 2018. – V. 25. – P. 1857–1863.
62. Ashengroph, M. Optimized resting cell method for green synthesis of selenium nanoparticles from a new *Rhodotorula mucilaginosa* strain / M. Ashengroph, S. Tozandehjani // *Process Biochemistry*. – 2022. – V. 116. – P. 197–205.
63. Assunção, L.S. Speciation of selenium in *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* mushrooms / L.S. Assunção [et al.] // *Journal of Biotechnology Letters*. – 2014. – V. 5, N. 1. – P. 79–86.
64. Atoui, A. *Aspergillus nidulans* natural product biosynthesis is regulated by mpkB, a putative pheromone response mitogen-activated protein kinase / A. Atoui [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 74, N. 11. – P. 3596–3600.

65. Austin, L.A. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery / L.A. Austin [et al.] // Archives of Toxicology. – 2014. – V. 88, N. 7 – P. 1391–1417.
66. Avin, F.A. Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes species / F.A. Avin [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2012 – V. 39, N. 7. – P. 7355–7364.
67. Awadh Ali, N.A. Antiviral activity of *Inonotus hispidus* / N.A. Awadh Ali [et al.] // Fitoterapia. – 2003. – V. 74, N. 5. – P. 483–485.
68. Aygün, A. Synthesis and characterization of Reishi mushroom-mediated green synthesis of silver nanoparticles for the biochemical applications / A. Aygün [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2020. – V. 178. – P. 112970.
69. Aziz, N. Illuminating the anticancerous efficacy of a new fungal chassis for silver nanoparticle synthesis / N. Aziz [et al.] // Frontiers in Chemistry. – 2019. – V. 7, N. 65. – P. 1–11.
70. Azmath, P. Mycosynthesis of silver nanoparticles bearing antibacterial activity / P. Azmath [et al.] // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2016. – V. 24. – P. 140–146.
71. Babitskaya, V.G. Biologically active substances of mycelia and fruiting bodies of mushrooms *Lentinus* Fr. and *Pleurotus* (Fr.) P.Karst. / V.G. Babitskaya // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2001. – V. 3. – P. 106–110.
72. Babitskaya, V.G. Exopolysaccharides of some medicinal mushrooms: production and composition / V.G. Babitskaya [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2000. – V. 2. – P. 51–54.
73. Baby, S. Secondary metabolites from *Ganoderma* / S. Baby, A.J. Johnson, G. Balaji // Phytochemistry. – 2015. – V. 114. – P. 66–101.
74. Bafghi, M.H. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Aspergillus flavus* and *Candida albicans* for antifungal applications / M.H. Bafghi [et al.] // Micro and Nano Letters. – 2021. – V. 16. – P. 656–669.
75. Bahn, Y.S. CO₂ sensing in fungi and beyond / Y.S. Bahn, F.A. Mühlischlegel // Current opinion in microbiology. – 2006. – V. 9. – P. 572–578.
76. Bagherzade, G. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria / G. Bagherzade, M.M. Tavakoli, M.H. Namaei // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2017. – V. 7. – P. 227–233.
77. Bailly, C. Anticancer properties and mechanism of action of the fungal nucleoside clitocine and its derivatives / C. Bailly // European Journal of Medicinal Chemistry Reports. – 2024. – V. 10. – P. 100123.

78. Balakumaran, M.D. Exploitation of endophytic fungus *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their *in vitro* biological activities / M.D. Balakumaran, R. Ramachandran, P.T. Kalaichelvan // Microbiological Research. – 2015. – V. 178. – P. 9–17.
79. Balandykin, M.E. Review on Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher Basidiomycetes): realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential / M.E. Balandykin, I.V. Zmitrovich // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2015. – V. 17, N. 2. – P. 95–104.
80. Balashanmugam, P. Mycosynthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles from *Microporus xanthopus*: a macro mushroom / P. Balashanmugam [et al.] // International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. – 2007. – V. 2. – P. 6262–6270.
81. Baldrian, P. Fungal laccases – occurrence and properties / P. Baldrian // FEMS Microbiology Reviews. – 2006. – V. 30. – P. 215–242.
82. Ball, D.W. Concentration scales for sugar solutions / D.W. Ball // Journal of Chemical Education. – 2006. – V. 83. – P. 1489–1491.
83. Bao, D.P. Comparative analysis of two fungal immunomodulatory proteins LZ-8 and LZ-9 of *Ganoderma lucidum* / D.P. Bao [et al.] // Acta Agriculturae Shanghai. – 2017. – V. 33. – P. 1–5.
84. Bao, X.F. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum* / X.F. Bao, X.S. Wang, Q. Dong // Phytochemistry. – 2002. – V. 59, N. 2. – P. 175–181.
85. Bao, Z. Advances in biosynthesis of noble metal nanoparticles mediated by photosynthetic organisms – A review / Z. Bao, C.Q. Lan // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2019. – V. 184. – P. 110519.
86. Barbosa, A.C. Nematicidal activity of silver nanoparticles from the fungus *Duddingtonia flagrans* / A.C. Barbosa [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2019. – V. 14. – P. 2341–2348.
87. Bartnicki-Garcia, S. Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center / S. Bartnicki-Garcia, D.D. Bartnicki, G. Gierz // Canadian Journal of Botany. – 1995. – V. 73, N. 1. – P. 372–378.
88. Bastiaan-Net, S. Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs) / S. Bastiaan-Net [et al.] // International Immunopharmacology. – 2013. – V. 15. – P. 167–175.
89. Basu, A. Evaluating the antimicrobial, apoptotic, and cancer cell gene delivery properties of protein-capped gold nanoparticles synthesized from the edible mycorrhizal fungus *Tricholoma crassum* / A. Basu [et al.] // Nanoscale Research Letters. – 2018. – V. 13. – P. 154.

90. Bayram, Ö. The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism / Ö. Bayram [et al.] // PLoS Genetics. – 2012. – V. 8, N. 7. – e1002816.
91. Bayram, Ö. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins / Ö. Bayram, G.H. Braus // FEMS Microbiology Reviews. – 2012. – V. 36, N. 1. – P. 1–24.
92. Bayram, Ö. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism / Ö. Bayram [et al.] // Science. – 2008. – V. 320, N. 5882. – P. 1504–1506.
93. Bayram, Ö.S. An anatomy of fungal eye: fungal photoreceptors and signalling mechanisms / Ö.S. Bayram, Ö. Bayram // Journal of Fungi. – 2023. – V. 9, N. 591. – P. 1–22.
94. Beccaccioli, M. Fungal lipids: biosynthesis and signalling during plant-pathogen interaction / M. Beccaccioli, M. Reverberi, V. Scala // Frontiers in Bioscience. – 2019. – V. 24, N. 1. – P. 168–181.
95. Bellion, M. Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum* / M. Bellion [et al.] // New Phytologist. – 2007. – V. 174. – P. 151–158.
96. Bender, S. The antibiotic activity of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing / S. Bender [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2001. – V. 3, N. 2–3. – P. 118–125.
97. Bernas, T. The role of plasma membrane in bio-reduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC / T. Bernas, J.W. Dobrucki // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2000. – V. 380. – P. 108–116.
98. Berns, H. RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas / H. Berns [et al.] // Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. – 2000. – V. 14, N. 15. – P. 2549–2558.
99. Bhanja, S.K. Green synthesis of Ag@Au bimetallic composite nanoparticles using a polysaccharide extracted from *Ramaria botrytis* mushroom and performance in catalytic reduction of 4-nitrophenol and antioxidant, antibacterial activity / S.K. Bhanja [et al.] // Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management. – 2020. – V. 14. – P. 100341.
100. Bhardwaj, A.K. Green synthesis and characterization of silver NPs using oyster mushroom extract for antibacterial efficacy / A.K. Bhardwaj, R. Naraian // Journal of Chemistry, Environmental Sciences and its Applications. – 2020. – V. 7. – P. 13–18.
101. Bhardwaj, K. *Pleurotus* macrofungi-assisted nanoparticle synthesis and its potential applications: A review / K. Bhardwaj [et al.] // Journal of Fungi. – 2020. – V. 6, N. 4. – P. 351.
102. Bhat, R. Photo-bio-synthesis of irregular shaped functionalized gold nanoparticles using edible mushroom *Pleurotus florida* and its anticancer evaluation / R. Bhat [et al.] // Journal of

Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2013. – V. 125. – P. 63–69.

103. Bhatnagar, D. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis / D. Bhatnagar, K.C. Ehrlich, T.E. Cleveland // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2003. – V. 61, N. 2. – P. 83–93.

104. Bhattarai, G. Fomitoside-K from *Fomitopsis nigra* induces apoptosis of human oral squamous cell carcinomas (YD-10B) via mitochondrial signaling pathway / G. Bhattarai [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2012. – V. 35, N. 10. – P. 1711–1719.

105. Birla, S.S. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* / S.S. Birla [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*. – 2009. – V. 48, N. 2. – P. 173–179.

106. Bisen, P.S. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities / P.S. Bisen [et al.] // *Current Medicinal Chemistry*. – 2010. V. 17. – P. 2419–2430.

107. Bisht, N. Selenium nanoparticles: A review on synthesis and biomedical applications / N. Bisht, P. Phalswal, P.K. Khanna // *Materials Advances*. – 2022. – V. 3. – P. 1415–1431.

108. Bisko, N.A. Higher edible Basidiomycetes in surface and submerged culture / N.A. Bisko [et al.] / Ed. by I.A. Dudka. – Kiev: Naukova dumka, 1983. – 312 pp.

109. Blumenstein, A. The *Aspergillus nidulans* phytochrome fphA represses sexual development in red light / A. Blumenstein [et al.] // *Current Biology*. – 2005. – V. 15, N. 20. – P. 1833–1838.

110. Böttcher, B. *Candida* species rewired hyphae developmental programs for chlamydospore formation / B. Böttcher [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 1697.

111. Boh Podgornik, B. *Ganoderma lucidum*: A potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs / B. Boh Podgornik // *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. – 2013. – V. 8, N. 3. – P. 255–287.

112. Boh Podgornik, B. *Grifola frondosa* (Diks.: Fr.) S.F. Gray (Maitake mushroom): medicinal properties, active compounds, and biotechnological cultivation / B. Boh Podgornik, M.Berivic // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2007. – V. 9, N. 2. – P. 89–108.

113. Bolger, A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A.M. Bolger [et al.] // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30, N. 15. – P. 2114–2120.

114. Boroumand, M.A. Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: a review of their preparation, properties, and medical applications / M.A. Boroumand [et al.] // *Molecules*. – 2015. – V. 20. – P. 16540–16565.

115. Bowen, A.R. Classification of fungal chitin synthases / A.R. Bowen [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1992. – V. 89. – P. 519–523.

116. Bowman, S.M. The structure and synthesis of the fungal cell wall / S.M. Bowman, S.J. Free // *Bioassays*. – 2006. – V. 28. – P. 799–808.

117. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
118. Bukhalo, A.S. Higher edible Basidiomycetes in pure culture / A.S. Bukhalo / Ed. by I.A. Dudka. – Kiev: Naukova dumka, 1988. – 144 pp.
119. Cabib, E. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall / E. Cabib, J. Arroyo // *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – V. 11. – P. 648–655.
120. Cabib, E. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to β -(1→6)-glucan in the *Saccharomyces* / E. Cabib [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2007. – V. 63. – P. 921–935.
121. Cabib, E. Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure / E. Cabib [et al.] // *Microbiology Sciences*. – 1988. – V. 5, N. 12. – P. 370–375.
122. Cairns, A.J. Submerged batch culture of the psychrophile *Monographella nivalis* in a defined medium; growth, carbohydrate utilization and responses to temperature / A.J. Cairns, C.J. Howarth, C.J. Pollock // *New Phytologist*. – 1995. – V. 129, N. 2. – P. 299–308.
123. Camacho, C. BLAST+: architecture and applications / C. Camacho [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2009. – V. 10, N. 1. – P. 421.
124. Caspi, R. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases / R. Caspi [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – V. 44, N. 1. – P. 471–480.
125. Castro-Longoria, E. Fungal biosynthesis of nanoparticles, a cleaner alternative / E. Castro-Longoria / In *Fungal applications in sustainable environmental biotechnology* / Ed. by D. Purchase // *Fungal Biology*. – Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016. – P. 323–351.
126. Chan, J.Y. Enhancement of *in vitro* and *in vivo* anticancer activities of polysaccharide peptide from *Grifola frondosa* by chemical modifications / J.Y. Chan [et al.] // *Pharmaceutical Biology*. – 2011. – V. 49. – P. 1114–1120.
127. Chan, Y.S. Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi / Y.S. Chan, M.M. Don // *Materials Science and Engineering C*. – 2013. – V. 33. – P. 282–288.
128. Chang, K.L. Genistein arrests hepatoma cells at G2/M phase: involvement of ATM activation and upregulation of p21Waf1/Cip1 and Wee1 / K.L. Chang [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2004. – V. 67, N. 4. – P. 717–726.
129. Chang, S.T. Historical record of the early cultivation of *Lentinus* in China / S.T. Chang, P.G. Miles // *Mushroom Journal of the Tropics*. – 1987. – V. 7. – P. 31–37.
130. Chang, S.T. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health / S.T. Chang, S.P. Wasser // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2012. – V. 14, N. 2. – P. 95–134.

131. Chaturvedi, V.K. Medicinal mushroom: boon for therapeutic applications / V.K. Chaturvedi [et al.] // 3 Biotech. – 2018. – V. 8, N. 8. – P. 334.
132. Chaturvedi, V.K. *Pleurotus sajor-caju*-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles active against colon cancer cell lines: a new era of herbonanocotics / V.K. Chaturvedi [et al.] // Molecules. – 2020. – V. 25. – P. 3091.
133. Chaudhary, R. An overview of the algae-mediated biosynthesis of nanoparticles and their biomedical applications / R. Chaudhary [et al.] // Biomolecules. – 2020. – V. 10. – P. 1498.
134. Chauhan, A. Fungus-mediated biological synthesis of gold nanoparticles: potential in detection of liver cancer / A. Chauhan [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2011. – V. 6. – P. 2305–2319.
135. Chen, H. Antioxidant activities of polysaccharides from *Lentinus edodes* and their significance for disease prevention / H. Chen [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2012. – V. 50. – P. 214–218.
136. Chen, H.P. Anti-proliferative and anti-inflammatory lanostane triterpenoids from the polish edible mushroom *Macrolepiota procera* / H.P. Chen [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2018a. – V. 66, N. 12. – P. 3146–3154.
137. Chen, J. Medicinal importance of fungal β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans / J. Chen, R. Seviour // Mycological Research. – 2007. – V. 111, N. 6. – P. 635–652.
138. Chen, L. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation / L. Chen [et al.] // PLoS One. – 2016. – V. 11, N. 8. – e0160336.
139. Chen, N.H. P53 is important for the anti-invasion of ganoderic acid T in human carcinoma cells / N.H. Chen, J.J. Zhong // Phytomedicine. – 2011. – V. 18, N. 8–9. – P. 719–725.
140. Chen, N.Y. Induction of apoptosis in human lung carcinoma A549 epithelial cells with an ethanol extract of *Tremella mesenterica* / N.Y. Chen [et al.] // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2008. – V. 72, N. 5. – P. 1283–1289.
141. Chen, P. Isolation and purification of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its *in vitro* antitumor activity / P. Chen [et al.] // Modern Food Science and Technology. – 2018b. – V. 34. – P. 107–114.
142. Chen, S. Optimizing transcriptome assemblies for *Eleusine indica* leaf and seedling by combining multiple assemblies from three *de novo* assemblers / S. Chen [et al.] // Plant Genome. – 2015. – V. 8, N. 1. – P. 1–10.
143. Chen, S. Anti-aromatase activity of phytochemicals in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) / S. Chen [et al.] // Cancer Research. – 2006a. – V. 66, N. 24. – P. 12026–12034.
144. Chen, S. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* / S. Chen [et al.] // Nature Communications. – 2012. – V. 3. – P. 913.

145. Chen, S.C. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development / S.C. Chen, W. Ge, J.A. Buswell // FEMS Microbiology Letters. – 2004. – V. 230, N. 2. – P. 171–176.
146. Chen, W. The apoptosis effect of hispolon from *Phellinus linteus* (Berkeley and Curtis) Teng on human epidermoid KB cells / W. Chen, F.Y. He, Y.Q. Li // Journal of Ethnopharmacology. – 2006b. – V. 105, N. 1–2. – P. 280–285.
147. Chen, W. Analysis and evaluation of tasty components in the pileus and stipe of *Lentinula edodes* at different growth stages / W. Chen [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2015. – V. 63, N. 3. – P. 795–801.
148. Chen, W. Hispolon induces apoptosis in human gastric cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway / W. Chen [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2008. – V. 45, N. 1. – P. 60–72.
149. Chen, W.Y. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of fungal immunomodulatory protein involving microglial inhibition / W.Y. Chen [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2018c. – V. 19. – P. 3678.
150. Chen, X. Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared with a fungal exopolysaccharide in water / X. Chen, J.K. Yan, J.Y. Wu // Food Hydrocolloids. – 2016. – V. 53. – P. 69–74.
151. Chen, X.D. Separation, purification and antitumor activities of low molecular weight polysaccharide from *Grifola frondosa* / X.D. Chen, X.W. Liu, W.T. Wu // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2005. – V. 4, N. 1. – P. 77–80.
152. Chen, Y.C. Hispolon from *Phellinus linteus* induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in NB4 human leukaemia cells / Y. Chen [et al.] // American Journal of Chinese Medicine. – 2013. – V. 41, N. 6. – P. 1439–1457.
153. Cheng, P.G. Chemical compounds and computational prediction of their inhibitory effects on the HIV-1 gp120 receptor by lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), with antler-like morphology of fruiting bodies / P.G. Cheng, T.C. Teoh, M. Rizman-Idid // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2021. – V. 23. – P. 63–77.
154. Chernikov, O. Lectin CGL from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* induces Burkitt's lymphoma cells death via interaction with surface glycan / O. Chernikov [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V. 104, N. A. – P. 508–514.
155. Chihara, G. Immunopharmacology of Lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: its applications as a host defence potentiator / G. Chihara // International Journal of Oriental Medicine. – 1992. – V. 17. – P. 57–77.
156. Chiu, K.Y. Antcin-H isolated from *Antrodia cinnamomea* inhibits renal cancer cell invasion partly through inactivation of FAK-ERK-C/EBP- β /c-Fos-MMP-7 pathways / K.Y. Chiu [et

al.] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2017. – V. 2017. – P. 5052870.

157. Chiu, L.Y. Combination treatment of Src inhibitor Saracatinib with GMI, a *Ganoderma microsporum* immunomodulatory protein, induce synthetic lethality via autophagy and apoptosis in lung cancer cells / L.Y. Chiu [*et al.*] // Journal of Cellular Physiology. – 2021. – V. 236. – P. 1148–1157.

158. Chiu, L.Y. Immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum* induces pro-death autophagy through akt-mTOR-p70S6K pathway inhibition in multidrug resistant lung cancer cells/ L.Y. Chiu [*et al.*] // PLoS One. – 2015. – V. 10. – e125774.

159. Choi, Y.H. P53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells / Y.H. Choi [*et al.*] // Japanese Journal of Cancer Research. – 2000. – V. 91, N. 2. – P. 164–173.

160. Chowdhury, S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria / S. Chowdhury, A. Basu, S. Kundu // Nanoscale Research Letters. – 2014. – V. 9. – P. 365.

161. Chum, W.W.Y. Gene expression studies of the dikaryotic mycelium and primordium of *Lentinula edodes* by serial analysis of gene expression / W.W.Y. Chum [*et al.*] // Mycological research. – 2008. – V. 112. – P. 950–964.

162. Ciechanover, A. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction / A. Ciechanover, A. Orian, A.L. Schwartz // BioEssays. – 2000. – V. 22, N. 5. – P. 442–451.

163. Clarence, P. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its *in vitro* anticancer and biomedical applications / P. Clarence [*et al.*] // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2020. – V. 27. – P. 706–712.

164. Conrad, M. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / M. Conrad [*et al.*] // FEMS Microbiology Reviews. – 2014. – V. 38. – P. 254–299.

165. Cör, D. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review / D. Cör, Ž. Knez, M. Knez Hrnčič // Molecules. – 2018. – V. 23, N. 3. – P. 649.

166. Corrochano, L.M. Light in the fungal world: from photoreception to gene transcription and beyond / L.M. Corrochano // Annual Review of Genetics. – 2019. – V. 53. – P. 149–170.

167. Cossins, E.A. Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi / E.A. Cossins, L. Chen // Phytochemistry. – 1997. – V. 45, N. 3. – P. 437–452.

168. Council of Europe, Treaty Office. Details of treaty no. 123: European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, Cedex, Strasbourg. <http://conventions.coe.int/treaty/Commun/QueVoulezVousasp?CL=RUS&NT=123,2016>.

169. Craig, W. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance / W. Craig [*et al.*] // Transgenic Research. –

2008. – V. 17. – P. 769–782.

170. Cui, F. Purification and partial characterization of a novel anti-tumor glycoprotein from cultured mycelia of *Grifola frondosa* / F. Cui [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – V. 62. – P. 684–690.

171. Cui, Z. *Botrytis cinerea* chitin synthase BcChsVI is required for normal growth and pathogenicity / Z. Cui [et al.] // Current Genetics. – 2013. – V. 59. – P. 119–128.

172. Cunha, F.A. Biogenic synthesis of multifunctional silver nanoparticles from *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*: antifungal, catalytic and cytotoxicity activities / F.A. Cunha [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – V. 34. – P. 127.

173. Cupp-Enyard, C. Sigma's non-specific protease activity assay—casein as a substrate / C. Cupp-Enyard // Journal of Visualized Experiments. – 2008. – V. 19. – e899.

174. Curgy, J.J. Influence du mode de fixation sur la possibilite d'observer des structures myeliniques dans les hepatocytes d'embryons de poulet / J.J. Curgy // Journal of Microscopy. – 1968. – V. 7. – P. 63–80.

175. Dai, Y.C. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China: A review / Y.C. Dai [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2008. – V. 11, N. 3. – P. 287–302.

176. Danagoudar, A. Characterization, cytotoxic and antioxidant potential of silver nanoparticles biosynthesised using endophytic fungus *Penicillium citrinum* CGJ-C1 / A. Danagoudar [et al.] // Materials Today Communications. – 2020. – V. 25. – P. 101385.

177. Dandapat, S. *Ganoderma applanatum* extract mediated synthesis of silver nanoparticles / S. Dandapat [et al.] // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2022. – V. 58. – e19173.

178. Dar, A.A. The FAD2 Gene in Plants: Occurrence, Regulation, and Role / A.A. Dar [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2017. – V. 8. – P. 1789.

179. Das, N. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida* / N. Das, S. Sengupta, M. Mukherjee // Applied and Environmental Microbiology. – 1997. – V. 63. – P. 4120–4122.

180. Das, R.K. Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects / R.K. Das [et al.] // Nanotechnology for Environmental Engineering. – 2017. – V. 2. – P. 18.

