

реактивности. Модуляторные влияние пробиотического препарата также характеризовалось гендерными различиями и было более выраженным у животных женского пола.

Ключевые слова: пробиотики, ожирение, лимфоидные органы, циркулирующие иммунные комплексы

V. V. Pozur, V. M. Svyatetska, V. S. Usok, M. S. Potapenko, G. S. Dymant, D. S. Yankovskyy, M. P. Rudyk
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of biology", Ukraine
Scientific and Productional Company "AD Prolisok", Ukraine

THE REACTION OF LYMPHOID ORGANS IN RATS WITH GLUTAMAT –INDUCED OBESITY TO THE MULTIPROBIOTIC "SYMBITER ACIDOPHILUS"

The effect of multiprobiotic "Symbiter acidophilus" on weight indices and cellularity of lymphoid organs as well as serum level of circulating immune complexes in rats with glutamate-induced obesity were investigated. "Symbiter acidophilus" prevented the development of disorders in lymphoid organs associated with the obesity. It testifies anti-inflammatory effect of the preparation. Modulating effect of probiotic was characterized by gender differences and was more expressed in female rats.

Keywords: probiotics, obesity, lymphoid organs, circulating immune complexes

Рекомендує до друку
В. В. Грубінко

Надійшла 17.04.2015

УДК 5.57.576.4

А. О. ПОТРОХОВ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03680

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН *NICOTIANA TABACUM* L З ГЕНОМ *IFN-A2B* ЛЮДИНИ, ІНФІКОВАНИХ ВІРУСОМ ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ

Досліджено ступінь розвитку стрес-реакцій у трансгенних рослин тютюну *Nicotiana tabacum* з геном *ifn- α 2b* людини під дією фітовірусної інфекції, викликаною вірусом тютюнової мозаїки, за показниками ПОЛ та АОА. Для оцінки розвитку ПОЛ було визначено накопичення початкового і кінцевого продукту, а саме дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду. Встановлено, що після інфікування вірусом тютюнової мозаїки спостерігалися зміни у вмісті продуктів ПОЛ у тканинах листя тютюну. В нетрансформованих інфікованих рослинах відмічено збільшення вмісту продуктів ПОЛ, а в уражених трансформованих рослинах відмічався зменшення вмісту цих сполук. При дослідженні загальної АОА було показано, що при інфікуванні трансгенних рослин вірусом тютюнової мозаїки було зазначено, що АОА знижується на 14,8-18,1%. Однак, її рівень залишається вище порівняно, з АОА неінфікованих трансгенних рослин. Вірогідно, відбувалася активізація процесів пов'язаних з захистом рослин від дії шкочинних факторів.

Ключеві слова: інтерферон, вірус тютюнової мозаїки, перекисне окислення

Організми реагують на дію стресових чинників різними способами, а захисні механізми можуть бути забезпечені як активацією генетичного апарату так і зміною метаболізму клітин [8, 10]. При змінах умов навколишнього середовища в живих системах відбувається розвиток стрес-реакції [2, 11, 12]. За помірної інтенсивності та тимчасовій дії стресового фактору в живому організмі відбувається посилення захисних систем та мобілізація енергетичних ресурсів, однак більш тривалому та інтенсивному стресовому навантаженні в клітинах розпочинаються процеси

пероксидного окислення, пригнічення енергопродукції та зниження синтезу білку з подальшою його денатурацією [5].

Одним з механізмів захисту від стресових чинників є активація та посилення пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ-окислювальна деградація ліпідів, яка відбувається, в основному, під дією вільних радикалів). При нормальному розвитку організму без надмірних впливів стресів активність ПОЛ незначна, однак все змінюється при тривалих стресових станах. В умовах стресового навантаження відбувається балансування між антиоксидантною активністю та ПОЛ, що є необхідною умовою для підтримки нормальної життєдіяльності клітини. Проміжні продукти окислення можуть слугувати індукторами та медіаторами стресового стану [7]. На розвиток стрес-реакції рослин впливають різні чинники як абіотичного, так і біотичного походження [6]. Зокрема, фітовірусна інфекція може призводити до патологічних змін в організмі рослини. Розвиток інфекційного процесу в організмі ураженої рослини неодмінно пов'язаний зі стресовими реакціями і порушенням їх нормальної життєздатності [1]. Відомо, що при патологічному стані організму відмічається накопичення в тканинах продуктів пероксидного окислення ліпідів, що супроводжується порушенням функцій ряду ферментативних систем [9]. Для повноцінного уявлення про проходження ПОЛ в тканинах необхідно визначати вміст дієнових кон'югатів (ДК-початковий продукт пероксидного окислення) та малонового диальдегіду (МД-кінцевий продукт), а також протилежного процесу – загальної антиоксидантної активності (АОА) у тканинах.

