

УДК 581.132

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ЦИКОРІЮ *CICHORIUM INTYBUS* L. З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ- $\alpha 2b$  ЛЮДИНИ

О. Ю. Кваско, Н. А. Матвєєва, А. М. Шаховський  
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, м. Київ

Досліджено антиоксидантну активність трансгенних рослин цикорію *Cichorium intybus* L. з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини. Показано, що у рослин дев'яти ліній (з десяти) антиоксидантна активність коливалася від  $11,2 \pm 0,69 \times 10^{-6}$  до  $23,30 \pm 0,97 \times 10^{-6}$  мг/мг хв залежно від лінії та була вище, ніж у контрольних нетрансформованих рослин ( $8,8 \pm 1,14 \times 10^{-6}$  мг/мг хв). Не виявлено безпосереднього зв'язку між транскрибуванням гена *ifn- $\alpha 2b$* , а також наявністю інтерфероподібної активності екстрактів трансгенних рослин та збільшенням антиоксидантної активності. Підвищення АОА, можливо, пов'язано саме з генетичною трансформацією – перенесенням чужорідного гена до рослин.

*Ключові слова:* антиоксидантна активність, генетична трансформація, *Cichorium intybus* L., інтерферон- $\alpha 2b$  людини.

**Вступ.** Створення трансгенних рослин розпочалося близько 30 років тому. Нині такі рослини культивують на площах до 148 млн га (за даними ISAAA, 2010 р.). Разом з тим, останнім часом все частіше ставиться питання щодо безпеки використання рослин зі штучно модифікованим геномом. Так, існує деяка загроза для навколишнього середовища через можливість неконтрольованого переносу трансгенів. Крім того, в результаті генетичної трансформації можуть змінюватись фізіологічні та біохімічні характеристики рослин, а також є дані щодо того, що процес генетичної трансформації є стресом для рослин, причому кожен з етапів трансформації, зокрема *Agrobacterium*-опосередкованої, може бути стресовим для рослин [1]. Стрессова реакція викликається такими факторами як сам процес генетичної трансформації (поранення, контакт з патогеном, проникнення бактерії), перенесення чужорідного гена до геному рослин, синтез відповідних білків, біологічна активність білку. Відповідь рослинного організму на такі стресові впливи може проявлятися у зміні фізіологічних та біохімічних параметрів, у тому числі активності антиоксидантної системи.

Біологічна роль антиоксидантної системи (АОС) в організмі пов'язана із захистом геному, мембран та ферментів від активних форм кисню (АФК), вільних радикалів та інших продуктів, що утворюються при вільнорадикальному окисленні. При дії таких стресорів як посуха, засолення, екстремальні температури, біотичні чинники, відбувається утворення і накопичення АФК, що призводить до виникнення оксидативного стресу [2 – 4]. Ці зміни в рослинних клітинах супроводжуються підвищенням активності АОС, зокрема ферментів [5 – 7]. Отже, антиоксидантна активність може бути «маркером» ступеню дії стресових факторів на рослини. За активністю антиоксидантної системи також можна оцінити дію генетичної трансформації як стрессового фактору.

При надмірній кількості АФК та інших вільних радикалів в клітині існує загроза розвитку таких хвороб як анемія, ішемія, артрит, атеросклероз, рак, нейродегенеративні захворювання, діабет. Значна роль в нейтралізації цього негативного впливу вільних радикалів на клітину належить речовинам-антиоксидантам. Тому рослини з підвищеним рівнем антиоксидантної активності можуть бути використані з метою профілактики цих захворювань.

В роботі [8] показано, що інтерферон- $\alpha$  забезпечує підвищення рівня цинк- та марганецьвмісної супероксиддисмутази, зниження рівня продуктів перекисного окислення та оксидативного вибуху, викликаного надмірною кількістю АФК. Отже, рослини, що синтезують активний інтерферон- $\alpha$  також, можливо посилюватимуть біологічний захист клітин проти оксидативного стресу.

В даній роботі досліджено, чи відбуваються зміни активності АОС трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону людини як відповідь на біотичний стресовий чинник - агробактеріальну трансформацію.