181. Das, S.K. Gold nanoparticles: microbial synthesis and application in water hygiene management / S.K. Das, A.R. Das, A.K. Guha // Langmuir. – 2009. – V. 25, N. 14. – P. 8192–8199.

182. Dat, T.D. Characterization and bioactivities of silver nanoparticles green synthesized from Vietnamese *Ganoderma lucidum* / T.D. Dat [et al.] // Surfaces and Interfaces. – 2021. – V. 27. – P. 101453.

183. De Paula, C.C.P. High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (*Catão cave*) in Brazil / C.C.P. De Paula [et al.] // Anais da Academia Brasileira de Ciencias. – 2019. – V. 91, N. 3. – e20180583.

184. De Silva, D.D. Bioactive metabolites from macrofungi: Ethnopharmacology, biological activities and chemistry / D.D. De Silva [et al.] // Fungal Diversity. – 2013. – V. 62, N. 1. – P. 1–40.
185. Debnath, G. Characterization, antimicrobial and α -amylase inhibitory activity of silver nanoparticles synthesized by using mushroom extract of *Lentinus tuber-regium* / G. Debnath, P. Das, A.K. Saha // Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B: Biological Sciences. – 2020. – V. 90. – P. 37–45.
186. Dedyukhina, E.G. Biosynthesis of arachidonic acid by micromycetes: A review / E.G. Dedyukhina, T.I. Chistyakova, M.B. Vainshtein // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2011. – V. 47, N. 2. – P. 109–117.
187. Deepalakshmi, K. Anti-proliferative and apoptotic effect of *Pleurotus ostreatus* on human mammary carcinoma cell line (michigan cancer foundation-7) / K. Deepalakshmi, S. Mirunalini // Cancer Translational Medicine. – 2016. – V. 2, N. 4. – P. 95–104.
188. Deka, A.C. Mycogenic silver nanoparticle biosynthesis and its pesticide degradation potentials / A.C. Deka, S.K. Sinha // International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research. – 2015. – V. 3. – P. 108–113.
189. Deng, G. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects / G. Deng [et al.] // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2009. – V. 135, N. 9. – P. 1215–1221.
190. Dermiki, M. Contributions of non-volatile and volatile compounds to the umami taste and overall flavour of shiitake mushroom extracts and their application as flavour enhancers in cooked minced meat / M. Dermiki [et al.] // Food Chemistry. – 2013. – V. 141, N. 1. – P. 77–83.
191. Devi, K.S. Molecular mechanisms associated with particulate and soluble heteroglycan mediated immune response / K.S. Devi [et al.] // Journal of Cellular Biochemistry. – 2016. – V. 117, N. 7. – P. 1580–1593.
192. Devi, K.S. Immunomodulatory and anti-cancer properties of pharmacologically relevant mushroom glycans / K.S. Devi, T.K. Maiti // Recent Patents on Biotechnology. – 2016. – V. 10, N. 1. – P. 72–78.
193. Devi, L. Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi / L. Devi, S. Joshi // Journal of Microscopy and Ultrastructure. – 2015. – V. 3. – P. 29.
194. Dhanasekaran, D. Extracellular biosynthesis, characterisation and *in vitro* antibacterial potential of silver nanoparticles using *Agaricus bisporus* / D. Dhanasekaran [et al.] // Journal of Experimental Nanoscience. – 2013. – V. 8, N. 4. – P. 579–588.
195. Dhand, C. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview / C. Dhand [et al.] // RSC Advances. – 2015. – V. 5. – P. 105003–105037.

196. Dhanjal, S. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil / S. Dhanjal, S.S. Cameotra // Microbial Cell Factories. – 2010. – V. 9. – P. 52–62.
197. Dheyab, M.A. Mycosynthesis of gold nanoparticles by the *Portabello* mushroom extract, *Agaricaceae*, and their efficacy for decolorization of Azo dye / M.A. Dheyab [et al.] // Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management. – 2020. – V. 14. – P. 100312.
198. Dhillon, G.S. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications / G.S. Dhillon [et al.] // Critical Reviews in Biotechnology. – 2012. – V. 32, N. 1. – P. 49–73.
199. Diko, C.S. Optimal synthesis conditions and characterization of selenium nanoparticles in *Trichoderma sp.* WL-Go culture broth. Mater / C.S. Diko [et al.] // Chemical Physics. – 2020. – V. 246. – P. 122583.
200. Ding, J.H. A new cadinane sesquiterpenoid from cultures of the basidiomycete *Panus conchatus* / J.H. Ding [et al.] // Natural Product Research. – 2018. – V. 32, N. 19. – P. 2333–2337.
201. Dodd, J.L. Starch in fungi. Its molecular structure in three genera and hypothesis concerning its physiological role / J.L. Dodd, D.A. McCracken // Mycologia. – 1972. – V. 64, N. 6. – P. 1341–1343.
202. Dong, Y. *De novo* transcriptome analysis of the willow bracket medicinal mushroom *Phellinus igniarius* (Agaricomycetes) by RNA sequencing / Y. Dong [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2021. – V. 23, N. 8. – P. 77–88.
203. Dotan, N. The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator / N. Dotan, S.P. Wasser, J. Mahajna // Integrative Cancer Therapies. – 2011. – V. 10, N. 2. – P. 148–159.
204. Dreaden, E.C. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine / E.C. Dreaden [et al.] // Chemical Society Reviews. – 2012. – V. 41, N. 7. – P. 2740–2779.
205. Du, M. Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity / M. Du [et al.] // European Food Research and Technology. – 2007. – V. 224, N. 5. – P. 659–665.
206. Du, Y.C. Chemical profiling of the cytotoxic triterpenoid-concentrating fraction and characterization of ergostane stereo-isomer ingredients from *Antrodia camphorata* / Y.C. Du [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2012. – V. 58. – P. 182–192.
207. Dubois, M. Calorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois [et al.] // Analytical Chemistry. – 1956. – V. 28. – P. 350–356.
208. Durán, A. Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane / A. Durán, B. Bowers, E. Cabib // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1975. – V. 72. – P. 3952–3955.

209. Durán, M. Catalytic role of traditional enzymes for biosynthesis of biogenic metallic nanoparticles: A mini-review / M. Durán, C.P. Silveira, N. Durán // IET Nanobiotechnology. – 2015. – V. 9, N. 5. – P. 314–323.
210. Durán, N. Biogenic silver nanoparticles associated with silver chloride nanoparticles (Ag-AgCl) produced by laccase from *Trametes versicolor* / N. Durán [et al.] // Springer Plus. – 2014. – V. 3. – P. 645–651.
211. Durán, N. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment / N. Durán [et al.] // Journal of Biomedical Nanotechnology. – 2007. – V. 3, N. 2. – P. 203–208.
212. Dykman, L.A. Methods for chemical synthesis of colloidal gold / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov // Russian Chemical Reviews. – 2019. – V. 88, N. 3. – P. 229–247.
213. Dykman, L.A. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov // Chemical Society Reviews. – 2012. – V. 41, N. 6. – P. 2256–2282.
214. Eastwood, D.C. Environmental regulation of reproductive phase change in *Agaricus bisporus* by 1-octen-3-ol, temperature and CO₂ / D.C. Eastwood [et al.] // Fungal Genetics and Biology. – 2013. – V. 55. – P. 54–66.
215. Eddy, S.R. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference / S.R. Eddy // Genomics and Informatics. – 2009. – V. 23, N. 1. – P. 205–211.
216. Eger-Hummel, G. Blue-light photomorphogenesis in mushrooms (Basidiomycetes) / G. Eger-Hummel // Ed. H. Senger. In: The blue light syndrome: proceedings in life sciences. – Springer, Berlin, Germany, 1980. – P. 555–562.
217. Eira, A.F. Is widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? / A.F. Eira [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2002. – V. 4, N. 4. – P. 267–290.
218. El Domany, E.B. Biosynthesis physico-chemical optimization of gold nanoparticles as anti-cancer and synergetic antimicrobial activity using *Pleurotus ostreatus* fungus / E.B. El Domany [et al.] // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2018. – V. 8, N. 5. – P. 119–128.
219. El Enshasy, H.A. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications / H.A. El Enshasy, R. Hatti-Kaul // Trends in Biotechnology. – 2013. – V. 31, N. 12. – P. 668–677.
220. Elahi, N. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review / N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad // Talanta. – 2018. – V. 184. – P. 537–556.
221. El-Batal, A.I. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles / A.I. El-Batal [et al.] // Biotechnology Reports. – 2015. – V. 5. – P. 31–39.

222. Elegbede, J.A. Fungal xylanases-mediated synthesis of silver nanoparticles for catalytic and biomedical applications / J.A. Elegbede [et al.] // IET Nanobiotechnology. – 2018. – V. 12. – P. 857–863.
223. El-Sayyad, G.S. Gentamicin-assisted mycogenic selenium nanoparticles synthesized under gamma irradiation for robust reluctance of resistant urinary tract infection-causing pathogens / G.S. El-Sayyad [et al.] // Biological Trace Element Research. – 2020. – V. 195. – P. 323–342.
224. El-Sonbaty, S.M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antitumor activity / S.M. El-Sonbaty // Cancer Nanotechnology. – 2013. – V. 4, N. 4–5. – P. 73–79.
225. Elumalai, D. Biofabrication of gold nanoparticles using *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against human colon cancer cell line (HT-29) / D. Elumalai [et al.] // Bulletin of Materials Science. – 2021. – V. 44. – P. 132.
226. Erkel, G. Inhibition of NF- κ B activation by panepoxydone / G. Erkel, T. Anke, O. Sterner // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1996. – V. 226, N. 1. – P. 214–221.
227. Erkel, G. Influence of the fungal NF- κ B inhibitor panepoxydone on inflammatory gene expression in MonoMac6 cells / G. Erkel, G. Wisser, T. Anke // International Immunopharmacology. – 2007. – V. 7, N. 5. – P. 612–624.
228. Eskandari-Nojehdehi, M. Hydrothermal green synthesis of gold nanoparticles using mushroom (*Agaricus bisporus*) extract: physico-chemical characteristics and antifungal activity studies / M. Eskandari-Nojehdehi, H. Jafarizadeh-Malmiri, J. Rahbar-Shahrrouzi // Green Processing and Synthesis. – 2018. – V. 7. – P. 38–47.
229. Eskandari-Nojehdehi, M. Optimization of processing parameters in green synthesis of gold nanoparticles using microwave and edible mushroom (*Agaricus bisporus*) extract and evaluation of their antibacterial activity / M. Eskandari-Nojehdehi, H. Jafarizadeh-Malmiri, J. Rahbar-Shahrrouzi // Nanotechnology Reviews. – 2016. – V. 5, N. 6. – P. 537–548.
230. Espinosa-Ortiz, E.J. Sorption of zinc onto elemental selenium nanoparticles immobilized in *Phanerochaete chrysosporium* pellets / E.J. Espinosa-Ortiz [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – V. 23. – P. 21619–21630.
231. Evsenko, M.S. Polysaccharides of basidiomycetes. Alkali-soluble polysaccharides from the mycelium of white rot fungus *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. / M.S. Evsenko [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2009. – V. 74. – P. 533–542.
232. Ewing, B. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment / B. Ewing [et al.] // Genome Research. – 1998. – V. 8, N. 3. – P. 175–185.
233. Faisal, S. Edible mushroom (*Flammulina velutipes*) as biosource for silver nanoparticles: from synthesis to diverse biomedical and environmental applications / S. Faisal [et al.] // Nanotechnology. – 2021. – V. 32. – P. 065101.

234. Fajgenbaum, D. Cytokine storm / D. Fajgenbaum, C. June // New England Journal of Medicine. – 2020. – V. 383, N. 23. – P. 2255–2273.
235. Fan, M.J. Crude extracts of *Agaricus brasiliensis* induce apoptosis in human oral cancer CAL 27 cells through a mitochondria-dependent pathway / M.J. Fan [et al.] // *In vivo*. – 2011. – V. 25, N. 3. – P. 355–366.
236. Faoro, F. Contributions of ultrastructural studies to the knowledge of filamentous fungi biology and fungi-plant interactions / F. Faoro, A. Faccio, R. Balestrini // *Frontiers in Fungal Biology*. – 2022. – V. 2. – P. 805739.
237. Faramarzi, M.A. Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles produced by laccase from *Paraconiothyrium variable* / M.A. Faramarzi, H. Forootanfara // *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – V. 87, N. 1. – P. 23–27.
238. Farzana Fathima, M.R. Mycosynthesis of noble metal nanoparticle using *Laetiporus versisporus* mushroom and analysis of antioxidant activity / M.R. Farzana Fathima [et al.] // *Journal of Nanomaterials*. – 2022. – V. 2022. – P. 8086803.
239. Fatima, F. Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera* / F. Fatima [et al.] // *BMC Microbiology*. – 2015. – V. 15, N. 1. – P. 52.
240. Feofilova, E.P. Fungal cell wall / E.P. Feofilova. – M.: Nauka, 1983. – 248 pp.
241. Feofilova, E.P. The key role of chitin in the cell wall of fungi / Chitin and chitosan: preparation, properties and applications / E.P. Feofilova. – M.: Nauka, 2002. – P. 91–111.
242. Fernández, J.G. Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi / J.G. Fernández [et al.] // *Process Biochemistry*. – 2016. – V. 51. – P. 1306–1313.
243. Feroze, N. Fungal mediated synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antibacterial activity / N. Feroze [et al.] // *Microscopy Research and Technique*. – 2020. – V. 83. – P. 72–80.
244. Ferreira, I.C.F.R. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential / I.C.F.R. Ferreira [et al.] // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2010. – V. 10, N. 5. – P. 424–436.
245. Fisher, R.A. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P / R.A. Fisher // *Journal of the Royal Statistical Society*. – 1922. – V. 85, N. 1. – P. 87–94.
246. Fogarty, R.V. Fungal melanins and their interaction with metals / R.V. Fogarty, J.M. Tobin // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1996. – V. 19, N. 4. – P. 311–317.
247. Fontaine, T. Purification and characterization of an endo- α -1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* / T. Fontaine [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1997. – V. 243. – P. 315–321.
248. Fouda, A. Light enhanced the antimicrobial, anticancer, and catalytic activities of selenium nanoparticles fabricated by endophytic fungal strain, *Penicillium crustosum* EP-1 / A. Fouda

[et al.] // Scientific Reports. – 2022. – V. 12. – P. 11834.

249. Franci, G. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents / G. Franci [et al.] // Molecules. – 2015. – V. 20, N. 5. – P. 8856–8874.

250. Frandsen, R.J.N. The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones / R.J.N. Frandsen [et al.] // Molecular Microbiology. – 2006. – V. 61, N. 4. – P. 1069–1080.

251. Froehlich, A.C. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa* / A.C. Froehlich [et al.] // Eukaryotic Cell. – 2005. – V. 4, N. 12. – P. 2140–2152.

252. Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology / Ed. Purchase D. – Switzerland: Springer International Publishing, 2016. – 405 pp.

253. Gade, A. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications / A. Gade [et al.] // Biotechnology Letters. – 2010. – V. 32, N. 5. – P. 593–600.

254. Gade, A.K. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles / A.K. Gade [et al.] // Journal of Biobased Materials and Bioenergy. – 2008. – V. 2. – P. 243–247.

255. Gaitán-Hernández, R. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues / R. Gaitán-Hernández [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2006. – V. 71, N. 4. – P. 432–439.

256. Ganesan, N. *Antrodia cinnamomea* – An updated mini-review of its bioactive components and biological activity / N. Ganesan [et al.] // Journal of Food Biochemistry. – 2019. – V. 43, N. 2. – e12936.

257. Gao, J.J. *In vivo* antitumor effects of bitter principles from the antlered form of fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* / J.J. Gao [et al.] // Journal of Natural Medicines. – 2006. – V. 60. – P. 42–48.

258. Gao, J.J. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells / J.J. Gao [et al.] // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2002. – V. 50, N. 6. – P. 837–840.

259. Gao, X. Hollow sphere selenium nanoparticles: their *in-vitro* anti hydroxyl radical effect / X. Gao, J. Zhang // Advanced Materials. – 2002. – V. 14. – P. 290–293.

260. Gao, Y. Immunomodulating activities of *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties / Y. Gao, E. Chan, S. Zhou // Food Reviews International. – 2004. – V. 20. – P. 123–161.

261. Gao, Y. Cancer prevention and treatment by *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties / Y. Gao, S. Zhou // Food Reviews International. – 2003a. – V. 19. – P. 275–325.

262. Gao, Y. Effects of ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients / Y. Gao [et al.] // Immunological investigations. – 2003b. – V. 32, N. 3. – P. 201–215.

263. Garbisu, C. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium / C. Garbisu [et al.] // Chemical Geology. – 1996. – V. 132, N. 1–4. – P. 199–204.
264. Garcia-Rubio, R. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species / R. Garcia-Rubio // Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 10. – P. 2993.
265. Garibova, L.V. Biology of *Lentinus edodes*. I. Morphologo-cultural and physiologo-biochemical characteristics / L.V. Garibova [et al.] // Mikology and Fitopatology. – 1999. – V. 33, N. 2. – P. 107–110.
266. Gatoo, M.A. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations / M.A. Gatoo [et al.] // BioMed Research International. – 2014. – V. 2014, N. 498420. – P. 1–8.
267. Ge, Y. Role of AMPK mediated pathways in autophagy and aging / Y. Ge [et al.] // Biochimie. – 2022. – V. 195. – P. 100–113.
268. Gellon, L. Intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphatylase activity in *Saccharomyces cerevisiae* Trf4 protein with a possible role in base excision DNA repair / L. Gellon [et al.] // DNA Repair. – 2008. – V. 7, N. 2. – P. 187–198.
269. Ghangal, R. Optimization of de novo short read assembly of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome / R. Ghangal [et al.] // PLoS One. – 2013. – V. 8, N. 8. – e72516.
270. Gharieb, M.M. Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphic and filamentous fungi: Cellular location of reduced selenium and implications for tolerance / M.M. Gharieb, S.C. Wilkinson, G.M. Gadd // Journal of Industrial Microbiology. – 1995. – V. 14. – P. 300–311.
271. Gholami-Shabani, M. Antimicrobial activity and physical characterization of silver nanoparticles green synthesized using nitrate reductase from *Fusarium oxysporum* / M. Gholami-Shabani [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – V. 172. – P. 4084–4098.
272. Giard, D.J. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors / D.J. Giard [et al.] // Journal of the National Cancer Institute. – 1973. – V. 51. – P. 1417–1423.
273. Gil, Y.G. Synthesis of porous Pd nanoparticles by therapeutic chaga extract for highly efficient tri-modal cancer treatment / Y.G. Gil [et al.] // Nanoscale. – 2018. – V. 10. – P. 19810–19817.
274. Glenn, J.K. Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* / J.K. Glenn, M.H. Gold // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1985. – V. 242, N. 2. – P. 329–341.
275. Golak, I.S. Bioactive compounds and medicinal properties of oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.): A review / I.S. Golak [et al.] // Folia Horticulturae. – 2018. – V. 30, N. 2. – P. 1–21.
276. Gonindard, C. Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic toward cancer cells than normal cells *in vitro* / C. Gonindard [et al.] // Cell Biology and Toxicology. – 1997. – V. 13, N. 3. – P. 141–153.

277. González Fá, A.J. Synthesis and characterization of silver nanoparticles prepared with honey: the role of carbohydrates / A.J. González Fá, A. Juan, M.S. Di Nezio // *Analytical Letters*. – 2017. – V. 50. – P. 877–888.
278. Good, M. The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation / M. Good [et al.] // *Cell*. – 2009. – V. 136, N. 6. – P. 1085–1097.
279. Goodridge, H.S. β -Glucan recognition by the innate immune system / H.S. Goodridge, A.J. Wolf, D.M. Underhill // *Immunological Reviews*. – 2009. – V. 230, N. 1. – P. 38–50.
280. Goodwin, S. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies / S. Goodwin, J.D. McPherson, W.R. McCombie // *Nature Reviews Genetics*. – 2016. – V. 17, N. 6. – P. 333–351.
281. Gow, N.A.R. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function / N.A.R. Gow, J.P. Latge, C.A. Munro // *Microbiology Spectrum*. – 2017. – V. 5. – P. 267–292.
282. Grabherr, M.G. Full-length transcriptome assembly from RNASeq data without a reference genome / M.G. Grabherr [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2011. – V. 29, N. 7. – P. 644–652.
283. Grasso, G. Microbial nanotechnology: challenges and prospects for green biocatalytic synthesis of nanoscale materials for sensoristic and biomedical applications / G. Grasso, D. Zane, R. Dragone // *Nanomaterials*. – 2020. – V. 10, N. 1. – P. 1–11.
284. Gu, Y.H. Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes* / Y.H. Gu, M.A. Belury // *Cancer Letters*. – 2005. – V. 220, N. 1. – P. 21–28.
285. Gubaev, R.F. Algorithm for physiological interpretation of transcriptome profiling data for non-model organisms / R.F. Gubaev, E.P. Vetchinkina [et al.] // *Molecular Biology (Moscow)*. – 2018. – V. 52. – P. 497–509.
286. Guilger-Casagrande, M. Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: A review / M. Guilger-Casagrande, R. Lima // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2019. – V. 7. – P. 287.
287. Guisbiers, G. Nanomaterial properties: size and shape dependencies / G. Guisbiers, S. Mejía-Rosales, F.L. Deepak // *Journal of Nanomaterials*. – 2012. – V. 2012. – P. 180976.
288. Gustin, M.C. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / M.C. Gustin [et al.] // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1998. – V. 62, N. 4. – P. 1264–1300.
289. Gutierrez, A. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus* / A. Gutierrez, A. Prieto, A.T. Martinez // *Carbohydrate Research*. – 1996. – V. 281. – P. 143–154.
290. Hake, S. Plant morphogenesis and KNOX genes / S. Hake, N. Ori // *Nature Genetics*. – 2002. – V. 31, N. 2. – P. 121–122.

