

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ  
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ М. М. Барановський

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_р.

**ДИПЛОМНА РОБОТА**

**(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)**

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «МАГІСТР»

ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**Тема: «Вплив генетичної трансформації на функціонування системи  
антиоксидантного захисту рослин та синтез біологічно активних  
антиоксидантів»**

Виконавець: студентка групи ФБ-205М

Богданович Т. А.

Керівник: д. с.-г. н., професор

Барановський М. М.

Консультант розділу «Охорона праці»:

Павлиш В. Д.

Консультант розділу

«Охорона навколишнього середовища»:

Рябчевський О. В.

Нормоконтролер:

Дражнікова А. В.

КИЇВ 2020

# НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ М. М. Барановський

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20 р.

## ЗАВДАННЯ

**на виконання дипломної роботи**

**Богданович Таїси Андріївни**

1. Тема дипломної роботи «Вплив генетичної трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин та синтез біологічно активних антиоксидантів» затверджена наказом ректора від «15» вересня 2020 р. № 1657/ст.
2. Термін виконання роботи: з 5 жовтня 2020 року по 23 грудня 2020 року.
3. Вихідні дані роботи: власні експериментальні дані отримані на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України; літературні відомості про систему антиоксидантного захисту рослин; *in vitro* культури «бородатих коренів» та нетрансформованих рослин *Artemisia tilesii*, *A. vulgaris*, *Althaea officinalis*.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 2 таблиці, 43 рисунки.

## 6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи	5.10. – 18.10.2020	
2	Написання основної частини	19.10. – 22.11.2020	
3	Формулювання висновків та рекомендацій	23.11. – 29.11.2020	
4	Оформлення роботи	30.11. – 7.12.2020	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	8.12. – 9.12.2020	
6	Виправлення недоліків	10.12. – 13.12.2020	
7	Захист дипломної роботи	23.12.2020	

## 7. Консультанти з окремих розділів:

Розділ	Консультант	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	Рябчевський О. В.		

## 8. Дата видачі завдання «15» вересня 2020 р.

Керівник дипломної роботи \_\_\_\_\_ /Барановський М. М./

(підпис керівника)

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ /Богданович Т. А./

(підпис випускника)

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Вплив генетичної трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин та синтез біологічно активних антиоксидантів»: 97 с., 2 табл., 43 рис., 86 літературних джерел.

**Об'єкт дослідження** – процес визначення антиоксидантної активності трансгенних коренів – продуцентів біологічно активних сполук.

**Предмет дослідження** – екстракти «бородатих» коренів рослин *Artemisia tilesii*, *A. vulgaris*, *Althaea officinalis*.

**Мета дипломної роботи:** дослідження впливу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин родів *Artemisia* та *Althaea*.

**Методи дослідження:** біологічні (методи культивування трансгенних коренів), фізіологічні (визначення швидкості росту), фізико-хімічні та біохімічні (аналіз вмісту флавоноїдів і пероксиду водню у екстрактах рослин, дослідження ферментативної системи та антиоксидантної активності екстрактів) та статистичні.

Матеріали дипломної роботи можна використовувати як теоретичну основу для проведення комплексного скринінгу *in vitro* культур рослин як генетично трансформованих, так і нетрансформованих, у лабораторіях та науково-дослідних інститутах. Отримані дані дають можливість для подальшого створення цільових фармацевтичних препаратів з доведеною антиоксидантною дією. Аналіз сучасних публікацій стосовно *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин родів *Artemisia* та *Althaea*, а також методики та результати досліджень, представлені у роботі, можуть бути використані при викладанні дисциплін «Молекулярна біотехнологія та біоінженерія» і «Біохімія біологічних агентів».