Метою роботи була оцінка ступеня розвитку стрес-реакцій у трансгенних рослин тютюну *Nicotiana tabacum* L з геном *ifn-a2b* людини під дією фітовірусної інфекції, викликаною вірусом тютюнової мозаїки, за показниками ПОЛ та АОА.

Матеріал і методи досліджень

В дослідженнях були використані рослини *Nicotiana tabacum* сорту *Petit Havana* з геном *ifn-a2b* людини, які отримані нами раніше. Дослідні рослини переносили в стерильний ґрунт для подальшого росту за тепличних умов при температурі 24°C та 16-годинному освітленні. Вірусомісний матеріал отримували шляхом механічного розтирання уражених листків рослин тютюну з симптомами вірусної інфекції. Отриманий матеріал був інокульований в рослину механічним втиранням в листову пластинку рослин. Визначення присутності вірусу в рослині проводили візуально за зміною морфології листя, а саме його деформації та утворення хлоротичних плям.

Для визначення дієнових кон'югатів дослідний матеріал розтирали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4), осад ресуспендували в тому ж буфері. Після цього до розчину додавали суміш гептану з ізопропіловим спиртом 1:1. Отриману суміш центрифугували 10 хв. при 4000g. Після центрифугування додавали дистильовану воду у співвідношенні 1/10 об'єму, розчин перемішували та відбирали гептанову фазу у кількості 1 мл. До неї додавали етиловий спирт (5 мл). Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 233 нм в кварцових кюветах з ходом променя 10 мм.

Малоновий диальдегід визначали з матеріалу, отриманого за вище описаним методом. Гомогенат листя осаджували 5% трихлороцтовою кислотою та центрифугували 10 хв. при 4000g. Надосадову рідину переносили у пробірки і додавали 0,8% тіобарбітурову кислоту та нагрівали на водяній бані 10 хв. при температурі 100°C. Оптичну густину розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 532 нм в кварцових кюветах з ходом променя 1 см.

Для визначення загальної антиоксидантної активності до отриманих дослідних зразків (метод отримання див. вище) додавали 0,2 мл 10мМ розчину 2-дезоксирибози, 0,2 мл 0,1 мМ розчину комплексу Fe²⁺/EDTA та 0,2 мл 30% H₂O₂. Отриманий розчин доводили фосфатним буфером до об'єму 2мл. Суміш інкубували 4 год. при +37°C. Після інкубації додавали 1мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти і 1мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50мМ розчині NaOH. Суміш нагрівали протягом 10 хв. при 100°C. Виміри оптичної густини проводили при довжині хвилі 532 нм на спектрофотометрі СФ-26.

Вміст ліпідів у рослинах визначали за стандартною методикою за допомогою набору реагентів «Загальні ліпіди» (Філісіт Діагностика, Україна).

Для обробки статистичних даних використовували пакет програм MS Excel 2003.

Результати досліджень та їх обговорення

В ході проведених раніше досліджень нами було отримано трансформовані рослини *Nicotiana tabacum* L. сорту *Petit Havana* що несуть цільовий ген *ifn- α 2b* людини та селективний ген *nptII*. Після ПЛР аналізу було підтверджено наявність цільового та селективного генів та їх транскрипцію. З метою оцінки стрес-стійкості рослин було відібрано та інфіковано їх трансформовані лінії. Візуально детектовано симптоми вірусного ураження рослин.

Після фіксації симптомів та проведення ЗТ-ПЛР аналізу на наявність вірусного РНК продукту, відбирали уражене листя дослідних рослин для проведення аналізів для визначення продуктів ПОЛ та АОА.