291. Hamida, R.S. Lichens – a potential source for nanoparticles fabrication: a review on nanoparticles biosynthesis and their prospective applications / R.S. Hamida [et al.] // Journal of Fungi. – 2021. – V. 7. – P. 291.
292. Handa, N. An unusual lanostane-type triterpenoid, spiroinonotsuoxodiol, and other triterpenoids from *Inonotus obliquus* / N. Handa, T. Yamada, R. Tanaka // Phytochemistry. – 2010. – V. 71, N. 14–15. – P. 1774–1779.
293. Hanson, S. Chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoproteins / S. Hanson [et al.] // Trends in Biochemical Sciences. – 2004. – V. 29. – P. 656–663.
294. Hardcastle, T.J. BaySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data / T.J. Hardcastle, K.A. Kelly // BMC Bioinformatics. – 2010. – V. 11. – P. 422.
295. Harki, E. Purification, characterization and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. / E. Harki, T. Talou, R. Dargent // Food Chemistry. – 1997. – V. 58, N. 1–2. – P. 69–73.
296. Hashem, A.H. Biomedical applications of mycosynthesized selenium nanoparticles using *Penicillium expansum* ATTC 36200 / A.H. Hashem [et al.] // Biological Trace Element Research. – 2021. – V. 199. – P. 3998–4008.
297. Haznedaroglu, B.Z. Optimization of *de novo* transcriptome assembly from high-throughput short read sequencing data improves functional annotation for non-model organisms / B.Z. Haznedaroglu [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2012. – V. 13. – P. 170.
298. He, K. Applications of white rot fungi in bioremediation with nanoparticles and biosynthesis of metallic nanoparticles / K. He [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017. – V. 101. – P. 4853–4862.
299. He, Y. *Grifola frondosa* polysaccharide: a review of antitumor and other biological activity studies in China / Y. He [et al.] // Discovery Medicine. – 2018. – V. 25, N. 138. – P. 159–176.
300. He, Y. The biological activities of the antitumor drug *Grifola frondosa* polysaccharide / Y. He, L. Zhang, H. Wang // Progress in Molecular Biology and Translational Science. – 2019. – V. 163. – P. 221–261.
301. Hegedüs, B. Morphogenesis, starvation, and light responses in a mushroom-forming fungus revealed by long-read sequencing and extensive expression profiling / B. Hegedüs [et al.] // Cell Genomics. – 2025. – V. 5, N. 100853. – P. 1–42.
302. Helenius, A. Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum / A. Helenius, M. Aebi // Annual Review of Biochemistry. – 2004. – V. 73, N. 1. – P. 1019–1049.
303. Hemashekhar, B. Endophytic fungus *Alternaria* spp. isolated from *Rauvolfia tetraphylla* root arbitrate synthesis of gold nanoparticles and evaluation of their antibacterial, antioxidant and antimitotic activities / B. Hemashekhar [et al.] // Advances in Natural Sciences: Nanoscience and

Nanotechnology. – 2019. – V. 10. – P. 035010.

304. Hezel, M. Propidium iodide staining: a new application in fluorescence microscopy for analysis of cytoarchitecture in adult and developing rodent brain / M. Hezel [et al.] // *Micron*. – 2012. – V. 43. – P. 1031–1038.

305. Hiraide, M. The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes*: relationship between sensory evaluations and amounts of odorous components / M. Hiraide, Y. Miyazaki, Y. Shibata // *Journal of Wood Science*. – 2004. – V. 50. – P. 358–364.

306. Hobbs, C.R. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (*Agaricomycetidae*). A literature review / C.R. Hobbs // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2000. – V. 2, N. 4. – P. 287–302.

307. Hobbs, C.R. Medicinal value of Turkey Tail fungus *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát (*Aphyllphoromycetidae*) / C.R. Hobbs // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2004. – V. 6, N. 3. – P. 195–218.

308. Hobbs, C.R. The chemistry, nutritional value, immunopharmacology, and safety of the traditional food of medicinal split-gill fungus *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (*Aphyllphoromycetidae*). A literature review / C.R. Hobbs // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2005. – V. 7, N. 1–2. – P. 127–140.

309. Holliday, H. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (*Ascomycetes*). A review / H. Holliday, M. Cleaver // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2008. – V. 10, N. 3. – P. 219–234.

310. Honaas, L.A. Selecting superior *de novo* transcriptome assemblies: lessons learned by leveraging the best plant genome / L.A. Honaas [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – V. 11, N. 1. – e0146062.

311. Hseu, Y.C. *Ganoderma tsugae* induced ROS-independent apoptosis and cytoprotective autophagy in human chronic myeloid leukemia cells / Y.C. Hseu [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2019. – V. 124. – P. 30–44.

312. Hsieh, P.W. Chemistry and biology of *Phellinus linteus* / P.W. Hsieh, J.B. Wu, Y.C. Wu // *BioMed*. – 2013. – V. 3, N. 3. – P. 106–113.

313. Hsu, C.L. Lucidenic acid B induces apoptosis in human leukemia cells via a mitochondria-mediated pathway / C.L. Hsu, Y.S. Yu, G.C. Yen // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – V. 56, N. 11. – P. 3973–3980.

314. Hsua, S.C. *Ganoderma tsugae* extracts inhibit colorectal cancer cell growth via G2/M cell cycle arrest / S.C. Hsua [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2008. – V. 120, N. 3. – P. 394–401.

315. Hu, D. Biogenic *Trichoderma harzianum* derived selenium nanoparticles with control functionalities originating from diverse recognition metabolites against phytopathogens and mycotoxins / D. Hu [et al.] // *Food Control*. – 2019. – V. 106. – P. 106748.

316. Hu, X. Mycosynthesis, characterization, anticancer and antibacterial activity of silver nanoparticles from endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus* / X. Hu [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2019. – V. 14. – P. 3427–3438.
317. Huang da, W. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources / W. Huang da, B.T. Sherman, R.A. Lempicki // Nature Protocols. – 2009. – V. 4, N. 1. – P. 44–57.
318. Huang, G.J. Hispolon induces apoptosis and cell cycle arrest of human hepatocellular carcinoma Hep3B cells by modulating ERK phosphorylation / G.J. Huang [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2011. – V. 59, N. 13. – P. 7104–7113.
319. Huang, H.C. Lanostane triterpenoids and sterols from *Antrodia camphorate* / H.C. Huang [et al.] // Phytochemistry. – 2012. – V. 84. – P. 177–183.
320. Huang, L. Green synthesis of iron nanoparticles by various tea extracts: comparative study of the reactivity / L. Huang [et al.] // Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2014. – V. 130. – P. 295–301.
321. Huang, Q. Market survey and risk assessment for trace metals in edible fungi and the substrate role in accumulation of heavy metals / Q. Huang [et al.] // Journal of Food Science. – 2015. – V. 80. – P. 1612–1618.
322. Huang, X. Comparative performance of transcriptome assembly methods for non-model organisms / X. Huang, X.G. Chen, P.A. Armbruster // BMC Genomics. – 2016. – V. 17, N. 1. – P. 523.
323. Hussein, H.G. Harnessing endophytic fungi for biosynthesis of selenium nanoparticles and exploring their bioactivities / H.G. Hussein [et al.] // AMB Express. – 2022. – V. 12. – P. 68.
324. Hyde, K.D. Fungi - an unusual source for cosmetics / K.D. Hyde, A.H. Bahkali, M.A. Moslem // Fungal Diversity. – 2010. – V. 43, N. 1. – P. 1–9.
325. Ibrahim, H.M.M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms / H.M.M. Ibrahim // Journal of Radiation Research and Applied Sciences. – 2015. – V. 8. – P. 265–275.
326. Ichinomiya, M. Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* / M. Ichinomiya [et al.] // Eukaryotic Cell. – 2005. – V. 4. – P. 1125–1136.
327. Ikekawa, T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms / T. Ikekawa // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2001. – V. 3, N. 4. – P. 291–298.
328. Ingle, A. *Fusarium solani*: A novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles / A. Ingle [et al.] // Journal of Nanoparticle Research. – 2009. – V. 11. – P. 2079–2085.
329. Inoue, A. Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion / A. Inoue, N. Kodama, H. Nanba // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2002. – V. 25. – P. 536–540.

330. Iravani, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants / S. Iravani // Green Chemistry. – 2011. – V. 13. – P. 2638–2650.
331. Iruoma, C.A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Pleurotus ostreatus* / C.A. Iruoma [et al.] // Journal of Applied Life Sciences International. – 2021. – V. 1–10.
332. Isaka, M. Astraeusins AeL, lanostane triterpenoids from the edible mushroom *Astraeus odoratus* / M. Isaka [et al.] // Tetrahedron. – 2016. – V. 72. – P. 3288–3295.
333. Ishida, K. Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts / K. Ishida [et al.] // Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2013. – V. 109. – P. 220–228.
334. Isner, J.C. CGMP signalling in plants: from enigma to main stream / J.C. Isner, F.J.M. Maathuis // Functional Plant Biology. – 2018. – V. 45, N. 1–2. – P. 93–101.
335. Israilides, C. *In vitro* cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes* / C. Israilides [et al.] // Phytomedicine. – 2008. – V. 15, N. 6–7. – P. 512–519.
336. Ivanova, T.S. Anticancer substances of mushroom origin / T.S. Ivanova [et al.] // Experimental Oncology. – 2014. – V. 36, N. 2. – P. 58–66.
337. Ivask, A. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells *in vitro* / A. Ivask [et al.] // PLoS One. – 2014. – V. 9. – e102108.
338. Jaganathan, A. Earthworm-mediated synthesis of silver nanoparticles: a potent tool against hepatocellular carcinoma, *Plasmodium falciparum* parasites and malaria mosquitoes / A. Jaganathan [et al.] // Parasitology International. – 2016. – V. 65. – P. 276–284.
339. Jaloot, A.S. Mycosynthesizing and characterizing silver nanoparticles from the mushroom *Inonotus hispidus* (*Hymenochaetaceae*), and their antibacterial and antifungal activities / A.S. Jaloot [et al.] // Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management. – 2020. – V. 14. – P. 100313.
340. Jameel, M.S. Mycosynthesis of ultrasonically-assisted uniform cubic silver nanoparticles by isolated phenols from *Agaricus bisporus* and its antibacterial activity / M.S. Jameel [et al.] // Surfaces and Interfaces. – 2022. – V. 29. – P. 101774.
341. Janakiraman, V. Biosynthesis of silver nanoparticles from endophytic fungi, and its cytotoxic activity / V. Janakiraman, K. Govindarajan, M. CR // BioNanoScience. – 2019. – V. 9. – P. 573–579.
342. Javier, K.R.A. Dataset on the optimization by response surface methodology for the synthesis of silver nanoparticles using *Laxitextum bicolor* mushroom / K.R.A. Javier, D.H. Camacho // Data in Brief. – 2022. – V. 45. – P. 108631.
343. Jawallapersand, P. Cytochrome P450 monooxygenase CYP53 family in fungi: comparative structural and evolutionary analysis and its role as a common alternative anti-fungal drug target / P. Jawallapersand [et al.] // PLoS One. – 2014. – V. 9, N. 9. – e107209.

344. Jebali, A. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Geotricum sp.* / A. Jebali, F. Ramezani, B. Kazemi // *Journal of Cluster Science*. – 2011. – V. 22. – P. 225–232.
345. Jedinak, A. *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway / A. Jedinak, D. Sliva // *International Journal of Oncology*. – 2008. – V. 33. – P. 1307–1313.
346. Jha, P. Antimicrobial activity of biologically synthesized gold nanoparticles from wild mushroom *Cantharellus* Species / P. Jha, A. Saraf, J.K. Sohal // *Journal of Scientific Research*. – 2021. – V. 65. – P. 78–83.
347. Jiang, J. Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF- κ B signaling / J. Jiang [*et al.*] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2008. – V. 21, N. 5. – P. 577–584.
348. Jiang, J. Ganodermanontriol (GDNT) exerts its effect on growth and invasiveness of breast cancer cells through the down-regulation of CDC20 and uPA / J. Jiang, A. Jedinak, D. Sliva // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – V. 415, N. 2. – P. 325–329.
349. Jiao, H. A new 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for testing macrophage cytotoxicity to L1210 and its drug-resistant cell lines *in vitro* / H. Jiao [*et al.*] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 1992. – V. 35. – P. 412–416.
350. Jin, S. Grifolin induces apoptosis via inhibition of PI3K/AKT signaling pathway in human osteosarcoma cells / S. Jin [*et al.*] // *Apoptosis*. – 2007. – V. 12, N. 7. – P. 1317–1326.
351. Jingsong, Z. Antiproliferative effects of four extracts from medicinal fungi on different tumor cells / Z. Jingsong [*et al.*] // *Natural Product Research. Dev.* – 2000. – V. 12, N. 2. – P. 27–31.
352. Jo, I.H. Pseudo-chromosomal genome assembly in combination with comprehensive transcriptome analysis in *Agaricus bisporus* strain kmcc00540 reveals mechanical stimulus responsive genes associated with browning effect / I.H. Jo [*et al.*] // *Journal of Fungi*. – 2022. – V. 8, N. 8. – P. 886.
353. Johnson, B.M. Ganoderic acid DM: an alternative agent for the treatment of advanced prostate cancer / B.M. Johnson [*et al.*] // *Open Prostate Cancer Journal*. – 2010. – V. 3. – P. 78–85.
354. Johnson, J.A. Selenium nanoparticles: a small-angle neutron scattering study / J.A. Johnson [*et al.*] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 1999. – V. 103. – P. 59–63.
355. Jones, P. InterProScan 5: genome-scale protein function classification / P. Jones [*et al.*] // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30, N. 9. – P. 1236–1240.
356. Jones, P.M. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research / P.M. Jones, A.M. George // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2004. – V. 61, N. 6. – P. 682–699.
357. Joseph, S. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles and the study on catalytic activity in the degradation of dyes / S. Joseph, B. Mathew // *Journal of Molecular Liquids*. – 2015. – V. 204. – P. 184–191.

358. Joshi, S. Mycogenic selenium nanoparticles as potential new generation broad spectrum antifungal molecules / S. Joshi [et al.] // *Biomolecules*. – 2019. – V. 9. – P. 419.
359. Joshi, S.M. Myco-engineered selenium nanoparticles elicit resistance against tomato late blight disease by regulating differential expression of cellular, biochemical and defense responsive genes / S.M. Joshi, S. De Britto, S. Jogaiah // *Journal of Biotechnology*. – 2021. – V. 325. – P. 196–206.
360. Kalia, A. Myco-decontamination of azo dyes: nano-augmentation technologies / A. Kalia, S. Singh // *3 Biotech*. – 2020. – V. 10. – P. 384.
361. Kalimuthu, K. Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review / K. Kalimuthu [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2020. – V. 152. – P. 104296.
362. Kamada, T. Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus* / T. Kamada // *BioEssays*. – 2002. – V. 24, N. 5. – P. 449–459.
363. Kamada, T. Changes in 1,3- β -glucanase activities during stipe elongation in *Coprinus cinereus* / T. Kamada [et al.] // *Current Microbiology*. – 1985. – V. 12. – P. 251–260.
364. Kanehisa, M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes / M. Kanehisa, S. Goto // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – V. 28, N. 1. – P. 27–30.
365. Kanehisa, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets / M. Kanehisa [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – V. 40. – P. 109–114.
366. Kanokmedhakul, S. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi* / S. Kanokmedhakul [et al.] // *Tetrahedron*. – 2012. – V. 68, N. 39. – P. 8261–8266.
367. Kaplan, Ö. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using crude extracts of *Boletus edulis* and *Coriolus versicolor*: characterization, anticancer, antimicrobial and wound healing activities / Ö. Kaplan [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2021. – V. 64. – P. 102641.
368. Karwa, A.S. Naturally occurring medicinal mushroomderived antimicrobials: a case-study using lingzhi or reishi *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) P. Karst. (Higher basidiomycetes) / A.S.Karwa, M.K. Rai // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2012. – V. 14. – P. 481–490.
369. Kaur, G. Size controlled, time-efficient biosynthesis of silver nanoparticles from *Pleurotus florida* using ultra-violet, visible range, and microwave radiations / G. Kaur, A. Kalia, H.S. Sodhi // *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*. – 2020. – V. 50. – P. 35–41.
370. Kawagishi, H. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies / H. Kawagishi [et al.] // *Biochimica and Biophysica Acta*. – 1990. – V. 1034. – P. 247–252.
371. Kelly, K.L. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment / K.L. Kelly [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2003. – V. 107, N. 3. – P. 668–677.
372. Khan, A.U. Fungi-assisted silver nanoparticle synthesis and their applications / A.U. Khan [et al.] // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2018. – V. 41. – P. 1–20.

373. Khandel, P. Mycogenic nanoparticles and their bio-prospective applications: current status and future challenges / P. Khandel, S.K. Shahi // *Journal of Nanostructure in Chemistry*. – 2018. – V. 8. – P. 369–391.
374. Khanna, P.K. Synthesis of silver nanoparticles using cod liver oil (fish oil): green approach to nanotechnology / P.K. Khanna, C.K.K. Nair // *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry*. – 2009. – V. 1. – P. 3–9.
375. Kharissova, O.V. The greener synthesis of nanoparticles / O.V. Kharissova [et al.] // *Trends in Biotechnology*. – 2013. – V. 31, N. 4. – P. 240–248.
376. Khlebtsov, N.G. Universal determination of gold concentration in colloids with UV–vis spectroscopy / N.G. Khlebtsov [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry*. – 2022. – V. 126, N. 45. – P. 19268–19276.
377. Kikuchi, T. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of triterpene acids from *Poria cocos* / T. Kikuchi [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2011. – V. 74, N. 2. – P. 137–144.
378. Kim, D. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements / D. Kim, B. Langmead, S.L. Salzberg // *Nature Methods*. – 2015. – V. 12, N. 4. – P. 357–360.
379. Kim, D.W. Draft genome sequence of the white-rot fungus *Schizophyllum commune* IUM1114-SS01 / D.W. Kim [et al.] // *Mycobiology*. – 2021. – V. 49, N. 1. – P. 86–88.
380. Kim, H.I. Transcriptome and gene ontology (GO) enrichment analysis reveals genes involved in biotin metabolism that affect *L*-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* / H.I. Kim, J.H. Kim, Y.J. Park // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – V. 17, N. 3. – P. 353.
381. Kim, J.E. *Gibberella zeae* chitin synthase genes, GzCHS5 and GzCHS7, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity / J.E. Kim [et al.] // *Current Genetics*. – 2009. – V. 55. – P. 449–459.
382. Kim, J.Y. Transcriptome analysis of the edible mushroom *Lentinula edodes* in response to blue light / J.Y. Kim [et al.] // *PLoS One*. – 2020. – V. 15, N. 3. – e0230680.
383. Kim, T.H. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles / T.H. Kim [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2012. – V. 100, N. 4. – P. 1033–1043.
384. Kim, Y.J. Chemical constituents from the sclerotia of *Inonotus obliquus* / Y.J. Kim [et al.] // *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. – 2011. – V. 54. – P. 287–294.
385. Kimura, Y. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance / Y. Kimura, M. Taniguchi, K. Baba // *Anticancer Research*. – 2002. – V. 22, N. 6A. – P. 3309–3318.
386. Kirk, T. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium* effect of selected growth condition and use mutant strain / T. Kirk [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1986. – V. 8. – P. 27–32.
387. Kitching, M. Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up / M.

Kitching, M. Ramani, E. Marsili // Microbial Biotechnology. – 2015. – V. 8, N. 6. – P. 904–917.

388. Kiyama, R. Genome sequence of the cauliflower mushroom *Sparassis crispa* (Hanabiratake) and its association with beneficial usage / R. Kiyama [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – V. 8, N. 16053. – P. 1–11.

389. Klaus, A. The antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from medicinal mushrooms / A. Klaus [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2020. – V. 22. – P. 869–883.

390. Knabe, N. A central role for Ras1 in morphogenesis of the basidiomycete *Schizophyllum commune* / N. Knabe [et al.] // Eukaryot Cell. – 2013. – V. 12, N. 6. – P. 941–952.

391. Kobashigawa, J.M. Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi *Trametes trogii* / J.M. Kobashigawa [et al.] // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2019. – V. 26. – P. 1331–1337.

392. Kobori, M. 5 α -, 8 α -Epidioxy-22E-ergosta-6,9(11), 22-trien 3 β -ol from an edible mushroom suppresses growth of HL60 leukemia and HT29 colon adenocarcinoma cell / M. Kobori [et al.] // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2006. – V. 29, N. 4. – P. 755–759.

393. Kocourek, J. A note on the recent discussion on definition of the term “Lectin” / J. Kocourek, V. Horejsi // Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. – 1983. – V. 3. – P. 3–6.

394. Kodama, M. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor beta is associated with lymphatic metastasis in human gastric carcinoma / M. Kodama, Y. Kitadai, T. Sumida // Cancer Science. – 2010. – V. 101, N. 9. – P. 1984–1989.

395. Kodama, N. Stimulation of the natural immune system in normal mice by polysaccharide from Maitake mushroom / N. Kodama, T. Kakuno, H. Nanba // Mycoscience. – 2003. – V. 44, N. 3. – P. 257–261.

396. Kodama, N. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the activation of NK cells in cancer patients / N. Kodama, H. Komuta, H. Nanba // Journal of Medicinal Food. – 2003. – V. 6, N. 4. – P. 371–377.

397. Kodama, N. Effects of D-fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa* on tumor growth involve activation of NK cells / N. Kodama [et al.] // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2002. – V. 25, N. 12. – P. 1647–1650.

398. Komath, S.S. Generating anchors only to lose them: The unusual story of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis and remodeling in yeast and fungi / S.S. Komath [et al.] // IUBMB Life. – 2018. – V. 70, N. 5. – P. 355–383.

399. Konska, G. Lectins of higher fungi (Micromycetes) – Their occurrence, physiological role, and biological activity / G. Konska // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2006. – V. 8, N. 1. – P. 19–30.

400. Kopylova, E. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in

metatranscriptomic data / E. Kopylova, L. Noé, H. Touzet // *Bioinformatics*. – 2012. – V. 28, N. 24. – P. 3211–3217.

401. Korbekandi, H. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae* / H. Korbekandi [et al.] // *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. – 2016. – V. 44. – P. 235–239.

402. Koul, B. Microbe-mediated biosynthesis of nanoparticles: applications and future prospects / B. Koul [et al.] // *Biomolecules*. – 2021. – V. 11. – P. 886.

403. Kovalchuk, A. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters / A. Kovalchuk, A.J.M. Driessen // *BMC Genomics*. – 2010. – V. 11, N. 1. – P. 177–198.

404. Kozlova, L. Assay of arabinofuranosidase activity in maize roots / L. Kozlova, P. Mikshina, T. Gorshkova // *Bio-protocol*. – 2016. – V. 6, N. 6. – e1764.

405. Krasnopskaya, L. Screening system for medicinal basidiomycetes antitumor extracts / L. Krasnopskaya [et al.] // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2005. – V. 7. – P. 423–425.

406. Krasnopskaya, L. Antitumor properties of submerged cultivated biomass and extracts of medicinal mushrooms of genus *Hypsizygus singer* (*Agaricomycetidae*) / L. Krasnopskaya [et al.] // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2008. – V. 10. – P. 25–35.

407. Krasnopskaya, L.M. Comparative study of the antitumor activity of polysaccharides from the mycelium of *Ganoderma lucidum* in experiments *in vivo* / L.M. Krasnopskaya [et al.] // *Antibiotics and Chemotherapy*. – 2015. – V. 60, N. 11–12. – P. 29–34.

408. Krichevsky, G.E. Ecological «Green» biosynthesis of metal nanoparticles, reality and potential of their use in various fields of medicine / G.E. Krichevsky // *NBIC Science and Technology*. – 2018. – V. 2. – P. 85–106.

409. Krichevsky, G.E. New green, nature-like technologies for the biosynthesis of noble and heavy metal nanoparticles / G.E. Krichevsky [et al.] // *Nanoindustry*. – 2023. – V. 16, N. 1. P. 42–47.