*ARTEMISIA TILESII L.*, *ARTEMISIA VULGARIS L.*, *ALTHAEA OFFICINALIS L.*,  
ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС, АНТИОКСИДАНТИ, «БОРОДАТІ» КОРЕНІ,  
*AGROBACTERIUM RHIZOGENES*, ФЛАВОНОЇДИ, ПЕРОКСИДАЗА, КАТАЛАЗА,  
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, DPPH, ВІДНОВЛЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ

## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, скорочень, термінів.....	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Загальна характеристика рослин видів <i>Artemisia tilesii</i> , <i>A. vulgaris</i> та <i>Althaea officinalis</i> .....	11
1.2. Поняття оксидативного стресу у рослин.....	15
1.3. Генетична інженерія рослин та отримання «бородатих» коренів.....	22
1.4. Дослідження антиоксидантної активності трансгенних рослин у світовій практиці.....	30
1.5. Висновки до розділу.....	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	35
2.1. Характеристика рослинного матеріалу .....	35
2.2. Визначення впливу генетичної трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин.....	37
2.2.1. Проведення скринінгу культур «бородатих» коренів.....	37
2.2.2. Визначення приросту маси коренів на рідкому середовищі з різним вмістом сахарози.....	46
2.3. Висновки до розділу .....	47
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	48
3.1. Аналіз впливу генетичної трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин .....	48
3.2. Аналіз технологічних параметрів росту культур «бородатих» коренів на рідкому середовищі з різним вмістом сахарози .....	60
3.3. Висновки до розділу.....	63
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	64

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГІ НАН України .....	64
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГІ НАН України .....	66
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГІ НАН України .....	70
4.4. Висновки до розділу .....	73
<b>РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....</b>	<b>74</b>
5.1. Поняття про адаптаційні процеси рослин .....	74
5.2. Вплив забруднення ґрунту на фізіолого-біохімічні реакції рослин.....	75
5.3. Вплив забруднення повітря на фізіолого-біохімічні реакції рослин.....	79
5.4. Вплив іонізуючих випромінювань на фізіолого-біохімічні реакції рослин .....	81
5.6. Висновки до розділу .....	83
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>84</b>
<b>СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ...</b>	<b>86</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>95</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

- APX – аскорбат-пероксидаза;  
BSA – бичачий сироватковий альбумін;  
DPPH – 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил;  
MDA – малоновий альдегід;  
NBT – нітросиній тетразолій;  
AOA – антиоксидантна активність;  
АФК – активні форми кисню;  
БАР – біологічно активні речовини;  
ВМ – волога маса;  
ІВ – іонізуюче випромінювання;  
КАТ – каталаза;  
ПОД – пероксидаза;  
СОД – супероксиддисмутаза;  
ТЕАХ – тетраетиламоній хлорид.

## ВСТУП

**Актуальність.** Антиоксидантні властивості рослин – дуже актуальна тема для фармацевтичної біотехнології, адже підвищений оксидативний стрес є однією з причин виникнення нейродегенеративних та серцевосудинних хвороб [1]. Природні антиоксиданти, особливо феноли, флавоноїди, каротиноїди і вітаміни (вітаміни Е і С), поширені в харчових і лікарських рослинах і мають широкий спектр дії, включаючи протизапальну, омолоджуючу, антиатеросклеротичну і протипухлинну [2]. Крім того, визнано, що доповнення екзогенними антиоксидантами або посилення ендogenous антиоксидантних захисних сил організму є перспективним методом протидії небажаним ефектам окисного стресу [3].

В даний час існує приблизно 19 методів *in vitro* та 10 *in vivo* методів оцінки антиоксидантної активності, які зазвичай застосовуються для оцінки АОА зразків рослин [4]. Ці методи необхідно постійно доповнювати новими та модифікувати [5], адже біохімічні та фізико-хімічні методи досліджень все більше розвиваються з кожним роком. У більшості цих досліджень зразки рослин демонструють потужну антиоксидантну активність, що зумовлена їх вродженою здатністю синтезувати неферментативні антиоксиданти, такі як вітаміни та глутатіон, а також вторинні метаболіти, такі як поліфенольні сполуки (флавоноїди).

Коли рослина піддається стресовим факторам, включається ряд генів, що призводить до підвищення рівня тих метаболітів і білків, які відповідають за надання певного ступеня захисту. Під час стресу електрони переносяться на молекулярний кисень ( $O_2$ ), утворюючи активні форми кисню (АФК). АФК, такі як синглетний кисень ( $^1O_2$ ), супероксидні іони ( $O_2^-$ ) та пероксиди, з яких найбільш широко поширений перекис водню ( $H_2O_2$ ) – токсичні молекули [6]. АФК-мішені – це молекули з високою молекулярною масою, такі як мембранні ліпіди або мітохондріальна ДНК. АФК здатні викликати пошкодження майже всіх клітинних макромолекул [7].