**Матеріали та методи.** В дослідженнях використовували трансгенні рослини цикорію *Cichorium intybus* L. var *foliosum* Негі з геном інтерферону  $\alpha 2b$  людини, отримані за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації [9]. Антиоксидантну активність (АОА) визначали за методом, описаним в [10]. Для цього брали листки 10 ліній трансформованих рослин, що росли в умовах *in vitro*. Контрольними слугували нетрансформовані рослини цикорію, що росли в тих самих умовах. Для приготування екстрактів 300 мг рослинного матеріалу розтирали у фарфоровій ступці в 1,5 мл 0,25М фосфатного буферу (рН 7,4). Отриманий гомогенат кількісно переносили в пробірки Eppendorf та центрифугували в мікроцентрифугі Eppendorf Centrifuge 5415 С при 2 000 g протягом 10 хв. До кювети для фотоелектроколориметра КФК-2 товщиною 1 см вносили 1,5 мл 0,25 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,5 мл 0,8 мМ 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, 0,5 мл сульфату заліза (II) та 0,5 мл супернатанту (дослід) або 0,5 мл дистильованої води (контроль). Після цього кожні 30 с протягом 5 хв вимі-

рювали оптичну густину розчину в кюветі ( $D_t$ ) при довжині хвилі 510 нм. Крім того визначали оптичну густину розчину, в який замість 0,5 мл сульфату заліза (II) додавали 0,5 мл дистильованої води ( $D_\infty$ ). За даних умов 2,6-дихлорфеноліндофенолят натрію повністю окислений. Константу швидкості окислення 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію визначали як тангенс кута нахилу прямої на графіку залежності натурального логарифму  $\Delta D_t$  ( $\Delta D_t = D_\infty - D_t$ ) від часу. Як показник антиокислювальної активності рослинного матеріалу використовували значення константи інгібування ( $K_i$ ) окислення 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, яку обчислювали як різницю констант швидкості окислення 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію в контрольному та дослідному варіанті (мл/л хв), поділену на концентрація рослинного матеріалу в кюветі, мг/мл.

**Результати і обговорення.** Усього було досліджено 10 ліній трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини. Антиоксидантна активність дев'яти ліній суттєво перевищувала АОА контрольних нетрансформованих рослин (рис. 1). Так, для шести ліній (№№ 3, 4, 6, 7, 8, 9) АОА перевищувала активність контрольних рослин в 1,96-2,64 рази. В той же час для трьох досліджуваних ліній (№№ 5, 10, 11) АОА виявилась меншою, ніж у вказаних вище, але в 1,27-1,40 рази більшою у порівнянні з контролем. Лише для одної лінії (№ 2) АОА була на рівні контролю. Таким чином, для більшості досліджуваних ліній АОА перевищувала активність рослин дикої типу. Вірогідно, такий ефект може розглядатися як відповідь на стрес, якому піддається рослина у процесі генетичної трансформації.

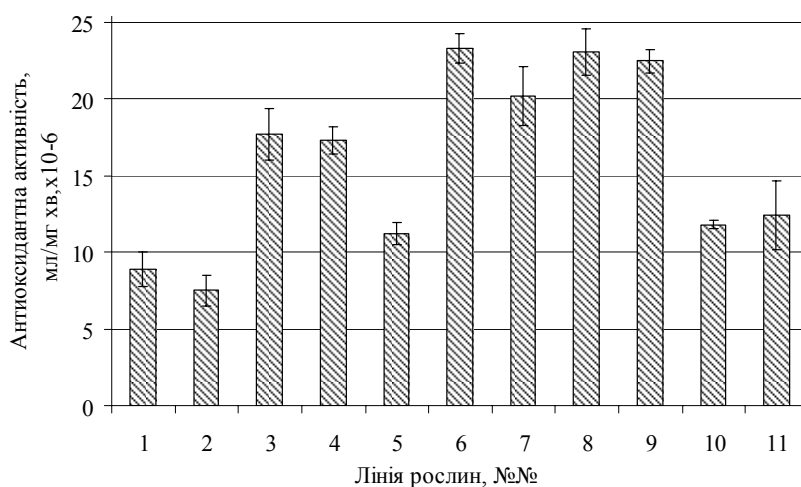


Рис. 1. Антиоксидантна активність трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону людини: 1- контроль (нетрансформовані рослини); 2-11 - лінії трансформованих рослин.

Становить інтерес співставлення АОА з наявністю перенесеного гена *ifn- $\alpha 2b$* , його транскрипцією, синтезом біологічно активного білку та з'ясування причини підвищення АОА – сам факт трансформації або синтезування біологічно активного інтерферону- $\alpha 2b$ . Раніше нами було проведено ПЛР-аналіз ліній №№ 2-11 [9]. Наявність гена інтерферону людини показана в рослинах усіх досліджуваних ліній. Отже, перенесення гену *ifn- $\alpha 2b$*  дійсно відбулося. Для рослин дев'яти з десяти ліній (№ 3-11) показане зростання АОА в порівнянні з контролем, лише у рослин лінії № 2 АОА достовірно не відрізнялась від активності контрольних рослин. Таким чином, збільшення АОА у ліній № 3-11, можливо є наслідком перенесення чужорідного гена.