410. Krishnamoorthi, R. Mycofabrication of gold nanoparticles: optimization, characterization, stabilization and evaluation of its antimicrobial potential on selected human pathogens / R. Krishnamoorthi [et al.] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2021. – V. 35. – P. 102–107.

411. Krishnamoorthi, R. Edible mushroom extract engineered AgNPs as safe antimicrobial and antioxidant agents with no significant cytotoxicity on human dermal fibroblast cells / R. Krishnamoorthi, P.U. Mahalingam, B. Malaikozhundan // *Inorganic Chemistry Communications*. – 2022. – V. 139. – P. 109362.

412. Krishnaswamy, K. Value-adding to grape waste: green synthesis of gold nanoparticles / K. Krishnaswamy, H. Valib, V. Orsata // *Journal of Food Engineering*. – 2014. – V. 142. – P. 210–220.

413. Kües, U. Influence of activated A and B mating-type pathways on developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus* / U. Kües [et al.] // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2002. – V. 268. – P. 262–271.

414. Kües, U. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus*

cinereus / U. Kües // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2000. – V. 64, N. 2. – P. 316–353.

415. Kuga, Y. Ultrastructure of rapidly frozen and freeze-substituted germ tubes of an arbuscular mycorrhizal fungus and localization of polyphosphate / Y. Kuga [*et al.*] // New Phytologist. – 2008. – V. 178. – P. 189–200.

416. Kulkarni, N. Biosynthesis of metal nanoparticles: A review / N. Kulkarni, U. Muddapur // Journal of Nanotechnology. 2014. – V. 2014. – P. 1–8.

417. Kumar, A. Role of nano-selenium in health and environment / A. Kumar, K.S. Prasad // Journal of Biotechnology. – 2021. – V. 325. – P. 152–163.

418. Kumar, K.J.S. Antrodin C inhibits epithelial to mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via suppression of Smad2/3 and β -catenin signaling pathways / K.J.S. Kumar [*et al.*] // PLoS One. – 2015. – V. 10, N. 2. – e0117111.

419. Kumari, S. Actinomycetes mediated synthesis, characterization, and applications of metallic nanoparticles / S. Kumari [*et al.*] // Inorganic and Nano-Metal Chemistry. – 2020. – V. 51. – P. 1386–1395.

420. Kupryashina, M.A. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Azospirillum brasilense* / M.A. Kupryashina, E.P. Vetchinkina, [*et al.*] // Microbiology (Moscow). – 2013. – V. 82, N. 6. – P. 862–869.

421. Lachter, J. Yellow Brain culinary medicinal mushroom, *Tremella mesenterica* Ritz.: Fr. (Higher Basidiomycetes), is subjectively but not objectively effective for eradication of *Helicobacter pylori*; a prospective controlled trial / J. Lachter [*et al.*] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2012. – V. 14, N. 1. – P. 55–63.

422. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227, N. 5259. – P. 680–685.

423. Lai, C.I. Antcin K, an active triterpenoid from the fruiting bodies of basswood cultivated *Antrodia cinnamomea*, induces mitochondria and endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in human hepatoma cells / C.I. Lai [*et al.*] // Journal of Traditional and Complementary Medicine. – 2016. – V. 6, N. 1. – P. 48–56.

424. Laine, R.A. The information-storing potential of the sugar code, glycosciences: status and perspectives / R.A. Laine / Eds. by H.J. Gabius, S. Gabius. – London: Weinheim Chapman and Hall, 1997. – P. 1–14.

425. Lan, X. Cell cycle regulation of folate-mediated one-carbon metabolism / X. Lan, M.S. Field, P.J. Stover // Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine. – 2018. – V. 10, N. 6. – e1426.

426. Latchman, D.S. Transcription factors: An overview / D.S. Latchman // International Journal of Biochemistry and Cell Biology. – 1997. – V. 29. – P. 1305–1312.

427. Lateef, A. Green synthesis and antibacterial activities of silver nanoparticles using extracellular laccase of *Lentinus edodes* / A. Lateef, A.O. Adeeyo // Notulae Scientia Biologicae. – 2015. – V. 7, N. 4. – P. 405–411.

428. Lavia, I. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells / I. Lavia [et al.] // Cancer Letters. – 2006. – V. 244. – P. 61–70.
429. Leatham, G.F. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies / G.F. Leatham, M.A. Stahmann // Journal of General Microbiology. – 1981. – V. 125, N. 1. – P. 147–157.
430. Lee, D.H. Innate immunity induced by fungal β -glucans via dectin-1 signaling pathway / D.H. Lee, H.W. Kim // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2014. – V. 16, N. 1. – P. 1–16.
431. Lee, H.J. The nucleoside antagonist cordycepin causes DNA double strand breaks in breast cancer cells / H.J. Lee [et al.] // Investigational New Drugs. – 2012. – V. 30, N. 5. – P. 1917–1925.
432. Lee, K.J. Synthesis of silver nanoparticles using cow milk and their antifungal activity against phytopathogens / K.J. Lee [et al.] // Materials Letters. – 2013. – V. 105. – P. 128–131.
433. Lee, K.X. Recent developments in the facile biosynthesis of gold nanoparticles (Au-nps) and their biomedical applications / K.X. Lee [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2020. – V. 15. – P. 275–300.
434. Lenardon, M.D. Chitin synthesis and fungal pathogenesis / M.D. Lenardon, C.A. Munro, N.A. Gow // Current Opinion in Microbiology. – 2010. – V. 13 – P. 416–423.
435. Leonardi, R. Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A / R. Leonardi, S. Jackowski // EcoSal Plus. – 2007. – V. 2, N. 22. – P. 1–18.
436. Leonowicz, A. Fungal laccase: properties and activity on lignin / A. Leonowicz [et al.] // Journal of Basic Microbiology. – 2001. – V. 41. – P. 185–227.
437. Li B. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome / B. Li, C.N. Dewey // BMC Bioinformatics. – 2011. – V. 12. – P. 323.
438. Li, B. Evaluation of *de novo* transcriptome assemblies from RNA-Seq data / B. Li [et al.] // Genome Biology. – 2014. – V. 15, N. 12. – P. 553.
439. Li, H. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform / H. Li, R. Durbin // Bioinformatics. – 2009. – V. 25, N. 14. – P. 1754–1760.
440. Li, H. Effects of an *Armillaria mellea* polysaccharide on learning and memory of *D*-galactose-induced aging mice / H. Li, G. Xu, G. Yuan // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – V. 13. – 919920.
441. Li, H. Targeted metabolome and transcriptome analyses reveal changes in gibberellin and related cell wall acting enzymeencoding genes during stipe elongation in *Flammulina filiformis* / H. Li [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2023. – V. 14. – P. 1–14.
442. Li, J. Adhesion receptors as therapeutic targets for circulating tumor cells / J. Li, M.R. King // Frontiers in Oncology. – 2012. – V. 2. – P. 5–6.
443. Li, Q. Immunomodulatory activity of *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein

via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in RAW264.7 cells / Q. Li [et al.] // Journal of Cellular Physiology. – 2019. – V. 234, N. 1. – P. 1–12.

444. Li, Q. Nanoparticle and nanomineral production by fungi / Q. Li [et al.] // Fungal Biology Reviews. – 2022. – V. 41. – P. 31–44.

445. Li, R. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment / R. Li [et al.] // Bioinformatics. – 2009. – V. 25, N. 15. – P. 1966–1967.

446. Li, S.N. Algae-mediated biosystems for metallic nanoparticle production: from synthetic mechanisms to aquatic environmental applications / S.N. Li, R. Wang, S.H. Ho // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – V. 420. – P. 126625.

447. Li, W.W. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics / W.W. Li [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2011. – V. 414. – P. 282–286.

448. Li, X. Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth *in vitro* and *in vivo* by up-regulating multiple tumor suppressors / X. Li [et al.] // Oncotarget. – 2015. – V. 6, N. 19. – P. 17832–17846.

449. Li, Y. Proliferation inhibition and apoptosis onset in human ovarian carcinoma cell line SKOV3 induced by genistein / Y. Li, C. Mi // Ai Zheng. – 2003. – V. 22, N. 6. – P. 586–591.

450. Li, Y.B. A new ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* mycelia and its stability / Y.B. Li, R.M. Liu, J.J. Zhong // Fitoterapia. – 2013. – V. 84. – P. 115–122.

451. Liakh, S.P. Microbial melanogenesis and its functions / Ed. by S.P. Liakh. – M.: Nauka, 1981. – 274 pp.

452. Lian, S. Characterization of biogenic selenium nanoparticles derived from cell-free extracts of a novel yeast *Magnusiomyces ingens* / S. Lian [et al.] // 3 Biotech. – 2019. – V. 9. – P. 221.

453. Liang, X. Fungal transformation of selenium and tellurium located in a volcanogenic sulfide deposit / X. Liang [et al.] // Environmental Microbiology. – 2020. – V. 22. – P. 2346–2364.

454. Liang, X. Fungal formation of selenium and tellurium nanoparticles / X. Liang [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – V. 103. – P. 7241–7259.

455. Liang, X. Fungal-derived selenium nanoparticles and their potential applications in electroless silver coatings for preventing pin-tract infections / X. Liang [et al.] // Regenerative Biomaterials. – 2022. – V. 9. – P. rbac013.

456. Lin, C.H. Coldwater extracts of *Grifola frondosa* and its purified active fraction inhibit hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* / C.H. Lin [et al.] // Experimental Biology and Medicine. – 2016. – V. 241. – P. 1374–1385.

457. Lin, C.H. A new immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum* inhibits epidermal growth factor mediated migration and invasion in A549 lung cancer cells / C.H. Lin [et al.] // Process Biochemistry. – 2010. – V. 45. – P. 1537–1542.

458. Lin, J. *Ganoderma* immunomodulatory proteins: mushrooming functional FIPs / J. Lin [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – V. 106. – P. 2367–2380.
459. Lin, S.B. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogenactivated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest / S.B. Lin [et al.] // *Life Sciences*. – 2003. – V. 72, N. 21. – P. 2381–2390.
460. Lin, T.Y. Microelements induce changes in characterization of sulfated polysaccharides from *Antrodia cinnamomea* / T.Y. Lin [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – V. 120, N. A. – P. 952–958.
461. Lin, Z. *Ganoderma* and Health. Pharmacology and clinical application / Eds. by Z. Lin, B. Yang // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2019. – P. 13–21.
462. Lin, Z.B. Focus on anti-oxidative and free radical scavenging activity of *Ganoderma lucidum* / Z.B. Lin // *Journal of Applied Pharmacology*. – 2004. – V. 12. – P. 133–137.
463. Lin, Z.B. *Lingzhi. From mystery to science* / Z.B. Lin. – Beijing, China: Peking University Medical Press, 2009. – 162 pp.
464. Lindequist, U. The merit of medicinal mushrooms from a pharmaceutical point of view / U. Lindequist // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2013. – V. 15, N. 6. – P. 517–523.
465. Liu, J. Target proteins of ganoderic acid DM provides clues to various pharmacological mechanisms / J. Liu [et al.] // *Scientific Reports*. – 2012c. – V. 2. – P. 905.
466. Liu, J. Ganoderic acid DM: anti- androgenic osteoclastogenesis inhibitor / J. Liu [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2009. – V. 19, N. 8. – P. 2154–2157.
467. Liu, J. Structural elucidation of a heteroglycan from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill / J. Liu [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2011. – V. 49, N. 4. – P. 716–720.
468. Liu, R.M. Anti-Proliferation and induced mitochondria-mediated apoptosis of ganoderic acid Mk from *Ganoderma lucidum* mycelia in cervical cancer HeLa cells / R.M. Liu, Y.B. Li, J.J. Zhong // *Latin American Journal of Pharmacy*. – 2012b. – V. 31, N. 1. – P. 43–50.
469. Liu, R.M. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of novel ganoderic acid derivatives on human cervical cancer cells *in vitro* / R.M. Liu, Y.B. Li, J.J. Zhong // *European Journal of Pharmacology*. – 2012a. – V. 681, N. 1–3. – P. 23–33.
470. Liu, R.M. Ganoderic acid Mf and S induce mitochondria mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells / R.M. Liu, J.J. Zhong // *Phytomedicine*. – 2010. – V. 18, N. 5. – P. 349–355.
471. Liu, W.W. The osmosensing signal transduction pathway from *Botrytis cinerea* regulates cell wall integrity and MAP kinase pathways control melanin biosynthesis with influence of light / W.W. Liu [et al.] // *Fungal Genetics and Biology*. – 2011. – V. 48, N. 4. – P. 377–387.
472. Liu, X.B. Transcriptome data reveal conserved patterns of fruiting body development and response to heat stress in the mushroom-forming fungus *Flammulina filiformis* / X.B. Liu [et al.] // *PLoS*

One. – 2020. – V. 15, N. 10. – P. e0239890.

473. Liu, Y. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase β / Y. Liu [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – V. 282, N. 18. – P. 13532–13541.

474. Liu, Y. Therapeutic effects of lentinan on inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer / Y. Liu [et al.] // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2018. – P. 1–11.

475. Lo, H.C. Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: History, current status, future perspectives, and unsolved problems (Review) / H.C. Lo, S.P. Wasser // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2011. – V. 13, N. 5. – P. 401–426.

476. Lobanok, A.G. Composition and biological activity of deep mycelium of xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes* / A.G. Lobanok [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2003. – V. 39. – P. 60–64.

477. Lobe, C.G. Transcription factors and mammalian development / C.G. Lobe // Current Topics in Developmental Biology. – 1992. – V. 27. – P. 351–383.

478. Loftus, M.G. A 21st century miniguide to sporophore morphogenesis and development in Agaricomycetes and their biotechnological potential / M.G. Loftus [et al.] // Mexican Journal of Biotechnology. – 2020. – V. 5. – P. 1–50.

479. Lok, S. *De novo* genome and transcriptome assembly of the *Canadian beaver* (*Castor canadensis*) / S. Lok [et al.] // G3: Genes, Genomes, Genetics (Bethesda, Md.). – 2017. – V. 7, N. 2. – P. 755–773.

480. Loken, M.R. Simultaneous quantitation of hoechst 33342 and immunofluorescence on viable cells using a fluorescence activated cell sorter / M.R. Loken // Cytometry. – 1980. – V. 1. – P. 136–142.

481. Los, D.A. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals / D.A. Los, N. Murata // Biochimica and Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 2004. – V. 1666, N. 1–2. – P. 142–157.

482. Loshchinina, E.A. Diversity of biogenic nanoparticles obtained by the fungi-mediated synthesis: A review / E.A. Loshchinina, E.P. Vetchinkina, M.A. Kupryashina // Biomimetics. – 2023a. – V. 8, N. 1. – P. 1–30.

483. Loshchinina, E.A. Diversity of mycogenic oxide and chalcogenide nanoparticles: A review / E.A. Loshchinina, E.P. Vetchinkina, M.A. Kupryashina // Biomimetics. – 2023b. – V. 8, N. 224. – P. 1–25.

484. Loshchinina, E.A. Nanoparticles synthesis by *Agaricus* soil basidiomycetes / E.A. Loshchinina, E.P. Vetchinkina [et al.] // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2018. – V. 126. – P. 44–52.

485. Love, M.I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / M.I. Love, W. Huber, S. Anders // *Genome Biology*. – 2014. – V. 15, N. 12. – P. 550.
486. Lowry, O. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. Lowry [*et al.*] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – V. 193, N. 1. – P. 265–275.
487. Lu, M.K. Molecular mechanism of *Antrodia cinnamomea* sulfated polysaccharide on the suppression of lung cancer cell growth and migration via induction of transforming growth factor beta receptor degradation / M.K. Lu [*et al.*] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – V. 95. – P. 1144–1152.
488. Lu, S.P. Assimilation of endogenous nicotinamide riboside is essential for calorie restriction-mediated life span extension in *Saccharomyces cerevisiae* / S.P. Lu, M. Kato, S.J. Lin // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284, N. 25. – P. 17110–17119.
489. Luo, W. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis / W. Luo [*et al.*] // *BMC Bioinformatics*. – 2009. – V. 10. – P. 161.
490. Lutsik, M.D. Lektiny (Lectins) / Eds. by M.D. Lutsik, E.N. Panasyuk, A.D. Lutsik. – Lvov: Vishcha shkola, 1981. – 156 pp.
491. Ma, L. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* / L. Ma [*et al.*] // *Food Chemistry*. – 2013. – V. 139. – P. 503–508.
492. Macfarlane, D.E. // *Vero* cells (*cercopithecus aethiops* kidney) – growth characteristics and viral susceptibility for use in diagnostic virology / D.E. Macfarlane, R.G. Sommerville // *Archiv fur die Gesamte Virusforschung*. – 1969. – V. 27. – P. 379–385.
493. Macheroux, P. Flavogenomics – a genomic and structural view of flavin-dependent proteins / P. Macheroux, B. Kappes, S.E. Ealick // *FEBS Journal*. – 2011. – V. 278. – P. 2625–2634.
494. Macmanes, M.D. On the optimal trimming of high-throughput mRNA sequence data / M.D. Macmanes // *Frontiers in Genetics*. – 2014. – V. 5. – P. 13.
495. Madden, O. Mycofabrication of common plasmonic colloids, theoretical considerations, mechanism and potential applications / O. Madden [*et al.*] // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2015. – V. 225. – P. 37–52.
496. Mahajna, J. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: The case of *Ganoderma lucidum* / J. Mahajna [*et al.*] // *Nutrition and Cancer*. – 2010. – V. 61, N. 1. – P. 16–26.
497. Majeed, A. Cost-effective biosynthesis of silver nanoparticles using different organs of plants and their antimicrobial applications: A review / A. Majeed [*et al.*] // *Materials and Technology*. – 2018. – V. 33. – P. 313–320.
498. Majumdar, R. Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: The pathway is regulated at the post-transcriptional level / R. Majumdar [*et al.*] // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – V. 7, N. 78. – P. 1–17.

499. Malik, P. Green chemistry based benign routes for nanoparticle synthesis / P. Malik [et al.] // Journal of Nanoparticles. – 2014. – V. 2014. – P. 1–14.
500. Mamaeva, S.E. Atlas of chromosomes of human and animal cell lines / Ed. by S.E. Mamaeva. – Moscow: Scientific World, 2002. – 154 pp.
501. Manimaran, M. Actinomycetes-mediated biogenic synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: Progress and challenges / M. Manimaran, K. Kannabiran // Letters in Applied Microbiology. – 2017. – V. 64. – P. 401–408.
502. Manjunath Hulikere, M. Characterization, antioxidant and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using marine endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* / M. Manjunath Hulikere, C.G. Joshi // Process Biochemistry. – 2019. – V. 82. – P. 199–204.
503. Manzoor-ul haq, V.R. Isolation and screening of mushrooms for potent silver nanoparticles production from *Bandipora district* (Jammu and Kashmir) and their characterization / V.R. Manzoor-ul haq [et al.] // International Journal of Current Microbiology and Applied Science. – 2014. – V. 3, N. 9. – P. 704–714.
504. Mao, G.H. Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Grifola frondosa* / G.H. Mao [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2015. – V. 10, N. 134. – P. 406–412.
505. Marcovici, I. Melanin and melanin-functionalized nanoparticles as promising tools in cancer research: A review / I. Marcovici [et al.] // Cancers. – 2022. – V. 14, N. 7. – P. 1–30.
506. Marian, I.M. The transcription factor Roc1 is a key regulator of cellulose degradation in the wood-decaying mushroom *Schizophyllum commune* / I.M. Marian [et al.] // mBio. – 2022. – V. 13, N. 3. – P. e0062822.
507. Martinez, D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78 / D. Martinez [et al.] // Nature Biotechnology. – 2004. – V. 22. – P. 695–700.
508. Martínez-Flores, H.E. Effect of extraction processes on bioactive compounds from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus djamor*: Their applications in the synthesis of silver nanoparticles / H.E. Martínez-Flores, R. Contreras-Chávez, M.G. Garnica-Romo // Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. – 2021. – V. 31. – P. 1406–1418.
509. Maruyama, H. Immunomodulation and antitumor activity of a mushroom product, proflamin, isolated from *Flammulina velutipes* (W. Curt.: Fr.) Singer (*Agaricomycetideae*) / H. Maruyama, T. Ikekawa // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2007. – V. 9. – P. 109–122.
510. Maseko, T. Chemical characterisation and speciation of organic selenium in cultivated selenium-enriched *Agaricus bisporus* / T. Maseko [et al.] // Food Chemistry. – 2013. – V. 141, N. 4. – P. 3681–3687.
511. Masuda, Y. Maitake β -glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice / Y. Masuda [et al.] // International Immunopharmacology. –

2009a. – V. 9, N. 5. – P. 620–626.

512. Masuda, Y. Characterization and antitumor effect of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa* / Y. Masuda [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2009b. – V. 57, N. 21. – P. 10143–10149.

513. Masuda, Y. Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis: Involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells / Y. Masuda, Y. Murata, M. Hayashi // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2008. – V. 31, N. 6. – P. 1104–1108.

514. Masuda, Y. Antitumor activity of orally administered maitake α -glucan by stimulating antitumor immune response in murine tumor / Y. Masuda [et al.] // PLoS One. – 2017. – V. 12. – P. 1–15.

515. Matsuura, H. Alphaglucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa* / H. Matsuura [et al.] // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2002. – V. 66, N. 7. – P. 1576–1578.

516. Matsuzawa, T. Studies on antioxidant effects of culinary-medicinal bunashimeji mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel. (*Agaricomycetidae*) / T. Matsuzawa // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2006. – V. 8, N. 3. – P. 245–250.

517. McMorris, T.C. Structure-activity of antitumor agent irofulven (hydroxymethylacylfulvene) and analogues / T.C. McMorris [et al.] // Journal of Organic Chemistry. – 2001. – V. 66, N. 18. – P. 6158–6163.

518. Meng, X. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities / X. Meng, H. Liang, L. Luo // Carbohydrate Research. – 2016. – V. 424. – P. 30–41.

519. Menon, S. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications / S. Menon, S. Rajeshkumar, V. Kumar // Resource-Efficient Technologies. – 2017. – V. 3, N. 4. – P. 516–527.

520. Michalenko, G.O. Chemistry and architecture of the mycelial wall of *Agaricus bisporus* / G.O. Michalenko, H.L. Hohl, D. Rast // Journal of General Microbiology. – 1976. – V. 92. – P. 252–262.

521. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G.L. Miller // Analytical Chemistry. – 1959. – V. 31. – P. 426–428.

522. Minaev, V.S. Structural and phase transformations in condensed selenium / V.S. Minaev, S.P. Timoshenkov, V.V. Kalugin // Journal of Optoelectronics and Advanced Materials. – 2005. – V. 7, N. 4. – P. 1717–1741.

523. Mirrett, S. Acridine orange stain / S. Mirrett // Infection Control. – 1982. – V. 3. – P. 250–253.

524. Mirunalini, S. Intracellular biosynthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using edible mushrooms / S. Mirunalini [et al.] // Notulae Scientia Biologicae. – 2012. – V. 4. – P. 55–61.