Види родин *Artemisia* [8] та *Althaea* [9] здавна використовуються в народній та класичній медицині завдяки властивостям біоактивних сполук, різноманіття та синтез, а отже і терапевтичну дію яких можна підвищити, використовуючи такі методи генетичної трансформації рослин, як створення «бородатих» коренів. Адже культури «бородатих» коренів можуть накопичувати біологічно активні речовини у значно більшій кількості, ніж вихідні нетрансформовані рослини, що зумовлено перенесенням в геном рослини чужорідних генів шляхом агробактеріальної трансформації.

**Мета дипломної роботи** – дослідження впливу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин родів *Artemisia* та *Althaea*.

Для досягнення мети дипломної роботи було поставлені такі завдання:

1. Проаналізувати особливості рослин родин *Artemisia* та *Althaea*, які дозволяють використовувати їх у розробці препаратів з антиоксидантними властивостями;
2. Провести скринінг культур «бородатих» коренів для селекції ліній з найвищими показниками АОА;
3. Дослідити швидкість росту та приріст маси коренів обраних ліній при культивуванні на рідкому середовищі з різним вмістом сахарози;
4. Визначити вплив генетичної трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин;
5. Теоретично обґрунтувати створення ліофілізованого препарату на основі «бородатих» коренів.

**Об'єкт дослідження** – процес визначення антиоксидантної активності трансгенних коренів – продуцентів біологічно активних сполук.

**Предмет дослідження** – Екстракти «бородатих» коренів рослин *Artemisia tilesii*, *A. vulgaris*, *Althaea officinalis*.

**Методи дослідження** – біологічні (методи культивування трансгенних коренів), фізіологічні (визначення швидкості росту), фізико-хімічні та біохімічні

(аналіз вмісту флавоноїдів і пероксиду водню у екстрактах рослин, дослідження ферментативної системи та антиоксидантної активності екстрактів) та статистичні.

**Наукова новизна роботи.** Проведено комплексний аналіз антиоксидантної активності культур «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*, *A. vulgaris* та *Althaea officinalis*.

**Практична значимість.** Матеріали дипломної роботи можна використовувати як теоретичну основу для проведення комплексного скринінгу *in vitro* культур рослин як генетично трансформованих, так і нетрансформованих, у лабораторіях та науково-дослідних інститутах. Отримані дані дають можливість для подальшого створення цільових фармацевтичних препаратів з доведеною антиоксидантною дією. Аналіз сучасних публікацій стосовно *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин родів *Artemisia* та *Althaea*, а також методики та результати досліджень, представлені у роботі, можуть бути використані при викладанні дисциплін «Молекулярна біотехнологія та біоінженерія» і «Біохімія біологічних агентів».

**Особистий внесок випускника.** Весь обсяг експериментальних досліджень за темою дипломної роботи, аналіз літературних даних, статистична обробка результатів, їх опис та аналіз виконані випускником особисто під керівництвом зав. лабораторії адаптаційної біотехнології, д.б.н., с.н.с. Матвєєвої Н.А. та під керівництвом завкафедри біотехнології ФЕБІТ НАУ д. с.-г. н., професора Барановського М.М.

**Публікації.** Матеріали роботи опубліковані у вигляді тез наступних конференцій: V Міжнародна науково-практична конференція «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії», Харків, 2020; IV Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 15-річчю кафедри біотехнології Національного авіаційного університету «Новітні досягнення біотехнології», Київ, 2020.

# РОЗДІЛ 1

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Загальна характеристика рослин видів *Artemisia tilesii*, *A. vulgaris* та *Althaea officinalis*

Рід *Artemisia* L. – один з найбільших родів родини *Asteraceae* Bercht. & J. Presl., в якому налічують більше 500 видів [10]. Поширені вони, головним чином, в північній півкулі – помірній зоні Європи, Азії, Північної Америки та Північної Африки. На території України знайдено 30 видів роду *Artemisia*. Біологічна класифікація рослин роду *Artemisia* представлена у табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Біологічна класифікація рослин роду *Artemisia*

Домен:	Еукаріоти ( <i>Eukaryota</i> )
Царство:	Зелені рослини ( <i>Viridiplantae</i> )
Відділ:	Вищі рослини ( <i>Streptophyta</i> )
Клас:	Дводольні ( <i>Eudicotidae</i> )
Порядок:	Айстроцвіті ( <i>Asterales</i> )
Родина:	Айстрові ( <i>Asteraceae</i> )
Рід:	Полин ( <i>Artemisia</i> ) L.