Трансформація призводила до підвищення вмісту первинного продукту ПОЛ дієнових кон'югатів (ДК). Вміст ДК в нетрансформованих неінфікованих рослинах становив $0,63 \pm 0,016$ мкМ/мг ліпідів, в той час як в рослинах з геном інтерферону вміст цих сполук склав від $1,08$ до $1,8 \pm 0,06$ мкМ/мг ліпідів (рис. 1). Очевидно, що, за даним показником трансформовані рослини знаходились в стресовому стані, вірогідно викликаного трансгenezом. Після інфікування вірусом тютюнової мозаїки спостерігалися зміни у вмісті ДК у тканинах листя тютюну. В нетрансформованих інфікованих рослинах відмічено збільшення вмісту ДК з $0,63 \pm 0,016$ (здорові рослини) до $1,3 \text{ мкМ/мг} \pm 0,04$ ліпідів (інфіковані), а в уражених трансформованих рослинах відмічався зменшення вмісту цих сполук з $1,8 \text{ мкМ/мг} \pm 0,06$ до $0,18 \pm 0,01$ мкМ/мг ліпідів. Відомо, що збільшення вмісту ДК відбувається при початковому розвитку стрес-реакції. Таким чином, в рослинах, які не зазнавали трансформаційних впливів, фітовірусна інфекція спричинювала посилення процесів ПОЛ, активацію метаболічних процесів і загалом розвиток стрес-реакцій. На противагу, у трансформованих рослинах активність ПОЛ знижувалася, відбулося уповільнення накопичення продуктів ПОЛ. Можна припустити, що рівень адаптивної активності у контрольних рослин при наявності фітовірусної інфекції був нижчим, ніж у трансформованих рослинах.

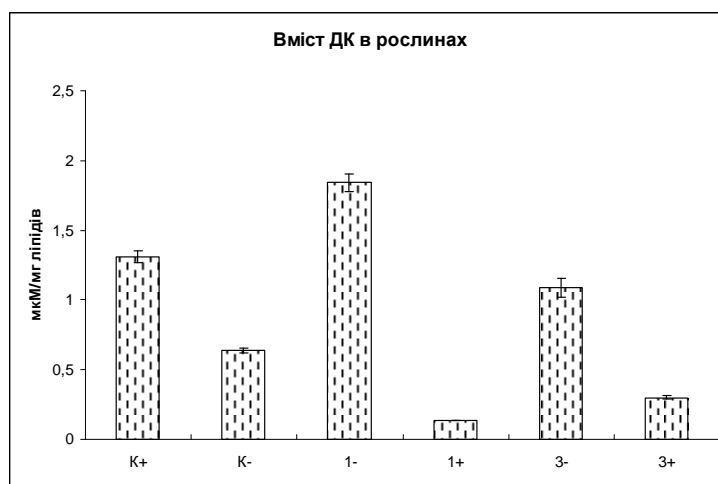


Рис. 1. Вміст ДК в рослинах *Nicotiana tabacum* L. з векторною конструкцією, що несе гени *ifn- α 2b* людини та ген *nptII* + інфіковані рослини; — неінфіковані рослини (3, 1 – трансгенні лінії; К контрольні не трансформовані рослини);

При дослідженні накопичення МД в рослинах було, зазначено, що основні тенденції накопичення МД збігаються з тими, що спостерігалися при дослідженні початкового етапу окиснення (рис. 2). Визначено підвищення рівня МД у контрольних нетрансформованих рослинах з $0,2 \pm 0,008$ мкМ/мг ліпідів до інфікування до $0,3 \pm 0,01$ мкМ/г після інфікування, що свідчить про негативний вплив фітовірусу на проходження метаболічних процесів в рослині. Вміст цієї сполуки в трансформованих рослинах був вищим ніж у контролі і становив $0,28-0,33 \pm 0,01$ мкМ/мг ліпідів до інфікування та знижувався до $0,08-0,1 \pm 0,001$ мкМ/мг після інфікування. Ймовірно, зниження

показників накопичення МД було викликано внаслідок розвитку захисних систем організму рослини після перенесення чужорідного гену та посиленням їх адаптаційними можливостей.