525. Mishra, V. A Review on green synthesis of nanoparticles and evaluation of

antimicrobial activity / V. Mishra [et al.] // International Journal of Green and Herbal Chemistry. – 2014. – V. 3, N. 1. – P. 081–094.

526. Miyazaki, K. Molecular cloning of developmentally specific genes by representational difference analysis during the fruiting body formation in the basidiomycete *Lentinula edodes* / K. Miyazaki, M. Nakamura, K. Babasaki // Fungal Genetics and Biology. – 2005. – V. 42, N. 6. – P. 493–505.

527. Miyazaki, K. Mapping of genes abundantly expressed during fruiting body formation of *Lentinula edodes* / K. Miyazaki, M. Sakai, Y. Miyazaki // Breeding Science. – 2010. – V. 60. – P. 81–86.

528. Miyazaki, K. Target genes of the developmental regulator PRIB of the mushroom *Lentinula edodes* / K. Miyazaki [et al.] // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2004. – V. 68, N. 9. – P. 1898–1905.

529. Mizuno, T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food functions and medicinal effects of mushroom fungi / T. Mizuno // Food Reviews International. – 1995. – V. 11, N. 1. – P. 5–21.

530. Mizuno, T. The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review) / T. Mizuno // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 1999. – V. 1, N. 1. – P. 9–29.

531. Mizuno, T. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (*Aphylllophoromycetideae*) / T. Mizuno [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 1999. – V. 1. – P. 301–316.

532. Mizushima, Y. A novel DNA topoisomerase inhibitor: dehydroeburonic acid, one of the lanostanetype triterpene acids from *Poria cocos* / Y. Mizushima [et al.] // Cancer Science. – 2004. – V. 95, N. 4. – P. 354–360.

533. Mizushima, Y. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase / Y. Mizushima [et al.] // Biochemical Journal. – 2000. – V. 350, N. 3. – P. 757–763.

534. Mleczek, M. Elemental characteristics of mushroom species cultivated in China and Poland / M. Mleczek [et al.] // Journal of Food Composition and Analysis. – 2018. – V. 66. – P. 168–178.

535. Mleczek, M. Multi-elemental analysis of *Lentinula edodes* mushrooms available in trade / M. Mleczek [et al.] // Journal of Environmental Science and Health, Part B. – 2017. – V. 52, N. 3. – P. 196–205.

536. Mohanta, T.K. The diversity of fungal genome / T.K. Mohanta, H. Bae // Biological Procedures Online. – 2015. – V. 17. – P. 8.

537. Mohanta, Y. Silver nanoparticles synthesized using wild mushroom show potential antimicrobial activities against food borne pathogens / Y. Mohanta [et al.] // Molecules. – 2018. – V. 23. – P. 655.

538. Moharib, S.A. Anticancer activities of mushroom polysaccharides on chemically induced colorectal cancer in rats / S.A. Moharib [et al.] // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2014. – V. 4. – P. 54–63.

539. Mollania, N. An environmentally benign method for the biosynthesis of stable selenium nanoparticles / N. Mollania, R. Tayebee, F. Narenji-Sani // *Research on Chemical Intermediates*. – 2016. – V. 42. – P. 4253–4271.
540. Molnár, Z. Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi / Z. Molnár [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – P. 39–43.
541. Moore, A.E. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells / A.E. Moore, L. Sabachewsky, H.W. Toolan // *Cancer Research*. – 1955. – V. 15. – P. 598–602.
542. Moore, D. *Coprinus cinereus*: an ideal organism for studies of genetics and developmental biology / D. Moore, P.J. Pukkila // *Journal of Biological Education*. – 1985. – V. 19, N. 1. – P. 31–40.
543. Moore, D. Developmental genetics of *Coprinus cinereus*: Genetic evidence that carpophores and sclerotia share a common pathway of initiation / D. Moore // *Current Genetics*. – 1981. – V. 3. – P. 145–150.
544. Moore, D. Fungal morphogenesis / D. Moore. – Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1998. – 469 pp.
545. Moore, R.T. Fine structure of mycota: Observations on septa of Ascomycetes and Basidiomycetes / R.T. Moore, J.H. McAlear // *American Journal of Botany*. – 1962. – V. 49. – P. 86–94.
546. Morad, M.Y. Myco-synthesized molluscicidal and larvicidal selenium nanoparticles: A new strategy to control *Biomphalaria alexandrina* snails and larvae of *Schistosoma mansoni* with an *in silico* study on induced oxidative stress / M.Y. Morad [et al.] // *Journal of Fungi*. – 2022. – V. 8. – P. 262.
547. Moradali, M.F. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). A Review / M.F. Moradali [et al.] // *International Immunopharmacology*. – 2007. – V. 7, N. 6. – P. 701–724.
548. Morin, E. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche / E. Morin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2012. – V. 109. – P. 17501–17506.
549. Moustafa, M.T. Removal of pathogenic bacteria from wastewater using silver nanoparticles synthesized by two fungal species / M.T. Moustafa // *Water Sciences*. – 2017. – V. 31. – P. 164–176.
550. Mughal, B. Biogenic nanoparticles: synthesis, characterisation and applications / B. Mughal [et al.] // *Applied Sciences*. – 2021. – V. 11, N. 6. – P. 2598.
551. Mukherjee, P. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis / P. Mukherjee [et al.] // *Nano Letters*. – 2001. – V. 1. – P. 515–519.
552. Mukherji, S. Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles / S. Mukherji [et al.] // *Physical Sciences Reviews*. – 2018. – V. 4, N. 20170082. – P. 1–73.

553. Muller, C.I. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells / C.I. Muller [et al.] // *Leukemia Research*. – 2006. – V. 30, N. 7. – P. 841–848.
554. Murillo-Rábago, E.I. Optimized synthesis of small and stable silver nanoparticles using intracellular and extracellular components of fungi: An alternative for bacterial inhibition / E.I. Murillo-Rábago [et al.] // *Antibiotics*. – 2022. – V. 11. – P. 800.
555. Murphy, E.J. β -Glucan extracts from the same edible shiitake mushroom *Lentinus edodes* produce differential *in vitro* immunomodulatory and pulmonary cytoprotective effects: implications for coronavirus disease (COVID-19) immunotherapies / E.J. Murphy [et al.] // *The Science of the Total Environment*. – 2020. – V. 732, N. 139330. – P. 1–10.
556. Musacchia, F. Annocript: a flexible pipeline for the annotation of transcriptomes able to identify putative long noncoding RNAs / F. Musacchia [et al.] // *Bioinformatics*. – 2015. – V. 31, N. 13. – P. 2199–2201.
557. Nadeem, M. A review of the green syntheses and anti-microbial applications of gold nanoparticles / M. Nadeem [et al.] // *Green Chemistry Letters and Reviews*. – 2017. – V. 10, N. 4. – P. 216–227.
558. Naeem, G.A. Green synthesis of gold nanoparticles from *Coprinus comatus* (*Agaricaceae*) and the effect of ultraviolet irradiation on their characteristics / G.A. Naeem [et al.] // *Walailak Journal of Science and Technology*. – 2021. – V. 18. – P. 93–96.
559. Nagar, S. A cost effective method for screening and isolation of xylan degrading bacteria using agro waste material / S. Nagar, A. Mittal, V.K. Gupta // *Asian Journal of Biological Sciences*. – 2012. – V. 5, N. 8. – P. 384–394.
560. Nagy, L.G. Lessons on fruiting body morphogenesis from genomes and transcriptomes of Agaricomycetes / L.G. Nagy [et al.] // *Studies in Mycology*. – 2021. – V. 104, N. 1. – P. 1–85.
561. Naimi-Shamel, N. Green synthesis of gold nanoparticles using *Fusarium oxysporum* and antibacterial activity of its tetracycline conjugant / N. Naimi-Shamel, P. Pourali, S. Dolatabadi // *Journal of Medical Mycology*. – 2019. – V. 29. – P. 7–13.
562. Nair, V. Yeast-derived melanin mediated synthesis of gold nanoparticles / V. Nair [et al.] // *Journal of Bionanoscience*. – 2013. – V. 7. – P. 159–168.
563. Nanba, H. The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of *Grifola frondosa* (Maitake) / H. Nanba, A. Hamaguchi, H. Kuroda // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1987. – V. 35. – P. 1162–1168.
564. Nanda, A. Antimicrobial properties of biogenic silver nanoparticles synthesized from phylloplane fungus, *Aspergillus tamaris* / A. Nanda, B.K. Nayak, M. Krishnamoorthy // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2018. – V. 16. – P. 225–228.
565. Nandi, S. Advancing frontiers in mycology and mycotechnology / Eds. by S. Nandi, R. Sikder, K. Acharya // *Secondary metabolites of mushrooms: a potential source for anticancer*

therapeutics with translational opportunities. – Springer: Singapore, 2019. – P. 539–562.

566. Narasimha, G. Mushrooms (*Agaricus bisporus*) mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and their antimicrobial activity / G. Narasimha [et al.] // International Journal of Nano Dimension. – 2011. – V. 2, N. 1. – P. 29–36.

567. Narayanan, K.B. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents / K.B. Narayanan, N. Sakthivel // Advances in Colloid and Interface Science. – 2011. – V. 169, N. 2. – P. 59–79.

568. Nascimento, J.M. Evaluation of the kinetics of gold biosorption processes and consequent biogenic synthesis of AuNPs mediated by the fungus *Trichoderma harzianum* / J.M. Nascimento [et al.] // Environmental Technology and Innovation. – 2021. – V. 21. – P. 101238.

569. Natesan, K. Biosynthesis of silica and copper nanoparticles from *Trichoderma*, *Streptomyces* and *Pseudomonas spp.* evaluated against collar canker and red root-rot disease of tea plants / K. Natesan [et al.] // Archives of Phytopathology and Plant Protection. – 2021. – V. 54. – P. 56–85.

570. Nawrocki, E.P. Rfam 12.0: updates to the RNA families database / E.P. Nawrocki [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2015. – V. 43. – P. 130–137.

571. Neethu, S. Efficient visible light induced synthesis of silver nanoparticles by *Penicillium polonicum* ARA 10 isolated from *Chetomorpha antennina* and its antibacterial efficacy against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* / S. Neethu [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2018. – V. 180. – P. 175–185.

572. Ngai, P.H.K. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells / P.H.K. Ngai, T.B. Ng // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2004. – V. 314. – P. 988–993.

573. Niks, M. Towards an optimized MTT assay / M. Niks, M. Otto // Journal of Immunological Methods. – 1990. – V. 130, N. 1. – P. 149–151.

574. Nohwal, B. Green synthesis, characterization and evaluation of gold nanoparticles using aqueous extract of *Ganoderma lucidum* / B. Nohwal, R. Chaudhary, A. Sindhu // International Journal of Chemical Studies. – 2020. V. 8, N. 5. – P. 2470–2476.

575. Nonaka, Y. Effects of the antlered form of *Ganoderma lucidum* on tumor growth and metastasis in cyclophosphamide-treated mice / Y. Nonaka [et al.] // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2008. – V. 72, N. 6. – P. 1399–1408.

576. Ohga, S. Transcriptional regulation of laccase and cellulase in relation to fruit body formation in the mycelium of *Lentinula edodes* on a sawdust-based substrate / S. Ohga [et al.] // Mycoscience. – 2000. – V. 41. – P. 149–153.

577. Ohm, R.A. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune* / R.A. Ohm [et al.] // Nature Biotechnology. – 2010. – V. 28. – P. 957–963.

578. Ohno, N. Structural diversity and physiological functions of β -glucans / N. Ohno // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2005. – V. 7, N. 2. – P. 167–174.
579. Orban, A. Transcriptome of different fruiting stages in the cultivated mushroom *Cyclocybe aegerita* suggests a complex regulation of fruiting and reveals enzymes putatively involved in fungal oxylipin biosynthesis / A. Orban [et al.] // BMC Genomics. – 2021. – V. 22, N. 324. – P. 1–23.
580. Ohsawa, T. Studies on constituents of fruit body of *Polyporus umbellatus* and their cytotoxic activity / T. Ohsawa [et al.] // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1992. – V. 40, N. 1. – P. 143–147.
581. Orth, A.B. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi / A.B. Orth, D.J. Royse, M. Tien // Applied and Environmental Microbiology. – 1993. – V. 59, N. 12. – P. 4017–4023.
582. Osorio-Echavarría, J. Synthesis of silver nanoparticles using white-rot fungus anamorphous *Bjerkandera* sp. R1: Influence of silver nitrate concentration and fungus growth time / J. Osorio-Echavarría [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – V. 11, N. 1. – P. 3842.
583. Ottoni, C.A. Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis / C.A. Ottoni [et al.] // AMB Express. – 2017. – V. 7. – P. 31.
584. Ovais, M. Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: A mechanistic approach / M. Ovais [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – V. 19. – P. 4100.
585. Owaid, M.N. Biosynthesis of silver nanoparticles from truffles mushrooms and their applications as nanodrugs / M.N. Owaid // Current Applied Science and Technology. – 2021. – V. 22. – P. 1–11.
586. Owaid, M.N. Biosynthesis of gold nanoparticles using yellow oyster mushroom *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* / M.N. Owaid, S.S. Al-Saeed, I.A. Abed // Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management. – 2017. – V. 8. – P. 157–162.
587. Owaid, M.N. Mycosynthesis of nanoparticles using edible and medicinal mushrooms / M.N. Owaid, I.J. Ibraheem // European Journal of Nanomedicine. – 2017. – V. 9. – P. 5–23.
588. Owaid, M.N. Synthesis characterization and antitumor efficacy of silver nanoparticle from *Agaricus bisporus* pileus, *Basidiomycota* / M.N. Owaid [et al.] // Walailak Journal of Science and Technology. – 2020. – V. 17. – P. 75–87.
589. Owaid, M.N. Mycogenic fabrication of silver nanoparticles using *Picoa*, *Pezizales*, characterization and their antifungal activity / M.N. Owaid [et al.] // Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management. – 2022. – V. 17. – P. 100612.
590. Owaid, M.N. Mushroom-assisted synthesis of triangle gold nanoparticles using the aqueous extract of fresh *Lentinula edodes* (shiitake), *Omphalotaceae* / M.N. Owaid [et al.] // Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management. – 2019. – V. 12. – P. 100270.
591. Palomo, J. Biosynthesis of metal nanoparticles: novel efficient heterogeneous

nanocatalysts / J. Palomo, M. Filice // *Nanomaterials*. – 2016. – V. 6, N. 5. – P. 84.

592. Panáček, A. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity / A. Panáček [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2006. – V. 110, N. 33. – P. 16248–16253.

593. Papinutti, L. Effect of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex / L. Papinutti // *Bioresource Technology*. – 2010. – V. 101, N. 6. – P. 1941–1946.

594. Pareek, M. Variations in structure of aerial and submerged rhizomorphs of *Armillaria luteobubalina* indicate that they may be organs of absorption / M. Pareek, L. Cole, A.E. Ashford // *Mycological Research*. – 2001. – V. 105, N. 11. – P. 1377–1387.

595. Pareek, V. Biomimetic approach for multifarious synthesis of nanoparticles using metal tolerant fungi: A mechanistic perspective / V. Pareek, A. Bhargava, J. Panwar // *Materials Science and Engineering: B*. – 2020. – V. 262. – P. 114771.

596. Parra, M. Vitamin B6 and its role in cell metabolism and physiology / M. Parra, S. Stahl, H. Hellmann // *Cells*. – 2018. – V. 7, N. 7. – P. 84.

597. Paszczynski, A. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification / A. Paszczynski, R. Crawford, V.B. Huynh // *Methods in Enzymology*. – 1988. – V. 161. – P. 264–270.

598. Patel, D. Culinary traditions and global consumption of edible mushroom / D. Patel, M. Hait, S.C. Izah / In: S.C. Izah, M.C. Ogwu, M. Akram (eds.) *Bioactive compounds in edible mushrooms* // *Reference Series in Phytochemistry*. – Springer, Cham, 2025. – P. 1–57.

599. Paterson, R.R.M. *Ganoderma* – a therapeutic fungal biofactory: A review / R.R.M. Paterson // *Phytochemistry*. – 2006. – V. 67. – P. 1985–2001.

600. Pearson, G. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions / G. Pearson [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2001. – V. 22, N. 2. – P. 153–183.

601. Peksel, A. ¹³C-NMR Analysis of glucose metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger* / A. Peksel [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – V. 58. – P. 157–163.

602. Pel, J.H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 / J.H. Pel [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2007. – V. 25, N. 2. – P. 221–231.

603. Pelkmans, J.F. Fruiting Body Formation in Basidiomycetes / J.F. Pelkmans, L.G. Lugones, H.A.B. Wösten / Eds. by J. Wendland. In: *Growth, Differentiation and Sexuality* // *The Mycota*. – Springer, Cham, 2016b. – V. 1. – P. 387–405.

604. Pelkmans, J.F. The transcriptional regulator c2h2 accelerates mushroom formation in *Agaricus bisporus* / J.F. Pelkmans [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016a. – V. 100. – P. 7151–7159.

605. Pelkmans, J.F. Transcription factors of *Schizophyllum commune* involved in mushroom formation and modulation of vegetative growth / J.F. Pelkmans [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – V. 7, N. 310. – P. 1–11.
606. Peng, C.C. Antrodan, a beta-glucan obtained from *Antrodia cinnamomea* mycelia, is beneficial to benign prostate hyperplasia / C.C. Peng [et al.] // Food and Function. – 2015. – V. 6, N. 2. – P. 635–645.
607. Peng, D. Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity / D. Peng [et al.] // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2007. – V. 101, N. 10. – P. 1457–1463.
608. Peng, L. Single-cell transcriptomic landscape of immunometabolism reveals intervention candidates of ascorbate and aldarate metabolism, fatty-acid degradation and PUFA metabolism of T-cell subsets in healthy controls, psoriasis and psoriatic arthritis / L. Peng [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2023. – V. 14. – P. 1179877.
609. Peng, X. Lanostane-type triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum* / X. Peng [et al.] // Phytochemistry. – 2019. – V. 157. – P. 103–110.
610. Peng, X. Lanostane triterpenoids from *Ganoderma hainanense* / X. Peng [et al.] // Phytochemistry. – 2015. – V. 114. – P. 137–145.
611. Perera, N. *Antrodia cinnamomea* galactomannan elicits immunostimulatory activity through toll-like receptor 4 / N. Perera [et al.] // International Journal of Biological Sciences. – 2018. – V. 14, N. 10. – P. 1378–1388.
612. Perna, V. Laccase-catalyzed oxidation of lignin induces production of H₂O₂ / V. Perna [et al.] // ACS Sustainable Chemistry and Engineering. – 2019. – V. 8. – P. 831–841.
613. Petrova, R.D. *Marasmius oreades* substances block NF-kappaB activity through interference with IKK activation pathway / R.D. Petrova [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2009. – V. 36, N. 4. – P. 737–744.
614. Philip, D. Biosynthesis of Au, Ag and Au–Ag nanoparticles using edible mushroom extract / D. Philip // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2009. – V. 73, N. 2. – P. 374–381.
615. Pinho, P.G. Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms / P.G. Pinho [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – V. 56, N. 5. – P. 1704–1712.
616. Plaza, D.F. Comparative transcriptomics of the model mushroom *Coprinopsis cinerea* reveals tissue-specific armories and a conserved circuitry for sexual development / D.F. Plaza [et al.] // BMC Genomics. – 2014. – V. 15, N. – 1. P. 492.
617. Pöder, R. The Ice man's fungi: Facts and mysteries / R. Pöder // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2005. – V. 7, N. 3. – P. 357–359.

618. Pohleven, J. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic t-cells / J. Pohleven [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – V. 1790, N. 3. – P. 173–181.
619. Pollack, A. Drug firms see fortune in treating cancer / A. Pollack // *International Herald Tribune*. – 2009. – P. 15–16.
620. Pomerantz, S.H. Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus* / S.H. Pomerantz, V.V. Murthy // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1974. – V. 160, N. 1. – P. 73–82.
621. Poojary, M.M. Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms / M.M. Poojary [et al.] // *Food Chemistry*. – 2017. – V. 234. – P. 236–244.
622. Popescu, M. Biogenic production of nanoparticles / M. Popescu, A. Velea, A. Lőrinczi // *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. – 2010. – V. 5, N. 4. – P. 1035–1040.
623. Poucheret, P. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis / P. Poucheret, F. Fons, S. Rapior // *Mycologie*. – 2006. – V. 27, N. 4. – P. 311–333.
624. Prasad, R. Fungal nanobionics: Principles and applications / Eds. by R. Prasad, V. Kumar, M. Kumar, S. Wang. – Springer: Singapore, 2018. – 316 pp.
625. Priyadarshini, E. Biogenic synthesis of floral-shaped gold nanoparticles using a novel strain, *Talaromyces flavus* / E. Priyadarshini [et al.] // *Annals of Microbiology*. – 2014. – V. 64. – P. 1055–1063.
626. Przybylowicz, P. Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation / Eds. by P. Przybylowicz, J. Donoghue. – Dubuque: Kendall / Hunt Publ., – 1991. – 217 pp.
627. Puck, T.T. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects / T.T. Puck, S.J. Cieciura, A. Robinson // *Journal of Experimental Medicine*. – 1958. – V. 108. – P. 945–956.
628. Purschwitz, J. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans* / J. Purschwitz [et al.] // *Current Biology*. – 2008. – V. 18. – P. 255–259.
629. Qian, Y. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi / Y. Qian [et al.] // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2013. – V. 36. – P. 1613–1619.
630. Qu, M. Biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) employing *Trichoderma* strains to control empty-gut disease of oak silkworm (*Antheraea pernyi*) / M. Qu [et al.] // *Materials Today Communications*. – 2021. – V. 28. – P. 102619.
631. Quast, C. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools / C. Quast [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – V. 41. – P. 590–596.
632. Quester, K. Controllable biosynthesis of small silver nanoparticles using fungal extract / K. Quester, M. Avalos-Borja, E. Castro-Longoria // *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. – 2016. – V. 7. – P. 118–125.