Для експериментальної частини роботи використовували лінії видів *A. tilesii* та *A. vulgaris*.

*Artemisia tilesii* (полин Тілесіуса) є багаторічною травою з глибоко розділеним ворсистим листям. У дикій природі пагін рослини сягає 80 см, а листочки – від 2 до 6 см у довжину, зубчасті та розділені; колір листя – зелений з білуватим відтінком. Ця рослина має невеликі, зеленувато-коричневі, схожі на бутони, змішані квіткові головки, що розташовуються на високому стеблі з розгалуженим листям [11, 12]

(рис. 1.1). Рослина здатна рости на різних типах ґрунтів і краще зростає при інтенсивному освітленні. Невибаглива до умов навколишнього середовища і здатна рости на сухих піщаних ґрунтах та пошкоджених екологічними та техногенними катастрофами територіях. Має високу толерантність як до кислотних, так і до основних ґрунтів, і може рости на шахтах, де відбувається видобуток токсичних речовин. *A. tilesii* зустрічається по всій Алясці, а також в Японії, Сибіру, Канаді. Ця рослина здавна використовується корінним населенням Америки для загоєння ран та лікування різних хвороб серцево-судинної системи, для загоєння ран та попередження інфекційних хвороб [13].



Рис. 1.1. *Artemisia tilesii*.

Верхівка стебла з нерозкритими  
суцвіттями.

Чукотка, Чаунська р-н, західна окр.  
м. Певек, 17.06.2018 [14]



Рис. 1.2. *Artemisia vulgaris*.

Верхівка квітучої рослини.  
Санкт-Петербург,  
кінець серпня 2008 [14]

*Artemisia vulgaris* – багаторічна лікарська рослина (рис. 1.2) заввишки від 0,5 до 2 м (рідше до 2,5 м). Кореневище сланке, коротке, у верхній частині потовщене. Стебло улишене по всій висоті, гранчасте, знизу голе, вгорі короткоповстисте, здебільшого темно-червоне. Листки двічі- або трійчастоперистороздільні з

ланцетними сегментами, зверху голі, зелені, знизу – білоповстисті, сіруваті. Загальна довжина листка 5 см – 20 см, окремі сегменти сягають 2,5 мм – 9 мм. Полин звичайний має пристосування до захисту від надмірного нагрівання і випаровування: опівдні, коли сонце найдужче припікає, його листки повертаються до сонця нижнім, повстистим боком, який добре відбиває надлишок світла. Квітки трубчасті, зібрані у висхідні кошики, що утворюють довгі волотеподібні суцвіття червонуватого кольору. Квітне у липні-вересні. Розмножується переважно насінням. Одна рослина може утворити до 150 тис. сім'янок, які добре проростають з поверхні ґрунту або з незначної глибини. Розмножується також частинами кореневища. У посівах стає злісним бур'яном, основним засобом боротьби з яким є додержання правил агротехніки [15].

З *A. vulgaris* готують настоянки, що мають анальгезивну, антигельмінтну, антиревматичну дію [16]. Ефірні масла мають антиоксидантну, антимікробну, антисептичну та тонічну дію [17].

Рослина поширена в Європі, Америці, Центральній Азії та на півночі Африки. Вважається, що *A. vulgaris* походить зі Східної Азії [18]. Ростає на луках, біля річок, на засмічених місцях, городах, полях, у садах, пасовищах по всій Україні [15].