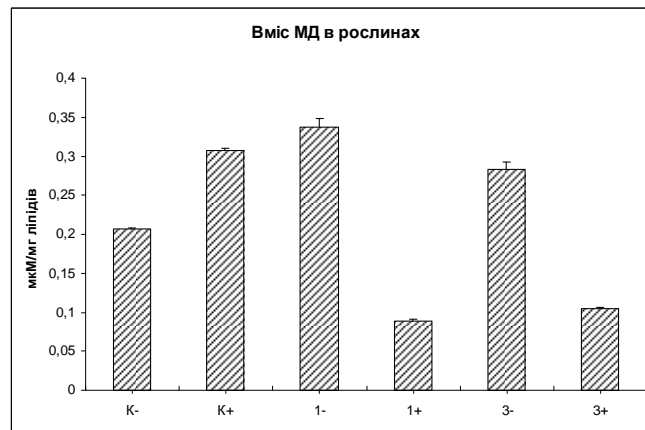


Рис. 2. Вміст МД в рослинах *Nicotiana tabacum* L. з векторною конструкцією, що несе гени *ifn- α 2b* людини та ген *nptII* + інфіковані рослини; — неінфіковані рослини (3, 1 – трансгенні лінії; К)

Дослідження антиоксидантної активності в литтях рослин тютюну показало, що у контрольних рослинах її рівень практично не змінювався при інфікуванні вірусом тютюнової мозаїки (рис 3). АОА цих рослин була на рівні $58 \pm 1,2$ мкМ МД/г сирової маси листя (інфіковані рослини) та $56 \pm 0,2$ мкМ МД/г (неінфіковані рослини). При цьому вона була дещо вища у інфікованих рослин. Нами встановлено, що перенесення гену інтерферону- α 2b людини в геном тютюну призводило до посилення АОА. Так трансгенні неінфіковані рослини характеризувались високою АОА на рівні $40-43 \pm 0,3$ мкМ МД/г, що вище на 23,2-28,5% від АОА нетрансформованих рослин. Це свідчить про те, що інтерферон, який, можливо, синтезується рослинами призводить до розвитку захисних механізмів від процесів перекесного окислення ліпідів, зокрема стимуляцією механізмів протидії ПОЛ.

При інфікуванні трансгенних рослин вірусом тютюнової мозаїки було зазначено, що АОА знижується на 14,8-18,1%. Однак, її рівень залишається вище порівняно, з АОА неінфікованих трансгенних рослин. Механізми та причини підвищеної АОА рослин з геном інтерферону- α 2b потребують подальших досліджень. Необхідно спрямувати подальші дослідження на визначення процесів в трансформованих рослинах, які призводять до розвитку ПОЛ.

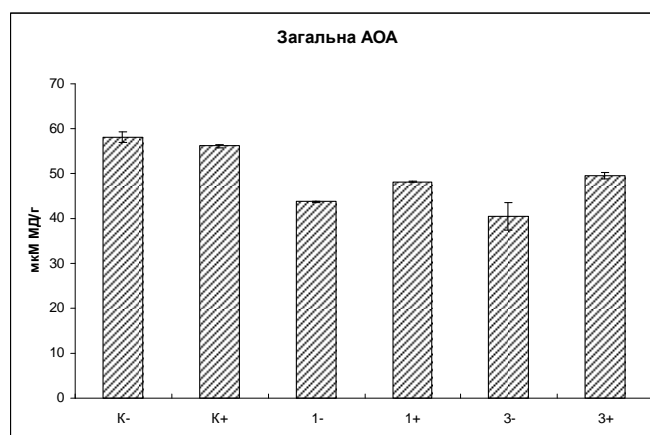


Рис. 3. Загальна АОА в рослинах *Nicotiana tabacum* L. з векторною конструкцією, що несе гени *ifn- α 2b* людини та ген *nptII* + інфіковані рослини; — неінфіковані рослини (3, 1 – трансгенні лінії; К)

Показники вмісту продуктів ПОЛ були переховані на вміст загальних ліпідів в тканинах листків дослідних рослин. Це дозволяє отримати більш адекватні показники вмісту продуктів ПОЛ в клітині рослини. Так у неінфікованих контрольних рослин вміст ліпідів склав $7,1 \pm 0,14$ мг/г сирої маси рослини, а в трансформованих лініях від 4,5 до $10,5 \pm 0,15$ мг/г (рис 4). Після інфікування ВТМ в усіх інфікованих рослин вміст ліпідів збільшився. Так в контрольних інфікованих рослинах вміст ліпідів склав $9,9 \pm 0,24$ мг/г, а в інфікованих трансгенних рослинах їх вміст становив $11,8-19,4 \pm 0,21$ мг/г. Зростання вмісту ліпідів в уражених рослинах можна пояснити зміною в спрямованості метаболічних та біосинтетичних процесах, викликаних фітовірусною інфекцією в організмі. Можливо це також пов'язано з накопиченням фосфоліпідів в клітинній стінці рослин, оскільки саме ці ліпіди посилюють захист організму від зовнішнього втручання.