633. Rabeea, M.A. Mycosynthesis of gold nanoparticles using the extract of *Flammulina velutipes*, *Physalacriaceae*, and their efficacy for decolorization of methylene blue / M.A. Rabeea [et al.] // Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2020. – V. 8. – P. 103841.
634. Rafique, M. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications / M. Rafique [et al.] // Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology. – 2017. – V. 45. – P. 1272–1291.
635. Raheman, F. Silver nanoparticles: Novel antimicrobial agent synthesized from an endophytic fungus *Pestalotia sp.* isolated from leaves of *Syzygium cumini* (L) / F. Raheman [et al.] // Nano Biomedicine and Engineering. – 2011. – V. 3. – P. 174–178.
636. Rai, M. Synthesis of silver nanoparticles by *Phoma gardeniae* and *in vitro* evaluation of their efficacy against human disease-causing bacteria and fungi / M. Rai [et al.] // IET Nanobiotechnology. – 2015. – V. 9. – P. 71–75.
637. Rai, M. Nanobiotechnology in neurodegenerative diseases / Eds. by M. Rai, A.Yadav. – Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019. – 398 pp.
638. Raja, M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma harzianum* Th3 and its efficacy against root rot complex pathogen in groundnut / M. Raja [et al.] // Materials Today: Proceedings. – 2021. – V. 43. – P. 3140–3143.
639. Ramezani, F. Mechanistic aspects of biosynthesis of nanoparticles by several microbes / F. Ramezani, M. Ramezani, S. Talebi // Nanocon. – 2010. – V. 10, N. 12–14. – P. 1–7.
640. Randeni, N. New insights into signaling pathways of cancer prevention effects of polysaccharides from edible and medicinal mushrooms: A review / N. Randeni, B. Xu // Phytomedicine. – 2024. – V. 132. – P. 155875.
641. Rao, A. Vitamin D receptor and p21/WAF1 are targets of genistein and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate cancer cell / A. Rao [et al.] // Cancer Research. – 2004. – V. 64, N. 6. – P. 2143–2147.
642. Rasouli, M. Biosynthesis of selenium nanoparticles using yeast *Nematospora coryli* and examination of their anti-candida and anti-oxidant activities / M. Rasouli // IET Nanobiotechnology. – 2019. – V. 13. – P. 214–218.
643. Ratan, Z.A. Green chemistry synthesis of silver nanoparticles and their potential anticancer effects / Z.A. Ratan [et al.] // Cancers. – 2020. – V. 12. – P. 855.
644. Raudaskoski, M. The relationship between B-mating-type genes and nuclear migration in *Schizophyllum commune* / M. Raudaskoski // Fungal Genetics and Biology. – 1998. – V. 24. – P. 207–227.
645. Raudaskoski, M., Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling / M. Raudaskoski, E. Kothe // Eukaryot Cell. – 2010. – V. 9, N. 6. – P. 847–859.
646. Ravishankar, S. Development of sporeless/low sporing strains of *Pleurotus* through mutation / S. Ravishankar [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2006. – V. 22. – P. 1021–1025.

647. Razak, N.H.A. Brief review on bioresources green synthesis of silver nanoparticles / N.H.A. Razak, N.A. Zawawi, T.S. Chundawat // Journal of Advanced Research in Materials Science. – 2021. – V. 76. – P. 1–10.
648. Rehman, S. A wild *Fomes fomentarius* for biomediation of one pot synthesis of titanium oxide and silver nanoparticles for antibacterial and anticancer application / S. Rehman [et al.] // Biomolecules. – 2020. – V. 10. – P. 622.
649. Rehman, S. Using *Fomitopsis pinicola* for bioinspired synthesis of titanium dioxide and silver nanoparticles, targeting biomedical applications / S. Rehman [et al.] // RSC Advances. – 2020. – V. 10. – P. 32137–32147.
650. Reis, F.S. Methanolic extract of *Ganoderma lucidum* induces autophagy of AGS human gastric tumor cells / F.S. Reis [et al.] // Molecules. – 2015. – V. 20, N. 10. – P. 17872–17882.
651. Ren, G. Anti-proliferative effect of clitocine from the mushroom *Leucopaxillus giganteus* on human cervical cancer HeLa cells by inducing apoptosis / G. Ren [et al.] // Cancer Letters. – 2008. – V. 262. – P. 190–200.
652. Ren, L. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: A review / L. Ren, C. Perera, Y. Hemar // Food and Function. – 2012. – V. 3, N. 11. – P. 1118–1130.
653. Ren, M. Polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and *Lentinus edodes* enhance 5-fluorouracil-mediated H22 cell growth inhibition / M. Ren [et al.] // Journal of Traditional Chinese Medicine. – 2014. – V. 34, N. 3. – P. 309–316.
654. Reshetnikov, S.V. Higher *Basidiomycota* as source of antitumor and immunostimulating polysaccharides / S.V. Reshetnikov, S.P. Wasser, K.K. Tan // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2001. – V. 3. – P. 361–394.
655. Reuter, G. Eukaryotic glycosylation—whim of nature or multipurpose tool? / G. Reuter, H.J. Gabius // Cellular and Molecular Life Sciences. – 1999. – V. 55. – P. 368–422.
656. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // Journal of Cell Biology. – 1963. – V. 17, N. 1. – P. 208–212.
657. Roberts, A. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments / A. Roberts, L. Pachter // Nature Methods. – 2013. – V. 10, N. 1. – P. 71–73.
658. Roberson, R.W. Hyphal structure / R.W. Roberson / In: Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi / Eds. by K.A. Borkovich, D. Ebbole // American Society of Microbiology, Washington, DC, 2010. – P. 8–24.
659. Robinson, M.D. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data / M.D. Robinson, D.J. McCarthy, G.K. Smyth // Bioinformatics. – 2010. – V. 26, N. 1. – P. 139–140.
660. Rodrigues, A.G. Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi / A.G. Rodrigues [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 97. – P. 775–782.

661. Roeder, P.E. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: oscillations in fatty acids / P.E. Roeder, M.L. Sargent, S. Broady // *Biochemistry*. – 1982. – V. 21, N. 20. – P. 4909–4916.
662. Roncero, C. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi / C. Roncero // *Current Genetics*. – 2002. – V. 41. – P. 367–378.
663. Rosemary-Kinge, T. Secondary metabolites of oil palm isolates of *Ganoderma zonatum* Murill. From Cameroon and their cytotoxicity against five human tumour cell lines / T. Rosemary-Kinge, A.M. Mih // *African Journal of Biotechnology*. – 2011. – V. 10, N. 42. – P. 8440–8447.
664. Roth, J. Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of *N*-glycan handling, EDEM1 and OS-9 / J. Roth, C. Zuber // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2017. – V. 147, N. 2. – P. 269–284.
665. Rouhana-Toubi, A. Ethyl acetate extracts of submerged cultured mycelium of higher Basidiomycetes mushrooms inhibit human ovarian cancer cell growth / A. Rouhana-Toubi, S.P. Wasser, F. Fares // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2009. – V. 11, N. 1. – P. 29–37.
666. Roustan, V. An evolutionary perspective of AMPK-TOR signaling in the three domains of life / V. Roustan [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – V. 67, N. 13. – P. 1–11.
667. Royse, D.J. Current overview of mushroom production in the world / D.J. Royse, J. Baars, Q. Tan / In: *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications* / Eds. by D.C. Zied, A. Pardo-Giménez. – Hoboken: John Wiley and Sons Ltd., 2017. – P. 5–13.
668. Ruan, J. Colorectal cancer inhibitory properties of polysaccharides and their molecular mechanisms: A review / J. Ruan [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – V. 238. – P. 124165.
669. Ruimi, N. Inhibition of TNF α -induced iNOS expression in HSV-tk transduced 9L glioblastoma cell lines by *Marasmius oreades* substances through NF- κ B- and MAPK-dependent mechanisms / N. Ruimi [et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2010. – V. 37, N. 8. – P. 3801–3812.
670. Ruimi, N. *Daedalea gibbosa* substances inhibit LPS-induced expression of iNOS by suppression of NF- κ B and MAPK activities in RAW 264.7 macrophage cells / N. Ruimi [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2010. – V. 25, N. 3. – P. 421–432.
671. Sabuda, M.C. Fungal bioremediation of selenium-contaminated industrial and municipal wastewaters / M.C. Sabuda [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 2105.
672. Sakai, H. A stearyl-CoA-specific $\Delta 9$ fatty acid desaturase from the basidiomycete *Lentinula edodes* / H. Sakai, S. Kajiwarra // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2003. – V. 67, N. 11. – P. 2431–2437.
673. Sakamoto, Y. Characterization of the *Lentinula edodes* *exg2* gene encoding a lentinan-degrading exo- β -1,3-glucanase / Y. Sakamoto [et al.] // *Current Genetics*. – 2005. – V. 48. – P. 195–203.
674. Sakamoto, Y. Characterization of the post-harvest changes in gene transcription in the gill of the *Lentinula edodes* fruiting body / Y. Sakamoto, K. Nakade, T. Sato // *Current Genetics*. –

2009. – V. 55, N. 4. – P. 409–423.

675. Sakamoto, Y. Grouping of multicopper oxidases in *Lentinula edodes* by sequence similarities and expression patterns / Y. Sakamoto [et al.] // AMB Express. – 2015. – V. 5, N. 63. – P. 1–14.

676. Sakamoto, Y. Influences of environmental factors on fruiting body induction, development and maturation in mushroom-forming fungi / Y. Sakamoto // Fungal Biology Reviews. – 2018. – V. 32. – P. 236–248.

677. Sakamoto, Y. *Lentinula edodes* genome survey and postharvest transcriptome analysis / Y. Sakamoto [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2017. – V. 83, N. 10. – P. 1–14.

678. Sakamoto, Y. Senescence of the *Lentinula edodes* fruiting body after harvesting / Y. Sakamoto [et al.] // Food Quality / Ed. by K. Kapisris. – IntechOpen, 2012. – P. 83–110.

679. Sakthi, S.S. Evaluation of amylase activity of the amylolytic fungi *Aspergillus niger* using cassava as substrate / S.S. Sakthi [et al.] // International Journal of Applied Microbiology Science. – 2012. – V. 1. – P. 24–34.

680. Salem, S.S. Antibacterial, cytotoxicity and larvicidal activity of green synthesized selenium nanoparticles using *Penicillium corylophilum* / S.S. Salem [et al.] // Journal of Cluster Science. – 2021. – V. 32. – P. 351–361.

681. Salunkhe, R.B. Larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized using fungus *Cochliobolus lunatus* against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae) / R.B. Salunkhe [et al.] // Parasitology Research. – 2011. – V. 109. – P. 823–831.

682. Salvadori, M.R. Bioremediation from wastewater and extracellular synthesis of copper nanoparticles by the fungus *Trichoderma koningiopsis* / M.R. Salvadori [et al.] // Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2014. – V. 49. – P. 1286–1295.

683. Sammons, D.W. Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels / D.W. Sammons, L.D. Adams, E.E. Nishizawa // Electrophoresis. – 1981. – V. 2. – P. 135–140.

684. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi / C. Sánchez // Biotechnology Advances. – 2009. – V. 27, N. 2. – P. 185–194.

685. Sánchez-Vallet, A. The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions / A. Sánchez-Vallet, J.R. Mesters, B.P.H.J. Thomma // FEMS Microbiology Reviews. – 2014. – V. 39. – P. 171–183.

686. Sanghi, R. Enzymatic formation of gold nanoparticles using *Phanerochaete chrysosporium* / R. Sanghi, P. Verma, S. Puri // Advances in Chemical Engineering and Science. – 2011. – V. 1, N. 3. – P. 154–162.

687. Saravanakumar, K. *Trichoderma* based synthesis of anti-pathogenic silver nanoparticles and their characterization, antioxidant and cytotoxicity properties / K. Saravanakumar, M.H. Wang // Microbial Pathogenesis. – 2018. – V. 114. – P. 269–273.

688. Saravanan, A. A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications / A. Saravanan [et al.] // Chemosphere. – 2021. – V. 264. – P. 128580.
689. Saravanan, M. Synthesis of silver nanoparticles from *Phenerochaete chrysosporium* (MTCC-787) and their antibacterial activity against human pathogenic bacteria / M. Saravanan [et al.] // Microbial Pathogenesis. – 2018. – V. 117. – P. 68–72.
690. Sarkar, J. Mycosynthesis of selenium nanoparticles / J. Sarkar [et al.] // Micro and Nano Letters. – 2011. – V. 6, N. 8. – P. 599–602.
691. Sarkar, J. Production of selenium nanorods by phytopathogen *Alternaria alternata* / J. Sarkar [et al.] // Advanced Science Letters. – 2012. – V. 10. – P. 111–114.
692. Saxena, J. Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles by *Sclerotinia sclerotiorum* MTCC 8785 and evaluation of its antibacterial properties / J. Saxena [et al.] // Springer Plus. – 2016. – V. 5. – P. 861.
693. Scarcello, E. Mind your assays: misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese / E. Scarcello [et al.] // PLoS One. – 2020. – V. 15. – e0231634.
694. Scherer, W.F. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix / W.F. Scherer, J.T. Syverton, G.O. Gey // Journal of Experimental Medicine. – 1953. – V. 97. – P. 695–710.
695. Schröfel, A. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles: A review / A. Schröfel [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2014. – V. 10. – P. 4023–4042.
696. Schuhmacher, L. The LOV-domain blue-light receptor LreA of the fungus *Alternaria alternata* binds predominantly FAD as chromophore and acts as a light and temperature sensor / L. Schuhmacher [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2024. – V. 300, N. 5. – P. 107238.
697. Seetharaman, P.K. Functional attributes of myco-synthesized silver nanoparticles from endophytic fungi: A new implication in biomedical applications / P.K. Seetharaman [et al.] // Biology. – 2021. – V. 10. – P. 473.
698. Severoglu, Z. Trace metal levels in edible wild fungi / Z. Severoglu [et al.] // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2013. – V. 10. – P. 295–304.
699. Shah, M. Gold nanoparticles: Various methods of synthesis and antibacterial applications / M. Shah [et al.] // Frontiers in Bioscience. – 2014 – V. 19, N. 8. – P. 1320–1344.
700. Shakibaie, M. Rapid microwave-assisted biosynthesis of platinum nanoparticles and evaluation of their antioxidant properties and cytotoxic effects against MCF-7 and A549 cell lines / M. Shakibaie [et al.] // 3 Biotech. – 2021. – V. 11. – P. 511.
701. Shakya, M. Fungal-based nanotechnology for heavy metal removal / M. Shakya [et al.] // In Nanotechnology, food security and water treatment / Eds. by K.M. Gothandam [et al.] //

Environmental Chemistry for a Sustainable World. – Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018. – P. 229–253.

702. Shang, J. Evaluation and comparison of multiple aligners for next-generation sequencing data analysis / J. Shang [et al.] // BioMed Research International. – 2014. – V. 2014. – P. 309650.

703. Shang, L. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters / L. Shang, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus // Journal of Nanobiotechnology. – 2014. – V. 12, N. 5. – P. 1–11.

704. Sharma, D. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review / D. Sharma, S. Kanchi, K. Bisetty // Arabian Journal of Chemistry. – 2015. – V. 11. – P. 1–65.

705. Sharma, I. Potential of medicinal mushrooms in human health and welfare: An overview / I. Sharma [et al.] // In: Mushrooms with therapeutic potentials / Eds. by D.C. Agrawal, M. Dhanasekaran. – Springer, Singapore, 2023. – P. 253–284.

706. Sharma, V.K. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities / V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin // Advances in Colloid and Interface Science. – 2009. – V. 145, N. 1–2. – P. 83–96.

707. Sharon, A. Fungal apoptosis: function, genes and gene function / A. Sharon [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. – 2009. – V. 33, N. 5. – P. 833–854.

708. Sherwani, M.A. Gold nanoparticle-photosensitizer conjugate based photodynamic inactivation of biofilm producing cells: potential for treatment of *Candida albicans* infection in BALB/c mice / M.A. Sherwani [et al.] // PLoS One. – 2015. – V. 10, N. 7. – P. e0131684.

709. Shevchik, V.E. Pectate lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family / V.E. Shevchik, J. Robert-Baudouy, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat // Journal of Bacteriology. – 1997. – V. 179, N. 23. – P. 7321–7330.

710. Shim, D. Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes* / D. Shim [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2016. – V. 223. – P. 24–25.

711. Shimizu, K. Efficacy of oral administered superfine dispersed lentinan for advanced pancreatic cancer / K. Shimizu, S. Watanabe, K. Matsuda // Hepatogastroenterology. – 2009. – V. 56, N. 89. – P. 240–244.

712. Shivashankar, M. Biosynthesis, partial characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles from *Pleurotus* species / M. Shivashankar, B. Premkumari, N. Chandan // International Journal of Integrative Sciences, Innovation and Technology. – 2013. – V. 2, N. 3. – P. 13–23.

713. Shoeibi, S. Biogenesis of selenium nanoparticles using green chemistry / S. Shoeibi, P. Mozdziak, A. Golkar-Narenji // Topics in Current Chemistry. – 2017. – V. 375. – P. 88.

714. Shukla, G. Evaluation of larvicidal effect of mycogenic silver nanoparticles against white grubs (*Holotrichia* sp.) / G. Shukla [et al.] // Journal of Advanced Scientific Research. – 2020. – V. 11. – P. 296–304.

715. Shukurov, I. Biological synthesis of bioactive gold nanoparticles from *Inonotus obliquus* for dual chemo-photothermal effects against human brain cancer cells / I. Shukurov [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – P. 2292.
716. SI, A. Sustainable preparation of gold nanoparticles via green chemistry approach for biogenic applications / A. SI [et al.] // Materials Today Chemistry. – 2020. – V. 17. – P. 100327.
717. Siddiqi, K.S. Fabrication of metal nanoparticles from fungi and metal salts: scope and application / K.S. Siddiqi, A. Husen // Nanoscale Research Letters. – 2016. – V. 11. – P. 98.
718. Siddiqi, K.S. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties / K.S. Siddiqi, A. Husen, R.A.K. Rao // Journal of Nanobiotechnology. – 2018 – V. 16, N. 1. – P. 1–28.
719. Silva, M.L. Construction and validation of a *Sambucus nigra* biosensor for cancer-associated STn antigen / M.L. Silva [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2014. – V. 57. – P. 254–261.
720. Silverman, S.J. Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae* / S.J. Silverman [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1988. – V. 85. – P. 4735–4739.
721. Simão, F.A. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs / F.A. Simão [et al.] // Bioinformatics. – 2015. – V. 31, N. 19. – P. 3210–3212.
722. Simões, M.F. Mycogenic metal nanoparticles for the treatment of mycobacterioses / M.F. Simões, C.A. Ottoni, A. Antunes // Antibiotics. – 2020. – V. 9. – P. 569.
723. Singh, C.R. A review on marine based nanoparticles and their potential applications / C.R. Singh, K. Kathiresan, S. Anandhan // African Journal of Biotechnology. – 2015. – V. 14. – P. 1525–1532.
724. Singh, P. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms / P. Singh [et al.] // Trends in Biotechnology. – 2016. – V. 34, N. 7. – P. 588–599.
725. Singh, R. Improved annotation with *de novo* transcriptome assembly in four social amoeba species / R. Singh [et al.] // BMC Genomics. – 2017. – V. 18, N. 1. – P. 120.
726. Singh, R.P. Nanoparticles in sustainable agriculture: An emerging opportunity / R.P. Singh, R. Handa, G. Manchanda // Journal of Controlled Release. – 2021. – V. 329. – P. 1234–1248.
727. Singh, R.S. Mushroom lectins: Current status and future perspectives / R.S. Singh, R. Bhari, H.P. Kaur // Critical Reviews in Biotechnology. – 2010. – V. 30. – P. 99–126.
728. Sipos, G. Genome expansion and lineage-specific genetic innovations in the forest pathogenic fungi *Armillaria* / G. Sipos [et al.] // Nature Ecology and Evolution. – 2017. – V. 1, N. 12. – P. 1931–1941.
729. Siwulski, M. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. – Health-promoting properties: A review / M. Siwulski [et al.] // Herba Polonica. – 2015. – V. 61 – P. 105–118.

730. Slomczynski, D. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34 / D. Slomczynski, J.P. Nakas, S.W. Tanenbaum // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – V. 61, N. 3. – P. 907–912.
731. Smina, T.P. *Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent radiation-induced DNA damage and apoptosis in splenic lymphocytes *in vitro* / T.P. Smina [et al.] // Mutation Research. – 2011. – V. 726. – P. 188–194.
732. Smith-Unna, R. TransRate: reference free quality assessment of *de novo* transcriptome assemblies / R. Smith-Unna [et al.] // Genome Research. – 2016. – V. 26, N. 8. – P. 1134–1144.
733. Snarr, B.D. Immune recognition of fungal polysaccharides / B.D. Snarr, S.T. Qureshi, D.C. Sheppard // Journal of Fungi. – 2017. – V. 3, N. 3. – P. 47.
734. Soltani Nejad, M. Evaluation of *Phoma* sp. biomass as an endophytic fungus for synthesis of extracellular gold nanoparticles with antibacterial and antifungal properties / M. Soltani Nejad [et al.] // Molecules. – 2022. – V. 27. – P. 1181.
735. Sonawane, H. Fungi derived agriculturally important nanoparticles and their application in crop stress management – Prospects and environmental risks / H. Sonawane [et al.] // Environmental Research. – 2022. – V. 212. – P. 113543.
736. Song, H.Y. Comparative transcriptome analysis of dikaryotic mycelia and mature fruiting bodies in the edible mushroom *Lentinula edodes* / H.Y. Song, D.H. Kim, J.M. Kim // Scientific Reports. – 2018. – V. 8, N. 1. – P. 8983.
737. Soni, N. Microbial synthesis of spherical nanosilver and nanogold for mosquito control / N. Soni, S. Prakash // Annals of Microbiology. – 2014. – V. 64. – P. 1099–1111.
738. Soni, N. Possible mosquito control by silver nanoparticles synthesized by soil fungus (*Aspergillus niger* 2587) / N. Soni, S. Prakash // Advances in Nanoparticles. – 2013. – V. 2. – P. 125–132.
739. Sorbiun, M. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant extracts and evaluation of their antibacterial properties / M. Sorbiun [et al.] // Nanochemistry Research. – 2018. – V. 3. – P. 1–16.
740. Sprenger, M. Fungal biotin homeostasis is essential for immune evasion after macrophage phagocytosis and virulence / M. Sprenger [et al.] // Cellular Microbiology. – 2020. – V. 22. – e13197.
741. Srivastava, N. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera* / N. Srivastava, M. Mukhopadhyay // Powder Technology. – 2013. – V. 244. – P. 26–29.
742. Starr, T.L. Sorting signals that mediate traffic of chitin synthase III between the TGN/endosomes and to the plasma membrane in yeast / T.L. Starr [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7. – P. e46386.
743. Stewart, B.W. // World Cancer Report 2014 / Eds. by B.W. Stewart, C.P. Wild. – Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. – 2014.