Для ліній №№ 2, 5, 8, 11 проведено ЗТ-ПЛР аналіз та виявлено, що ген інтерферону транскрибувався лише у рослин лінії № 8, тоді як для решти ліній зворотні транскрипти не було виявлено. Отже, для трьох з чотирьох тестованих ліній спостерігали «мовчання» гена *ifn- $\alpha 2b$*  і, очевидно, білок не синтезувався. Антиоксидантна активність ліній № 5 та №11 (відсутні зворотні транскрипти) перевищувала активність нетрансформованих рослин в 1,27-1,41 разів, а активність лінії № 2 суттєво не відрізнялась від контролю. Антиоксидантна активність рослин лінії № 8, у яких синтез зворотніх транскриптів відбувався, була найвищою та складала  $23,03 \pm 1,54 \times 10^{-6}$  мг/мг хв, що є в 2,6 разів вищим за активність контрольних рослин (рис. 1.). Таким чином, можливо, що транскрипція гена *ifn- $\alpha 2b$*  є лише однією з причин підвищення АОА.

Екстракти з рослин ліній №№ 2, 5, 8, 11 було протестовано на інтерфероноподібну активність (ІПА) по відношенню до вірусу везикулярного стоматиту (неопубліковані дані). Тестування білкового екстракту з рослин лінії № 8 показало наявність інтерфероноподібної активності (9327 МО/г маси рослин або 3291,44 МО/мг білку), а для решти проаналізованих ліній ІПА екстрактів не була виявлена. Антиоксидантна активність рослин лінії № 8 була вищою в 1,85-3,07 разів у порівнянні з рештою ліній, протестованих на ІПА проти вірусу везикулярного стоматиту.

Оскільки високу АОА мали як рослини з ІПА, так і ті, в яких ген *ifn- $\alpha 2b$*  не транскрибувався, ві-

рогідно, що транскрипція гена інтерферону не є єдиною причиною для підвищення рівня антиоксидантної активності. Можна припустити, що такий ефект зумовлює ряд факторів, у першу чергу, вірогідно, перенесення гена, а також присутність біологічно активного інтерферону- $\alpha 2b$ . Встановлення причини підвищення антиоксидантної активності трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону  $\alpha 2b$  потребує подальших досліджень, спрямованих на вивчення синтезу інтерферона більшої кількості ліній та аналіз трансгенних рослин, які не несуть гена інтерферона  $\alpha 2b$  або мають інший трансген.

Речовини, що мають антиоксидантну активність відіграють значну роль у знешкодженні токсичної дії активних форм кисню та інших вільних радикалів, які є однією з причин розвитку ряду захворювань. Цінною природною сировиною для отримання речовин з АОА є лікарські рослини. До таких рослин належить цикорій, який має гепатопротекторну, кардіотонічну, протипухлинну дію, а також природну антиоксидантну активність, переважно завдяки наявності поліфенолів [11]. Отже, рослини цикорію із штучно підвищеною антиоксидантною активністю може слугувати джерелом антиоксидантів.

Підвищення рівня антиоксидантної активності рослин сприяє зростанню їх толерантності до дії різних стресових факторів [12, 13]. Рослини з підвищеним рівнем АОА мають більшу стійкість до оксидативних пошкоджень, спричинених дією стресових факторів [14, 15]. Тому отримані трансгенні рослини цикорію з високим рівнем АОА можуть бути більш стійкими до дії цих факторів.

**Висновки.** Проведені дослідження показали, що дев'ять з десяти ліній трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону людини мали більшу антиоксидантну активність, ніж контрольні нетрансформовані рослини. Для шести ліній рослин показана висока антиоксидантна активність – від  $17,25 \pm 0,88 \times 10^{-6}$  до  $23,30 \pm 0,97 \times 10^{-6}$  мг/мл хв залежно від лінії, в той же час АОА контрольних рослин складала лише  $8,8 \pm 1,14 \times 10^{-6}$  мг/мл хв. Підвищення АОА, на нашу думку, можливо, викликано рядом факторів – транскрибуванням трансгена, наявністю біологічно активного інтерферону, але, вірогідно, у першу чергу – саме перенесенням чужорідного гену. Остаточне встановлення причини підвищення антиоксидантної активності трансгенних рослин цикорію потребує більш детального вивчення: збільшення вибірки та порівняння з лініями трансгенних рослин, які містять різні трансгени.

Автори виражають подяку Кудрявцю Ю. Й. (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України) за допомогу у визначенні інтерфероподібної активності екстрактів з трансгенних рослин.