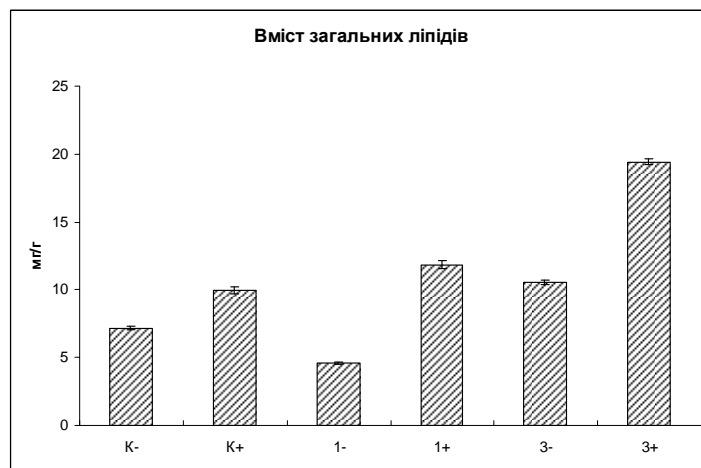


Рис. 4. Вміст загальних ліпідів в рослинах *Nicotiana tabacum* L. з векторною конструкцією, що несе гени *ifn-α2b* людини та ген *nptII* + інфіковані рослини; — неінфіковані рослини (3, 1 – трансгенні лінії; К)

Речовини, що мають антиоксидантну активність відіграють значну роль у послабленні токсичної дії вільних радикалів, які в свою чергу спричиняють різного роду патологічні зміни в організмі. Підвищення рівня антиоксидантної активності рослин сприяє зростанню їх толерантності до дії різних стресових факторів [3, 4]. Зокрема автори зазначають, що на розвиток ПОЛ та АOA впливають цілий ряд негативних факторів, як біотичного так і абіотичного характеру, зокрема солоність, надмірна вологість, важкі метали в ґрунті, посуха та інші. Достеменно встановлено, що зазначенні фактори пригнічують ріст та розвиток рослин, призводять до зниження врожайності та загибелі організму [3]. Рослинні ж організми під дією цих чинників для протидії їх негативним ефектам активують свої захисні системи. Основними маркерами розвитку стресу є накопичення МД і ДК [4]. Накопичення цих продуктів в організмі рослин є показником розвитку стресу. Наряду з цим рослини можуть адаптуватися до дії негативних чинників завдяки активації механізмів, які пов'язані з зниженням ПОЛ, а саме для перешкоджання оксидантних пошкоджень активуються цикл ферментативних захисних реакцій спрямованих на протидію стресу [3]. Аналізуючи отримані нами дані можна припустити, що в піддослідних трансгенних рослинах, які вирізнялися від контрольних нетрансформованих високим рівнем АOA, спостерігалися тенденції адаптації до стресового фактору, зокрема фітовірусної інфекції. В наслідок чого, можливо, відбувається розвиток толерантності трансформованих рослин до інфекції.

Висновки

Проведені дослідження показали, що в трансформованих рослинах тютюну з геном *ifn-α2b* людини, які не зазнали впливу фітовірусної інфекції викликані ВТМ, відбувається більше накопичення початкового та кінцевого продуктів ПОЛ (ДК і МД) у порівнянні з контрольними нетрансформованими рослинами. В інфікованих рослинах вміст продуктів ПОЛ знижувався. При дослідженні загальної АOA та ліпідів, було визначено, що після інфікування ВТМ в трансформованих рослинах відбувалися процеси накопичення загальних ліпідів та підвищувалася

АОА. Вірогідно, що відбувалася активізація процесів пов'язаних з захистом рослин від дії шкочодчинних факторів. Однак для встановлення більш чіткого розуміння механізмів, які відбуваються в трансгенних рослинах слід провести додаткові дослідження.