744. Struck, A.W. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications / A.W. Struck [et al.] // *Chembiochem.* – 2012. – V. 13, N. 18. – P. 2642–2655.
745. Suarez-Arroyo, I.J. *Ganoderma* spp.: a promising adjuvant treatment for breast cancer: A review / I.J. Suarez-Arroyo [et al.] // *Molecules.* – 2017. – V. 4, N. 1. – P. 1–23.
746. Sudhakar, T. Synthesis of silver nanoparticles from edible mushroom and its antimicrobial activity against human pathogens / T. Sudhakar [et al.] // *International Journal of PharmTech Research.* – 2014. – V. 6, N. 5. – P. 1718–1723.
747. Sudheer, S. Biosustainable production of nanoparticles via mycogenesis for biotechnological applications: A critical review / S. Sudheer [et al.] // *Environmental Research.* – 2022. – V. 204. – P. 111963.
748. Suizu, T. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from *Lentinula edodes* / T. Suizu [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2008. – V. 79, N. 3. – P. 461–470.
749. Sum, W.C. Recent progress in the evaluation of secondary metabolites from *Basidiomycota* / W.C. Sum [et al.] // *Current Research in Biotechnology.* – 2023 – V. 6. – P. 100155.
750. Sun, H. A Lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from the edible mushroom *Agrocybe aegerita* / H. Sun [et al.] // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* – 2003. – V. 36. – P. 214–222.
751. Sun, J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum* / J. Sun, H. He, B.J. Xie // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2004. – V. 52. – P. 6646–6652.
752. Sun, Y. Chemical structure and anti-inflammatory activity of a branched polysaccharide isolated from *Phellinus baumii* / Y. Sun [et al.] // *Carbohydrate Polymers.* – 2021. – V. 268. – P. 118214.
753. Sundaravadivelan, C. Effect of mycosynthesized silver nanoparticles from filtrate of *Trichoderma harzianum* against larvae and pupa of dengue vector *Aedes aegypti* / C. Sundaravadivelan, M.N. Padmanabhan // *Environmental Science and Pollution Research.* – 2014. – V. 21. – P. 4624–4633.
754. Syed, A. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Humicola sp.* and evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines / A. Syed [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2013. – V. 114. – P. 144–147.
755. Szeto, C.Y.Y. Isolation and transcript analysis of two-component histidine kinase gene *Le.nik1* in Shiitake mushroom, *Lentinula edodes* / C.Y.Y. Szeto [et al.] // *Mycological Research.* – 2008. – V. 112. – P. 108–116.
756. Takaku, T. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action / T. Takaku, Y. Kimura, H. Okuda // *Journal of Nutrition.* – 2001. – V. 131, N. 5. – P. 1409–1413.

757. Takano, Y. The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis / Y. Takano [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2000. – V. 13, N. 4. – P. 374–383.
758. Talie, M.D. Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using *Helvella leucopus* Pers. and their antimycotic activity against fungi causing fungal rot of apple / M.D. Talie [et al.] // Asian Journal of Pharmaceutical and clinical research. – 2020. – V. 13. – P. 161–165.
759. Tanaka, S. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions / S. Tanaka [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – V. 264. – P. 16372–16377.
760. Tandler, B. Improved uranyl acetate staining for electron microscopy / B. Tandler // Journal of Electron Microscopy Technique. – 1990. – V. 16. – P. 1505–1517.
761. Tang, L. Transcriptome analysis of candidate genes and signaling pathways associated with light-induced brown film formation in *Lentinula edodes* / L. Tang [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 97, N. 11. – P. 4977–4989.
762. Tang, S. Whole-genome assembly and analysis of a medicinal fungus: *Inonotus hispidus* / S. Tang [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2022. – V. 13. – P. 967135.
763. Tang, W. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells / W. Tang [et al.] // Life Sciences. – 2006. – V. 80. – P. 205–211.
764. Tang, Y.J. Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor / Y.J. Tang, J.J. Zhong // Biotechnology Letters. – 2002. – V. 24. – P. 1023–1026.
765. Tarafder, E. Advancements in genetic studies of mushrooms: a comprehensive review / E. Tarafder [et al.] // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2024. – V. 40, N. 275. – P. 1–40.
766. Tassone, E.E. *De novo* construction of an expanded transcriptome assembly for the western tarnished plant bug *Lygus hesperus* / E.E. Tassone [et al.] // Gigascience. – 2016. – V. 5. – P. 6.
767. Teparić, R. Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls / R. Teparić, V. Mrša // Current Genetics. – 2013. – V. 59. – P. 171–185.
768. Thurston, C.F. The structure and function fungal laccase / C.F. Thurston // Journal of Microbiology. – 1994. – V. 140. – P. 19–26.
769. Tiwari, P. β -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: An efficient cellulase machinery in biotechnological applications / P. Tiwari, B.N. Misra, N.S. Sangwan // BioMed Research International. – 2013. – V. 2013. – P. 203735.
770. Todd, R.B. Regulation of fungal nitrogen metabolism / R.B. Todd / In Ed. by D. Hoffmeister // Biochemistry and molecular biology. – Springer, Cham, Switzerland, 2016. – P. 281–303.
771. Trapnell, C. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq

experiments with TopHat and Cufflinks / C. Trapnell [et al.] // Nature Protocols. – 2012. – V. 7, N. 3. – P. 562–578.

772. Treitschke, S. The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis* / S. Treitschke [et al.] // Plant Cell. – 2010. – V. 22. – P. 2476–2494.

773. Tsao, Y.W. Characterization of a novel maitake (*Grifola frondosa*) protein that activates natural killer and dendritic cells and enhances antitumor immunity in mice / Y.W. Tsao [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – V. 61. – P. 9828–9838.

774. Tsujibo, H. A novel β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: gene cloning, expression, and assignment to family 3 of the glycosyl hydrolases / H. Tsujibo [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – V. 64, N. 8. – P. 2920–2924.

775. Tugarova, A.V. Reduction of Selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles / A.V. Tugarova, E.P. Vetchinkina [et al.] // Environmental Microbiology and Microbial Ecology. – 2014. – V. 68, N. 3. – P. 495–503.

776. Tyagi, S. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using entomopathogenic fungus: Characterization and antibacterial potential / S. Tyagi [et al.] // SN Applied Sciences. – 2019. – V. 1. – P. 1545.

777. Ulbricht, C. Maitake mushroom (*Grifola frondosa*): systematic review by the natural standard research collaboration / C. Ulbricht [et al.] // Journal of the Society for Integrative Oncology. – 2009. – V. 7, N. 2. – P. 66–72.

778. Ulker, B. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function / B. Ulker, I.E. Somssich // Current Opinion in Plant Biology. – 2004. – V. 7, N. 5. – P. 491–498.

779. Vahidi, H. Mycosynthesis and characterization of selenium nanoparticles using standard *Penicillium chrysogenum* PTCC 5031 and their antibacterial activity: A novel approach in microbial nanotechnology / H. Vahidi [et al.] // Nanomedicine Journal. – 2020. – V. 7. – P. 315–323.

780. Vaillancourt, L.J. Multiple genes encoding pheromones and a pheromone receptor define the B β 1 mating-type specificity in *Schizophyllum commune* / L.J. Vaillancourt [et al.] // Genetics. – 1997. – V. 146. – P. 541–551.

781. Vais, R.D. Green electrodeposition of gold nanostructures by diverse size, shape, and electrochemical activity / R.D. Vais, N. Sattarahmady, H. Heli // Gold Bulletin. – 2016. – V. – 49, N. 3. – P. 95–102.

782. Valdivia, R.H. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane / R.H. Valdivia, R. Schekman // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2003. – V. 100. – P. 10287–10292.

783. Vamanu, E. *In vitro* human microbiota response to exposure to silver nanoparticles biosynthesized with mushroom extract / E. Vamanu [et al.] // Nutrients. – 2018. – V. 10. – P. 607.

784. Van der Hem, L.G. Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent / L.G. Van der Hem [et al.] // Transplantation. – 1995. – V. 60. – P. 438–443.
785. Van Gelder, C. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases / C. Van Gelder, W. Flurkey, H. Wichers // Phytochemistry. – 1997. – V. 45. – P. 1309–1323.
786. Van Griensven, L.J. Culinary-medicinal mushrooms: Must action be taken / L.J. Van Griensven // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2009. – V. 11. – P. 281–286.
787. Vanden Bossche, H. Is there a role for sterols and steroids in fungal growth and transition from yeast to hyphal-form and vice versa? An overview / H. Vanden Bossche, P. Marichal / In: Dimorphic Fungi in Biology and Medicine / Eds. by H. Vanden Bossche, F.C. Odds, D. Kerridge // Springer, Boston, MA, 1993. – P. 177–190.
788. Van Wetter, M.A. SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune* / M.A. Van Wetter, H.A. Wösten, J.G. Wessels // Molecular Microbiology. – 2002. – V. 36, N. 1. – P. 201–210.
789. Varshney, R. A novel microbial route to synthesize silver nanoparticles using fungus *Hormoconis resinae* / R. Varshney [et al.] // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. – 2009. – V. 4. – P. 349–355.
790. Vetchinkina, E.P. Comparative characteristics of mycelial mats of xylotrophic Basidiomycetes / E.P. Vetchinkina // Mycological Progress. – 2025. – V. 24. – P. 47.
791. Vetchinkina, E. Proteins and polysaccharides of medicinal basidiomycete *Lentinus edodes* vegetative mycelium and fruiting bodies display cytotoxicity towards human and animal cancer cell lines / E. Vetchinkina [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – V. 195. – P. 398–411.
792. Vetchinkina, E. Shape and size diversity of gold, silver, selenium, and silica nanoparticles prepared by green synthesis using fungi and bacteria / E. Vetchinkina [et al.] // Industrial and Engineering Chemistry Research. – 2019. – V. 58. – P. 17207–17218.
793. Vetchinkina, E. Green synthesis of nanoparticles with extracellular and intracellular extracts of basidiomycetes / E. Vetchinkina [et al.] // PeerJ. – 2018. – V. 6. – e5237.
794. Vetchinkina, E.P. Laccase and lectin activities of intracellular proteins produced in a submerged culture of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes* / E.P. Vetchinkina, N.N. Pozdnyakova, V.E. Valentina // Current Microbiology. – 2008c. – V. 57. – P. 381–385.
795. Vetchinkina, E.P. Activity and expression of the laccase, tyrosinase, glucanase and chitinase genes in the morphogenesis of *Lentinus edodes* / E.P. Vetchinkina [et al.] // Microbiology (Moscow). – 2015. – V. 84, N. 1. – P. 78–89.
796. Vetchinkina, E.P. Description of the brown mycelial mat as an essential morphological structures of the basidiomycete *Lentinus edodes* / E.P. Vetchinkina [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2017b. – V. 19, N. 9. – P. 817–827.

797. Vetchinkina, E.P. Alteration in the ultrastructural morphology of mycelial hyphae and the dynamics of transcriptional activity of lytic enzyme genes during basidiomycete morphogenesis / E.P. Vetchinkina [et al.] // Journal of Microbiology. – 2017a. – V. 55, N. 4. – P. 280–288.
798. Vetchinkina, E.P. Biological synthesis of selenium and germanium nanoparticles by xylotrophic basidiomycetes / E.P. Vetchinkina [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2016a. – V. 52. – P. 87–97.
799. Vetchinkina, E.P. Biosynthesis of nanoparticles of metals and metalloids by basidiomycetes. Preparation of gold nanoparticles by using purified fungal phenol oxidases / E.P. Vetchinkina [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017c. – V. 101. – P. 1047–1062.
800. Vetchinkina, E.P. Effect of cold stress on fruiting body production by medicinal basidiomycetes in submerged and solid-phase culture / E.P. Vetchinkina, V.E. Nikitina // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2017. – V. 13, N. 2. – P. 26–34.
801. Vetchinkina, E.P. Enzymes of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes* F-249 in the course of morphogenesis / E.P. Vetchinkina, N.N. Pozdnyakova, V.E. Nikitina // Microbiology (Moscow). – 2008a. – V. 77, N. 2. – P. 171–177.
802. Vetchinkina, E.P. Anti-tumor activity of extracts from medicinal basidiomycetes / E.P. Vetchinkina [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2016b. – V. 18. – P. 955–964.
803. Vetchinkina, E.P. Intracellular lectins of *Lentinus edodes* at various developmental stages of the fungus / E.P. Vetchinkina, O.I. Sokolov, V.E. Nikitina // Microbiology (Moscow). – 2008b. – V. 77, N. 4. – P. 440–444.
804. Vigneshwaran, N. Silver protein (core shell) nanoparticle production using spent mushroom substrate / N. Vigneshwaran [et al.] // Langmuir. – 2007. – V. 23, N. 13. – P. 7113–7117.
805. Vijayaraghavan, K. Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications / K. Vijayaraghavan, T. Ashokkumar // Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2017. – V. 5. – P. 4866–4883.
806. Virágh, M. Evolutionary morphogenesis of sexual fruiting bodies in basidiomycota: toward a new *evo-devo* synthesis / M. Virágh [et al.] // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2022. – V. 86, N. 1. – P. e0001921.
807. Vodovozova, E.L. Antitumour activity of cytotoxic liposomes equipped with selectin ligand SiaLe(X), in a mouse mammary adenocarcinoma model / E.L. Vodovozova [et al.] // European Journal of Cancer. – 2000. – V. 36. – P. 942–949.
808. Wadhwani, S.A. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects / S.A. Wadhwani [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 100. – P. 2555–2566.
809. Wagemaker, M.J.M. The role of ornithine aminotransferase in fruiting body formation of the mushroom *Agaricus bisporus* / M.J.M. Wagemaker [et al.] // Mycological Research. – 2007. – V. 111, N. 8. – P. 909–918.

810. Wanarska, E. The possible mechanism of the formation of silver nanoparticles by *Penicillium cyclopium* / E. Wanarska, I. Maliszewska // Bioorganic chemistry. – 2019. – V. 93. – P. 102803.
811. Wang, C.J. Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF- κ B and AP-1 / C.J. Wang [et al.] // Carcinogenesis. – 2008a. – V. 29, N. 1. – P. 147–156.
812. Wang, D.H. Antitumor activity of extracts of *Ganoderma lucidum* and their protective effects on damaged HL-7702 cells induced by radiotherapy and chemotherapy / D.H. Wang, X.C. Weng // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 2006. – V. 31, N. 19. – P. 1618–1622.
813. Wang, G. The *DnaJ* gene family in shiitake culinary-medicinal mushroom, *Lentinus edodes*: comprehensive identification, characterization, and expression profiles under different conditions / G. Wang [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2019. – V. 21, N. 9. – P. 909–919.
814. Wang, G.Z. Proteome and transcriptome reveal involvement of heat shock proteins and indoleacetic acid metabolism process in *Lentinula edodes* thermotolerance / G.Z. Wang [et al.] // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2018a. – V. 50, N. 5. – P. 1617–1637.
815. Wang, H. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* / H. Wang, T.B. Ng // Peptides. – 2006. – V. 27. – P. 27–30.
816. Wang, H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice / H. Wang, J. Zhang, H. Yu // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – V. 42, N. 10. – P. 1524–1533.
817. Wang, K.P. Structure and inducing tumor cell apoptosis activity of polysaccharides isolated from *Lentinus edodes* / K.P. Wang [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – V. 61, N. 41. – P. 9849–9858.
818. Wang, Q. Biosynthesis and regulation of terpenoids from basidiomycetes: exploration of new research / Q. Wang [et al.] // AMB Express. – 2021. – V. 11. – P. 150.
819. Wang, S. Isolation, identification and bioactivity of monoterpenoids and sesquiterpenoids from the mycelia of edible mushroom *Pleurotus cornucopiae* / S. Wang [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – V. 61, N. 21. – P. 5122–512910.
820. Wang, T. Effective isolation of antioxidant Phelligradin LA from the fermentation broth of *Inonotus baumii* by macroporous resin / T. Wang [et al.] // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2020. – V. 43. – P. 2095–2106.
821. Wang, T. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor / T. Wang [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – V. 80, N. 1. – P. 94–102.
822. Wang, W. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pleurotus ostreatus* extract with

their electrochemical activity of detection of carbendazim in vegetable / W. Wang [et al.] // International Journal of Electrochemical Science. – 2017. – V. 12. – P. 842–851.

823. Wang, X. Thermally induced conformation transition of triple helical lentinan in NaCl aqueous solution / X. Wang, X. Xu, L. Zhang // Journal of Physical Chemistry B. – 2008b. – V. 112, N. 33. – P. 10343–10351.

824. Wang, X.W. *De novo* characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development / X.W. Wang [et al.] // BMC Genomics. – 2010. – V. 11. – P. 1–11.

825. Wang, Y. Differential effects of sodium selenite and nano-Se on growth performance, tissue se distribution, and glutathione peroxidase activity of avian broiler / Y. Wang // Biological Trace Element Research. – 2009. – V. 128, N. 2. – P. 184–190.

826. Wang, Y. Removal of cadmium from contaminated *Lentinula edodes* by optimized complexation and coagulation / Y. Wang [et al.] // Food Science and Nutrition. – 2016. – V. 5. – P. 215–222.

827. Wang, Y. *De novo* transcriptomic analysis during *Lentinula edodes* fruiting body growth / Y. Wang, X. Zeng, W. Liu // Gene. – 2018b. – V. 641. – P. 326–334.

828. Wasser, S.P. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun *Agaricus* (Champignon do Brazil, or the Himematsutake mushroom) *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. indeed a synonym of *A. subrufescens* Peck? / S.P. Wasser [et al.] // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2005. – V. 7, N. 3. – P. 507–511.

829. Wasser, S.P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges / S.P. Wasser // Biomedical Journal. – 2014. – V. 37, N. 6. –P. 345–356.

830. Wasser, S.P. Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems / S.P. Wasser // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2010. – V. 12, N. 1. – P. 1–16.

831. Wasser, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S.P. Wasser // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – V. 60. – P. 258–274.

832. Wasser, S.P. Antitumor and immunomodulatory activities of medicinal mushroom polysaccharides and polysaccharide-protein complexes in animals and humans / S.P. Wasser, M.Y. Didukh, E. Nevo // Mycology Balcan. – 2005. – V. 2. – P. 221–250.

833. Wasser, S.P. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives: A review / S.P. Wasser, A.L. Weis // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 1999. – V. 1. – P. 31–62.

834. Watanabe, K. Lucidenic acids-rich extract from antlered form of *Ganoderma lucidum* enhances TNF α induction in THP-1 monocytic cells possibly via its modulation of MAP kinases p38 and JNK / K. Watanabe [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2011. – V. 408, N. 1. – P. 1–24.

835. Weber, C. Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment / C. Weber [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – P. 35852.
836. Weber, I. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* / I. Weber [et al.] // Plant Cell. – 2006. – V. 8. – P. 225–242.
837. Weng, C.J. The anti-invasive effect of lucidenic acids isolated from a new *Ganoderma lucidum* strain / C.J. Weng [et al.] // Molecular Nutrition and Food Research. – 2007. – V. 51, N. 12. – P. 1472–1477.
838. Wessels, J., Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum* / J. Wessels [et al.] // Plant Cell. – 1991. – V. 3, N. 8. – P. 793–799.
839. West, A.H. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems / A.H. West, A.M. Stock // Trends in Biochemical Sciences. – 2001. – V. 26, N. 6. – P. 369–376.
840. Whitaker, J.R. In food enzymes: Structure and function / J.R. Whitaker // Ed. by D. Wong. – Chapman and Hall, 1995. – 284 pp.
841. Widiastuti, E.L. Antioxidant role of taurine and oyster mushroom on kidneys of male mice induced by paraquat herbicide / E.L. Widiastuti, E. Nurcahyani, B.P.D. Jaya // AIP Conference Proceedings. – 2018. – V. 2002, N. 1. – P. 020021.
842. Williams, C.R. Trimming of sequence reads alters RNA-Seq gene expression estimates / C.R. Williams [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2016. – V. 17. – P. 103.
843. Win, T.T. Fungus (*Alternaria* sp.) mediated silver nanoparticles synthesis, characterization, and screening of antifungal activity against some phytopathogens / T.T. Win, S. Khan, P. Fu // Journal of Nanotechnologynol. – 2020. – V. 2020. – P. 8828878.
844. Wösten, H.A. Hydrophobins: multipurpose proteins / H.A. Wösten // Annual Review of Microbiology. – 2001. – V. 55. – P. 625–646.
845. Wong, K.S. Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of *Lentinula edodes* laccase expressed from *Pichia pastoris* / K.S. Wong [et al.] // Bioresource Technology. – 2012. – V. 104. – P. 157–164.
846. Wood, D.A. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus* / D.A. Wood // Journal of General Microbiology. – 1980. – V. 117. – P. 327–338.
847. Wu, G. Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells / G. Wu [et al.] // Fitoterapia. – 2012a. – V. 83, N. 2. – P. 408–414.
848. Wu, H. Polysaccharide from *Lentinus edodes* inhibits the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells / H. Wu [et al.] // PLoS One. – 2012b. – V. 7, N. 12. – P. 51–57.

849. Wu, J.Y. Bioactive ingredients and medicinal values of *Grifola frondosa* (Maitake) / J.Y. Wu, K.C. Siu, P. Geng // Foods. – 2021. – V. 10. – P. 95.
850. Wu, P.C. Biotin biosynthesis affected by the NADPH oxidase and lipid metabolism is required for growth, sporulation and infectivity in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata* / P.C. Wu [et al.] // Microbiological Research. – 2020. – V. 241. – P. 126566.
851. Wu, S.J. Camphoratins A-J, potent cytotoxic and anti-inflammatory triterpenoids from fruiting body of *Taiwanofungus camphoratus* / S.J. Wu [et al.] // Journal of Natural Products. – 2010. – V. 73, N. 11. – P. 1756–1762.
852. Wu, T. Transcriptome profile analysis of floral sex determination in cucumber / T. Wu [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2010. – V. 167, N. 11. – P. 905–913.
853. Xiao, R. Fatty acid desaturases (FADs) modulate multiple lipid metabolism pathways to improve plant resistance / R. Xiao [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2022. – V. 49. – P. 9997–10011.
854. Xiao, Z. Fungal polysaccharides / Z. Xiao, W. Zhou, Y. Zhang // Advances in Pharmacology. – 2020. – V. 87. – P. 277–299.
855. Xie, J. High-yield synthesis of complex gold nanostructures in a fungal system / J. Xie [et al.] // Journal of Physical Chemistry C. – 2007. – V. 111, N. 45. – P. 16858–16865.
856. Xie, J.T. *Ganoderma lucidum* extract inhibits proliferation of SW480 human colorectal cancer cells / J.T. Xie [et al.] // Experimental Oncology. – 2006. – V. 28, N. 1. – P. 25–29.
857. Xie, Y. The genome-wide characterization of alternative splicing and RNA editing in the development of *Coprinopsis cinerea* / Y. Xie [et al.] // Journal of Fungi. – 2023. – V. 9, N. 9. – P. 915.
858. Xin, Y. Conformation-dependent manipulation of human islet amyloid polypeptide fibrillation by shiitake-derived Lentinan / Y. Xin [et al.] // ACS Applied Materials and Interfaces. – 2018. – V. 10, N. 37. – P. 31069–31079.
859. Xing, Z. Recent chemical and pharmacological studies on polysaccharide constituent of *Grifola frondosa* / Z. Xing [et al.] // Acta Edulis Fungi. – 1999. – V. 6. – P. 54–58.
860. Xu, W. Extract of *Pleurotus pulmonarius* suppresses liver cancer development and progression through inhibition of VEGF-induced PI3K/AKT signaling pathway / W. Xu, J.J. Huang, P.C. Cheung // PLoS One. – 2012. – V. 7, N. 3. – P. 1–13.
861. Xu, Z. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities / Z. Xu [et al.] // American Journal of Chinese Medicine. – 2011. – V. 39, N. 1. – P. 15–27.
862. Xu, Z. Research progress of heavy metal phytochelatin (PC) / Z. Xu, Q. Wu, Y. Yi // Journal of Agro-Environment Science. – 2001. – V. 20. – P. 468–470.
863. Ya, G. A *Lentinus edodes* polysaccharide induces mitochondrial-mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells / G. Ya // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – V. 103. – P. 676–682.
864. Yadav, A. Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles:

progress and key aspects of research / A. Yadav [et al.] // Biotechnology Letters. – 2015. – V. 37, N. 11. – P. 2099–2120.