## РЕЗЮМЕ

Изучена антиоксидантная активность трансгенных цикория *Cichorium intybus* L. с геном интерферона- $\alpha 2b$  человека. Показано, что для девяти из десяти линий растений антиоксидантная активность варьировала в пределах от  $11,2 \pm 0,69 \times 10^{-6}$  до  $23,30 \pm 0,97 \times 10^{-6}$  мг/мл мин в зависимости от линии и была выше по сравнению с активностью контрольных нетрансформированных растений ( $8,8 \pm 1,14 \times 10^{-6}$  мг/мл хв). Не выявлено непосредственной зависимости увеличения антиоксидантной активности от транскрипции гена *ifn- $\alpha 2b$*  и наличия интерфероподобной активности. Повышение антиоксидантной активности у трансгенных растений, возможно, вызывается именно генетической трансформацией – перенесением чужеродного гена в растения.

*Ключевые слова:* антиоксидантная активность, генетическая трансформация, *Cichorium intybus* L., интерферон- $\alpha 2b$  человека.

## SUMMARY

Antioxidant activity of transgenic chicory plants with interferon- $\alpha 2b$  gene was investigated. The antioxidant activity of nine plant lines from ten investigated varied from  $11,2 \pm 0,69 \times 10^{-6}$  to  $23,30 \pm 0,97 \times 10^{-6}$  mg/ml min and was higher than activity of control nontransformed plants ( $8,8 \pm 1,14 \times 10^{-6}$  mg/ml min). Direct relation between the presence of *ifn- $\alpha 2b$*  gene reverse transcripts and interferon-like activity with increasing of antioxidant activity was not found. The increase of antioxidant activity may be caused by genetic transformation - transferring of the foreign gene in plants.

*Key words:* antioxidant activity, genetic transformation, *Cichorium intybus* L., human interferon- $\alpha 2b$ .

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Enikeev A. G. Agrobacterial transformation as complex biotical stressing factor / A. G. Enikeev, T. V. Kopytina, L. A. Semenova, et al. // Journal of stress Physiology and Biochemistry. – 2008. – Vol. 4., No 1. – P. 11-19.
2. Колупаев Ю. Е. Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец, А. И. Обозный // Вісник Харківського національного університету Серія Біологія. – 2011. – Вип. 1, № 22. – С. 6-34.
3. Foyer C. H. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants // C. H. Foyer, P. Descourviere, K. J. Kunert // Plant Cell Environ. – 1994. – Vol. 17, No 5. – P. 507-523.
4. Asada K. The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons / K. Asada // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 1999. – Vol. 50. – P. 601-639
5. Gossett D. G. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton / D. G. Gossett, E. P. Millhollon, M. C. Lucas // Crop Sci. – 1994. – Vol. 34, No 3. – P. 706-714.
6. Olmos E. Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum*. / E. Olmos, J. A. Hernandez, F. Sevilla, E. Hellin // J. Plant Physiol. – 1994. – Vol. 144, No 4. – P. 594-598.

7. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants / J. A. Hernandez, E. Olmos, F. J. Corpas et al. // *Plant Sci.* – 1995. – Vol. 105, No 2. – P. 151-167.
8. Lu G. Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells / G. Lu, I. Shimizu, X. Cui et al // *J. Med Invest.* – 2002. – Vol. 49, No 3-4. – P. 172-81.
9. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$  в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації / Н.А. Матвєєва, А.М. Шаховський, І.М. Герасименко та ін. // *Біополімери і клітина.* – 2009. – Т.25, № 2. – С. 120-125.
10. Семенов В. Л. Метод определения антиокислительной активности биологического материала / В. Л. Семенов, А. М. Ярош // *Украинский биохимический журнал.* – 1985. – Т. 57, № 3. – С. 50-52.
11. Lavelli V. Antioxidant Activity of Minimally Processed Red Chicory (*Cichorium intybus* L.) Evaluated in Xanthine Oxidase-, Myeloperoxidase-, and Diaphorase-Catalyzed Reactions / V. Lavelli // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – Vol. 56, No 16. – P. 7194-7200.
12. Kim Y.-H. Expression of Arabidopsis NDPK2 increases antioxidant enzyme activities and enhances tolerance to multiple environmental stresses in transgenic sweetpotato plants / Y.-H. Kim, S. Lim, K.-S. Yang // *Mol. Breeding.* – 2009. – Vol. 24, № 3. – P. 233-244.
13. Yang L. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing AtIpK2b, an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from Arabidopsis thaliana / L. Yang, R. Tang, J. Zhu // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 66, No 4. – P. 329–343.
14. Harper D. B. Mechanisms of paraquat tolerance in perennial ryegrass. Role of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase / D. B. Harper, B. M. R. Harvey // *Plant Cell Environ.* – 1978. – Vol. 1, No. 3 – P. 211-215.
15. Wise R. R. Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and endogenous antioxidants / R. R. Wise, A. W. Naylor // *Plant Physiol.* 1987. – Vol. 83, No. 2. – P. 278-282.

Надійшло до редакції 17.10.2011 р.