1. *Лапикова В.П.* Возможное участие активных форм кислорода в двойной индукции противоифекционных реакций растения / В.П. Лапикова, Л.М. Гайворонская, А.А. Аверьянов // Физиология растений . — 2000. — Т. 47, Вып. 1. — С. 160—162.
2. *Chen F.* The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress / F. Chen, Q. Li, L. Sun, Z. He // DNA Res. — 2006.— P. 53—63.
3. *Dai-Yin Chao.* Understanding Abiotic Stress Tolerance Mechanisms: Recent Studies on Stress Response in Rice / Dai-Yin Chao // Journal of Integrative Plant Biology. — 2007. — P. 742—750.
4. *Davey M.* High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues / M. Davey, E. Stals, S. Hippeli, E. Elstner // Journal Biochem. — 2005. — 347 p.
5. *Grant R.* Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective / R. Grant, Urano K., Delrot S., M. Pezzotti // Plant Biology. — 2011. — 163 p.
6. *Hippeli S.* Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants / S. Hippeli, E. Elstner F. J. // Plant Physiol. — 1996. —P. 249—257.
7. *Kouros Vahdati* Agricultural and Biological Sciences Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture / Kouros Vahdati, Leslie C. // InTech. —2013. — 410 p.
8. *Mantri N.* Abiotic Stress Responses in Plants Metabolism, Productivity and Sustainability / N. Mantri, E. Pang. — 2012. — 473 p.
9. *Mittler R.* Abiotic stress, the field environment and stress combination / R. Mittler // Plant Science. — 2006. — P. 15—19.
10. *Morel Y.* Repression of gene expression by oxidative stress / Y. Morel, R. Barouki // Biochem. J. — 1999. — P. 481—496.
11. *Nicky J.* The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field / J. Nicky, E. Peter // Journal of Experimental Botany. — 2012. — P. 3523—3543.
12. *Zinn E.* Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links / E. Zinn, F. Jeffrey // Journal of Experimental Botany. — 2007. — P. 1959—1968.

А. А. Потрохов

Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM* L С ГЕНОМ *IFN-A2B* ЧЕЛОВЕКА, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

Исследовано развитие стресс-реакций в трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* с геном *ifn-α2b* человека под действием фитовирусной инфекции, вызванной вирусом табачной мозаики, по показателям ПОЛ и АОА. Для оценки развития ПОЛ было определено накопление начального и конечного продукта, а именно диеновых конъюгатов и малонового диальдегида. Установлено, что после инфицирования вирусом табачной мозаики наблюдались изменения в содержании продуктов ПОЛ в тканях листьев табака. В нетрансформированных инфицированных растениях отмечено увеличение содержания продуктов ПОЛ, а в инфицированных трансформированных растениях отмечался уменьшение содержания этих соединений. При исследовании АОА было показано, что при инфицировании трансгенных растений вирусом табачной мозаики было отмечено, что уровень АОА снижается на 14,8-18,1%. Однако, ее уровень остается выше чем уровень АОА в неинфицированных трансгенных растениях. Вероятно, происходила активизация процессов связанных с защитой растений от воздействия вредоносных факторов.

Ключевые слова: интерферон, вирус табачной мозаики, перекисное окисление липидов

А. О. Potrokhov

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* L WITH HUMAN *IFN-A2B* INFECTED WITH TOBACCO MOSAIC VIRUS

The degree of stress responses in transgenic tobacco plant *Nicotiana tabacum* L with human *ifn-α2b* gene infected by tobacco mosaic virus was studied. Accumulation of initial and the final product of lipid peroxidation were studied. In infected tissues of tobacco leaves some changes in the content of lipid

peroxidation products were observed. In nontransformed infected plants marked increase in the content of lipid peroxidation products. In the transformed plants was marked reduction of these compounds. Also in infected transgenic plants was noted that AOA was lower on 14,8-18,1% in compare of level AOA control infected plants. However, AOA level remains above compare with AOA uninfected transgenic plants. Probably, there was intensification of processes related to the protection of plants from the effects negative factors.

Keywords: interferon, tobacco mosaic virus, lipid peroxidation

Рекомендує до друку
В. В. Грубінко

Надійшла 29.04.2015