865. Yadav, R.N. Novel facets and challenges in the management of phytopathogens using myconanoparticles / R.N. Yadav [et al.] // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2018. – V. 7. – P. 3296–3308.

866. Yang, H. Homologous Delta-12 fatty acid desaturase (FAD2) genes affect gene expression and linoleic acid levels in *Lentinula edodes* under heat stress / H. Yang [et al.] // Journal of Fungi. – 2024. – V. 10, N. 7. – P. 496.

867. Yang, Y. Optimizing *de novo* assembly of short-read RNA-seq data for phylogenomics / Y. Yang, S.A. Smith // BMC Genomics. – 2013. – V. 14. – P. 328.

868. Yang, Y. The nearly complete genome of *Grifola frondosa* and light-induced genes screened based on transcriptomics promote the production of triterpenoid compounds / Y. Yang, X. Hu // Journal of Fungi. – 2025. – V. 11, N. 4. – P. 322.

869. Yang, Z. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer / Z. Yang [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2013. – V. 95, N. 2. – P. 615–620.

870. Yao, L. *Armillaria mellea* fermentation liquor ameliorates *p*-chlorophenylalanine-induced insomnia associated with the modulation of serotonergic system and gut microbiota in rats / L. Yao [et al.] // Journal of Food Biochemistry. – 2022. – V. 46, N. 29. – P. e14075.

871. Yassin, M. Substances from the medicinal mushroom *Daedalea gibbosa* inhibit kinase activity of native and T315I mutated Bcr-Abl / M. Yassin, S.P. Wasser, J. Mahajna // International Journal of Oncology. – 2008. – V. 32, N. 6. – P. 1197–1204.

872. Yazawa, Y. Antitumor promoting effect of an active component of *Polyporus*, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A / Y. Yazawa, M. Yokota, K. Sugiyama // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2000. – V. 23, N. 11. – P. 1298–1302.

873. Ye, M. Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens* inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis *in vitro* / M. Ye [et al.] // FEBS Letters. – 2005. – V. 579, N. 16. – P. 3437–3443.

874. Yeh, C.T. Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells / C.T. Yeh [et al.] // Cancer Letters. – 2009. – V. 285, N. 1. – P. 73–79.

875. Yin, X. Highly oxygenated meroterpenoids from fruiting bodies of the mushroom *Tricholoma terreum* / X. Yin [et al.] // Journal of Natural Products. – 2013. – V. 76, N. 7. – P. 1365–1368.

876. Yoo, S. Comparative transcriptome analysis identified candidate genes involved in mycelium browning in *Lentinula edodes* / S. Yoo [et al.] // BMC Genomics. – 2019. – V. 20, N. 121. – P. 1–13.

877. Young, M.D. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias / M.D. Young [et al.] // *Genome Biology*. – 2010. – V. 11, N. 2. – P. 14.
878. Yu, H. Transcriptomic analysis of two *Lentinula edodes* genotypes with different cadmium accumulation ability / Yu H. [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – V. 11. – P. 558104.
879. Yu, H. The study of gastric cancer SGC-7901 cells apoptosis induced by sulfated polysaccharide from maitake *in vitro* / Yu H. [et al.] // *Shandong Medical Journal*. – 2006. – V.46, N. 21. – P. 54–55.
880. Yu, H. Whole-genome sequence of a high-temperature edible mushroom *Pleurotus giganteus* / H. Yu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – V. 13. – P. 1–17.
881. Yu, J. The structural characteristics of an acid-soluble polysaccharide from *Grifola frondosa* and its anti-tumor effects on H22-bearing mice / J. Yu [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 158. – P. 1288–1298.
882. Yu, Z.H. Effect of *Lentinus edodes* polysaccharide on oxidative stress, immunity activity and oral ulceration of rats stimulated by phenol / Z.H. Yu [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – V. 75, N. 1. – P. 115–118.
883. Yuan, P. Evaluation and mechanism of immune enhancement effects of *Pleurotus ferulae* polysaccharides-gold nanoparticles / P. Yuan [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – V. 227. – P. 1015–1026.
884. Yuan, Y. An optimized protocol for generation and analysis of Ion Proton sequencing reads for RNA-Seq / Y. Yuan, H. Xu, R.K. Leung // *BMC Genomics*. – 2016. – V. 17. – P. 403.
885. Yukawa, H. Direct cytotoxicity of *Lentinula edodes* mycelia extract on human hepatocellular carcinoma cell line / H. Yukawa [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2012. – V. 35, N. 7. – P. 1014–1021.
886. Zacchi, L. Disordered ultrastructure in lignin-peroxidase secreting hyphae of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* / L. Zacchi, I. Morris, P.J. Harvey // *Microbiology*. – 2000. – V. 146. – P. 759–765.
887. Zaidman, B. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics / B. Zaidman [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – V. 67, N. 4. – P. 453–468.
888. Zambonino, M.C. Biogenic selenium nanoparticles in biomedical sciences: properties, current trends, novel opportunities and emerging challenges in theranostic nanomedicine / M.C. Zambonino [et al.] // *Nanomaterials*. – 2023. – V. 13, N. 3. – P. 424.
889. Zare, B. Isolation and characterization of a fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles / B. Zare [et al.] // *Nanomedicine Journal*. – 2013. – V. 1. – P. 13–19.

890. Zarnack, K. Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1 / K. Zarnack [et al.] // Molecular Microbiology. – 2008. – V. 69, N. 4. – P. 1041–1053.
891. Zayed, K.M. Molluscicidal and antioxidant activities of silver nanoparticles on the multi-species of snail intermediate hosts of schistosomiasis / K.M. Zayed [et al.] // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2022. – V. 16. – e0010667.
892. Zeng, D. Potentiation of *in vivo* anticancer efficacy of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides surface decoration / D. Zeng [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2019. – V. 67. – P. 2865–2876.
893. Zhabinskii, V.N. Structure and biological activity of ergostane-type steroids from fungi / V.N. Zhabinskii, P. Drasar, V.A. Khripach // Molecules. – 2022. – V. 27, N. 7. – P. 2103.
894. Zhang, H. Preparation and structural characterization of acid-extracted polysaccharide from *Grifola frondosa* and antitumor activity on S180 tumor-bearing mice / H. Zhang [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – V. 234. – P. 123302.
895. Zhang, H. Biosynthesis of selenium nanoparticles mediated by fungus *Mariannaea* sp. HJ and their characterization / H. Zhang [et al.] // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2019. – V. 571. – P. 9–16.
896. Zhang, H.N. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides / H.N. Zhang, Z.B. Lin // Acta Pharmacologica Sinica. – 2004 – V. 25, N. 2. – P. 191–195.
897. Zhang, J. Elemental selenium at nano size (nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: Comparison with Se-methylselenocysteine in mice / J. Zhang, X. Wang, T. Xu // Toxicological Sciences. – 2008. – V. 101, N. 1. – P. 22–31.
898. Zhang, L. RNA-Seq-based high-resolution linkage map reveals the genetic architecture of fruiting body development in shiitake mushroom, *Lentinula edodes* / L. Zhang [et al.] // Computational and Structural Biotechnology Journal. – 2021. – V. 19. – P. 1641–1653.
899. Zhang, L. Green synthesis of silver nanoparticles using mushroom *Flammulina velutipes* extract and their antibacterial activity against aquatic pathogens / L. Zhang [et al.] // Food and Bioprocess Technology. – 2020. – V. 13. – P. 1908–1917.
900. Zhang, M. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity / M. Zhang [et al.] // Trends in Food Science and Technology. – 2007. – V. 18, N. 1. – P. 4–19.
901. Zhang, Q. Combined transcriptomics and metabolomics analysis reveals the molecular mechanism of heat tolerance of Le023M, a mutant in *Lentinula edodes* / Q. Zhang [et al.] // Heliyon. – 2023. – V. 9, N. 7. – e18360.
902. Zhang, W. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles by *Pseudomonas alcaliphila* / W. Zhang [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2011. – V.

88, N. 1. – P. 196–201.

903. Zhang, Y. Calcium cation cycling and signaling pathways in fungi / Y. Zhang, H. Jiang, L. Lu // *Biology of the Fungal Cell*. – 2019. – P. 111–123.

904. Zhang, Y. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent development / Y. Zhang [et al.] // *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. – 2013. – V. 1. – P. 53–71.

905. Zhang, Y. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities / Y. Zhang [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2011. – V. 25, N. 2. – P. 196–206.

906. Zhang, Y. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa* / Y. Zhang, G.L. Mills, M.G. Nair // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – V. 50, N. 26. – P. 7581–7585.

907. Zhang, Y. Biosynthesis of gold nanoparticles using chloroplasts / Y. Zhang, G. Zheng, X. Wang // *International Journal of Nanomedicine*. – 2011. – V. 6. – P. 2899.

908. Zhang, Y.F. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa* / Y.F. Zhang, G.L. Mills, M.G. Nair // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – V. 50, N. 26. – P. 7581–7585.

909. Zhang, Y.X. Biosynthesis of gold nanoparticles using chloroplasts / Y.X. Zhang [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2011. – V. 6. – P. 2899–2906.

910. Zhang, Z. A new diterpene from the fungal mycelia of *Herichium erinaceus* / Z. Zhang [et al.] // *Phytochemistry Letters*. – 2015. – V. 11. – P. 151–156.

911. Zhang, Z.H. A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data / Z.H. Zhang [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, N. 8. – e103207.

912. Zhang, Z.Y. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi* / Z.Y. Zhang, J. Bo, J.M. Kelly // *Biochemical Engineering Journal*. – 2007. – V. 35, N. 3. – P. 251–263.

913. Zhao, F. Antitumor activities of *Grifola frondosa* (Maitake) polysaccharide: A meta-analysis based on preclinical evidence and quality assessment / F. Zhao [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2021. – V. 280. – P. 114395.

914. Zhao, F. The induction of apoptosis and autophagy in human hepatoma SMMC-7721 cells by combined treatment with vitamin C and polysaccharides extracted from *Grifola frondosa* / F. Zhao [et al.] // *Apoptosis*. – 2017. – V. 22. – P. 1461–1472.

915. Zhao, J. A cold-water extracted polysaccharide-protein complex from *Grifola frondosa* exhibited anti-tumor activity via TLR4-NF- κ B signaling activation and gut microbiota modification in H22 tumor-bearing mice / J. Zhao [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – V. 239, N. 1. – P. 124291.

916. Zhao, L. Identification of early-response genes involved in cadmium resistance in shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) / L. Zhao [et al.] // *Mycological Progress*. – 2015. – V. 14, N. 114. – P. 1–9.

917. Zhao, Q.Y. Optimizing *de novo* transcriptome assembly from short-read RNA-Seq data: a comparative study / Q.Y. Zhao [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2011. – V. 12, N. 14. – P. 1–12.
918. Zhao, W. Comparison of RNA-Seq by poly (A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling / W. Zhao [et al.] // BMC Genomics. – 2014. – V. 15. – P. 419.
919. Zhao, X. GC–MS-based nontargeted and targeted metabolic profiling identifies changes in the *Lentinula edodes* mycelial metabolome under high-temperature stress / X. Zhao [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V. 20, N. 2330. – P 1–20.
920. Zhao, X. Genome-wide identification and analysis of the heat-shock protein gene in *L. edodes* and expression pattern analysis under heat shock / X. Zhao [et al.] // Current Issues in Molecular Biology. – 2023. – V. 45, N. 1. – P. 614–627.
921. Zhao, X. Fungal silver nanoparticles: Synthesis, application and challenges / X. Zhao [et al.] // Critical Reviews in Biotechnology. – 2018. – V. 38. – P. 817–835.
922. Zhao, Y. Structural insights into the inhibition of Wnt signaling by cancer antigen 5T4/Wnt-activated inhibitory factor 1 / Y. Zhao [et al.] // Structure. – 2014. – V. 22. – P. 614–620.
923. Zhao, Y.Y. Cytotoxic steroids from *Polyporus umbellatus* / Y.Y. Zhao [et al.] // Planta Medica. – 2010. – V. 76, N. 15. – P. 1755–1758.
924. Zhao, Y.Y. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells / Y.Y. Zhao [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1810, N. 4. – P. 384–390.
925. Zheng, N. Optimization of extraction process and the antioxidant activity of phenolics from *Sanghuangporus baumii* / Zheng N. [et al.] // Molecules. – 2021. – V. 26. – P. 3850.
926. Zhong, M. *De novo* characterization of *Lentinula edodes* C(91-3) transcriptome by deep Solexa sequencing / M. Zhong [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2013. – V. 431, N. 1. – P. 111–115.
927. Zhou, J. Characterization of a NaCl-tolerant β -N-acetylglucosaminidase from *Sphingobacterium* sp. HWLB1 / J. Zhou [et al.] // Extremophiles. – 2016. – V. 20, N. 4. – P. 547–557.
928. Zhou, L. Ganoderic acid Me induces apoptosis through mitochondria dysfunctions in human colon carcinoma cells / L. Zhou [et al.] // Process Biochemistry. – 2011. – V. 46. – P. 219–225.
929. Zhu, Y. Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense* / Y. Zhu [et al.] // Scientific Reports. – 2015. – V. 5, N. 11087. – P. 1–18.
930. Zhuang, C. Medicinal value of culinary medicinal Maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.Fr.) S.F.Gray (*Aphyllphoromycetideae*): A review / C. Zhuang, S.P. Wasser // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2004. – V. 6, N. 4. – P. 287–313.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2679065

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ БЛАГОРОДНЫХ
МЕТАЛЛОВ С ПОМОЩЬЮ БАЗИДИАЛЬНЫХ
МАКРОМИЦЕТОВ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (RU)*

Авторы: *Ветчинкина Елена Павловна (RU), Купряшина Мария Александровна (RU), Лоцинина Екатерина Александровна (RU), Буров Андрей Михайлович (RU), Никитина Валентина Евгеньевна (RU)*

Заявка № 2017146272

Приоритет изобретения 27 декабря 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 05 февраля 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 27 декабря 2037 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 679 065** (13) **C1**

(51) МПК
B82B 3/00 (2006.01)
C12P 3/00 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
B82B 3/00 (2006.01); *C12P 3/00* (2006.01); *C12R 1/645* (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2017146272, 27.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.12.2017

Дата регистрации:
05.02.2019

Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 27.12.2017

(45) Опубликовано: 05.02.2019 Бюл. № 4

Адрес для переписки:
 410000, г. Саратов, Главпочтамт, а/я 62

(72) Автор(ы):

Ветчинкина Елена Павловна (RU),
 Купряшина Мария Александровна (RU),
 Лоцинина Екатерина Александровна (RU),
 Буров Андрей Михайлович (RU),
 Никитина Валентина Евгеньевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение науки Институт биохимии и
 физиологии растений и микроорганизмов
 Российской академии наук (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: VETCHINKINA E.P. et al.
 "Biosynthesis of nanoparticles of metals and
 metalloids by basidiomycetes. Preparation of
 gold nanoparticles by using purified fungal
 phenol oxidases"//Appl. Microbiol. Biotechnol.,
 2017, v. 101, p.1047-1062. ВЕТЧИНКИНА
 Е.П. и др. "Биологический синтез золотых
 наночастиц ксилотрофным базидиомицетом
Lentinula edodes"// (см. (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ С ПОМОЩЬЮ
БАЗИДИАЛЬНЫХ МАКРОМИЦЕТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
 биотехнологии. Предложен способ получения
 наночастиц золота или серебра, включающий
 получение бесклеточного фильтрата
 культуральной жидкости при культивировании
Lentinus edodes. К полученному фильтрату
 добавляют водный раствор
 золотохлористоводородной кислоты в
 концентрации 30-80 мкМ для получения

наночастиц золота или водного раствора нитрата
 серебра в концентрации 0,4-0,6 мМ для получения
 наночастиц серебра. Полученную смесь
 инкубируют в темноте при температуре 23-26°C
 от 1 до 60 мин с последующим извлечением
 наночастиц. Изобретение обеспечивает получение
 однородных по размеру и форме наночастиц
 благородных металлов. 8 з.п. ф-лы, 12 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

Прикладная биохимия и микробиология, 2013, т. 49, N 4, с.402-408. BHAT RAVISHANKAR et al.
 "Photo-bio-synthesis of irregular shaped functionalized gold nanoparticles using edible mushroom
Pleurotus florida and its anticancer evaluation"// Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,
 2013, N 125, p.63-69. КУПРЯШИНА М.А. и др. "Биологический синтез наночастиц почвенными
 микроорганизмами"// Тезисы XI Молодежной школы-конференции с международным участием
 "Актуальные аспекты современной микробиологии", 1-2 ноября 2016, Москва, с.89-92.

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY(19) **RU** (11)**2 679 065**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.

B82B 3/00 (2006.01)*C12P 3/00* (2006.01)*C12R 1/645* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

B82B 3/00 (2006.01); *C12P 3/00* (2006.01); *C12R 1/645* (2018.08)

(21)(22) Application: 2017146272, 27.12.2017

(24) Effective date for property rights:
27.12.2017Registration date:
05.02.2019

Priority:

(22) Date of filing: 27.12.2017

(45) Date of publication: 05.02.2019 Bull. № 4

Mail address:

410000, g. Saratov, Glavpochtamt, a/ya 62

(72) Inventor(s):

Vetchinkina Elena Pavlovna (RU),
Kupryashina Mariya Aleksandrovna (RU),
Loshchinina Ekaterina Aleksandrovna (RU),
Burov Andrej Mikhajlovich (RU),
Nikitina Valentina Evgenevna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie nauki Institut biokhimii i fiziologii
rastenij i mikroorganizmov Rossijskoj akademii
nauk (RU)(54) **METHOD OF PRODUCING NANOPARTICLES OF NOBLE METALS USING BAZIDIAC
MACROMYCETES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Method is proposed for producing gold or silver nanoparticles, including the preparation of a cell-free filtrate of culture liquid during cultivation *Lentinus edodes*. To the obtained filtrate add an aqueous solution of hydrochloric acid at a concentration of 30–80 μM to obtain gold nanoparticles or an aqueous

solution of silver nitrate at a concentration of 0.4–0.6 mm for obtaining silver nanoparticles. Resultant mixture is incubated in the dark at a temperature of 23–26 °C from 1 to 60 minutes, followed by the extraction of nanoparticles.

EFFECT: invention provides for obtaining uniform in size and shape of nanoparticles of noble metals.

9 cl, 12 dwg, 4 ex

RU 2 679 065

C 1

RU 2 679 065 C 1

«УТВЕРЖДАЮ»:

Директор Федерального
исследовательского центра
«Саратовский научный центр
Российской академии наук»

 Д.Ф.М.Н. Б.Н. Хлебцов

АКТ

внедрения результатов докторской диссертации соискателя ученой степени доктора биологических наук Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» Ветчинкиной Елены Павловны, выполненной на тему: «Особенности метаболизма ксилотрофных базидиомицетов в процессе онтогенеза и применение грибных метаболитов в био(нано)технологии»

Комиссия в составе: руководителя Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (далее ИБФРМ), доктора биологических наук, профессора Матора Л.Ю., ученого секретаря ИБФРМ РАН, кандидата биологических наук, Селивановой О.Г., заведующей аспирантурой ФИЦ СНЦ РАН Есиной Л.Д. составила настоящий акт в том, что в учебном процессе аспирантов 3-го года очной формы обучения ИБФРМ РАН, подготовка которых осуществлялась в соответствии с Федеральными государственными образовательными стандартами высшего образования по направлению 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации) и направленностям: 03.01.02 – Биофизика, 03.01.04 – Биохимия, 03.01.06 – Биотехнология (в том числе, бионанотехнология), 03.02.03 – Микробиология были:

- включены в учебную программу,
- внедрены и реализованы на практике в период с 01.09.2014 по 30.06.2022 годы в учебный процесс в качестве вариативной дисциплины «Основы микологии» для подготовки и сдачи аспирантами кандидатских экзаменов по специальности и формирования у них профессиональных компетенций следующие материалы диссертационной работы Е.П. Ветчинкиной:
 - данные по морфологии, цитодифференцировке и ультраструктуре клеток мицелия на разных стадиях морфогенеза базидиальных макромицетов,
 - разделы, в которых рассмотрены особенности метаболизма и адаптации грибов в процессе онтогенеза,

- материалы по применению биологически активных метаболитов лекарственных базидиомицетов в биотехнологиях.

Широкое использование новейших научных результатов, полученных соискателем Ветчинкиной Е.П. при подготовке докторской диссертации, в учебном процессе по указанной выше дисциплине «Основы микологии», выполняемом ею с 01.09.2014 по 30.06.2022 годы для аспирантов, при чтении лекций, проведении с ними лабораторно-практических занятий и научно-исследовательской практики позволило существенно расширить их профессиональный кругозор, успешно защитить ими выпускные научно-квалификационные работы с присвоением по окончании аспирантуры квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь».

Руководитель ИБФРМ РАН,
Председатель Ученого совета
ИБФРМ РАН,
д-р биол.наук, профессор

Л.Ю. Матора

Ученый секретарь
ИБФРМ РАН,
канд.биол.наук,

О.Г. Селиванова

Зав. аспирантурой
ФИЦ СНЦ РАН

Л.Д. Есина

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО ПКП «САНТАНА»

АКТ

внедрения в производственную практику ООО ПКП «САНТАНА» результатов диссертационной работы докторанта ФИЦ СНЦ РАН Елены Павловны Ветчинкиной «Особенности метаболизма ксилотрофных базидиомицетов в процессе онтогенеза и применение грибных метаболитов в био(нано)технологии»

Материалы диссертационной работы Е.П. Ветчинкиной по оптимизации питательных сред и улучшению режимов выращивания макромицетов *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Armillaria mellea* и *Ganoderma lucidum* внедрены в производственную практику ООО ПКП «САНТАНА» и были использованы при разработке новых технологических регламентов производства посевного мицелия ксилотрофных и гумусовых базидиомицетов.

Зав. производством

« 15 » сентября 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО ПКП «САНТАНА»

АКТ

внедрения в производственную практику ООО ПКП «САНТАНА» результатов диссертационной работы докторанта ФИЦ СНЦ РАН Елены Павловны Ветчинкиной «Особенности метаболизма ксилотрофных базидиомицетов в процессе онтогенеза и применение грибных метаболитов в био(нано)технологии»

Материалы диссертационной работы Е.П. Ветчинкиной по характеристике особенностей роста и развития ксилотрофных базидиомицетов, образованию морфоструктур (мицелиальных пленок), предшествующих плодоношению, оценке активности ферментов (оксидоредуктаз) в мицелии внедрены в производственную практику ООО ПКП «САНТАНА» и используются для контроля чистоты, оценки активности и качества роста грибных культур в процессе производства.

Старший инженер микробиолог

« 15 » сентября 2025 г.