Рослини роду *Artemisia* містять аскорбінову кислоту, інулін, цукор, слиз, жирну олію, каротин, дубильні речовини, смоли, ефірну олію (0,1 % – 0,2 %), флавоноїди, кумарини, сесквітерпени, таніни, глікозиди, цінеол, туйон, фенхон, р-цимен, камфен, борнеол, пінени, амірин, нерол, муролол, скополетин [15, 17]. Завдяки цим речовинам полин звичайний має заспокійливу, тонізуючу, кровотворну, протиспазматичну, жовчогінну, глістогінну дію. Його використовують при неврозах, безсонні, істерії, епілепсії, порушеннях менструального циклу, виснаженні, гастриті, метеоризмі, гіпертонічній хворобі, ураженні глистами. Трава полину звичайного входить до збору мікстури Здренко, у суміші з чебрецем її застосовують для лікування алкоголізму [15].

*Althaea officinalis* – багаторічна лікарська рослина (рис. 1.3) з родини мальвових (*Malvaceae*). Має широке вертикальне кореневище з жовто-бурими коренями, які сягають 50 см завдовжки. Стебла прямостоячі короткогалузисті,

жорсткі, сірувато-зеленого кольору, заввишки від 60 до 120 см з черешковими сірувато-зеленими листками і блідо-рожевими квітками, розміщеними по кілька штук у пазухах верхніх листків. Нижні листки яйцеподібні, п'ятилопатеві. Верхні – трилопатеві, по краях зубчасто-пилчасті. Квітки рожеві, складаються з подвійної неоппадаючої чашечки, п'ятипелюсткового віночка і численних тичинок, і зрослися майже до самого верху в одну загальну трубку, що прикриває маточку. Плід сухий, оточений чашечкою, яка залишається; плід розпадається на бурі сім'янки [19].



Рис. 1.3. *Althaea officinalis*. Частина квітучої рослини. Південний Казахстан, 30.08.2016 [14]

Рослина походить з помірних регіонів Індії [19], але зараз є широкорозповсюдженою і в Європі, і в Америці, і в Азії (в помірних та субтропічних областях), та Північ Африки. В Україні росте біля озер та річок. В регіонах напівпустель, солонців і солончаків – здебільшого у заболочених низинах. Надає перевагу легким вологим ґрунтам із неглибоким заляганням підземних вод.

*A. officinalis* здавна використовується як лікарська рослина, адже має антисептичну, антиоксидантну, антимікробну, протизапальну, гастропротекторну властивості. Препарати алтеї (порошок, водний настій, рідкий екстракт, сироп) використовують як відхаркувальний засіб при катаральних станах дихальних

шляхів, а також при поносах, гострих гастритах і ентероколітах. Вона входить також до складу грудного збору. Також застосовується при астмі та захворюваннях верхніх дихальних шляхів. Корені алтеї містять до 35 % слизових речовин, які визначають цілющі властивості рослини, а також крохмаль (до 37 %), сахарозу (10,2 %), бетаїн (до 4 %) і жирну олію (до 1,7 %), астрагалін, мукополісахариди, арабінофуранан, кавову кислоту, цикорин, кумарин та кумаринову кислоту, діосметин, кемпферол, лютеолін, кверцетин, скополін [19]. Біологічна класифікація наведена у табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Біологічна класифікація рослин виду *Althaea officinalis*

Домен:	Еукаріоти ( <i>Eukaryota</i> )
Царство:	Зелені рослини ( <i>Viridiplantae</i> )
Відділ:	Вищі рослини ( <i>Streptophyta</i> )
Клас:	Дводольні ( <i>Eudicotidae</i> )
Порядок:	Мальвоцвіті ( <i>Malvales</i> )
Родина:	Мальвові ( <i>Malvaceae</i> )
Рід:	Алтея ( <i>Althaea</i> ) L.
Вид	Алтея лікарська

## 1.2. Поняття оксидативного стресу у рослин

Молекулярний кисень ( $O_2$ ) – головний біологічний акцептор електронів, який виконує життєво важливу роль у основних клітинних функціях. Однак з корисними властивостями  $O_2$  виникає й утворення активних форм кисню (АФК), таких як супероксид ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекис водню та гідроксильний радикал ( $OH^{\cdot}$ ). АФК становить серйозну загрозу і може спричинити загибель аеробних клітин. Щоб мінімізувати згубний вплив АФК, аеробні організми виробили неферментативні та ферментативні антиоксидантні захисні засоби. Останні включають каталази, пероксидази, супероксиддисмутази та глутатіон-S-трансферази (GST). Клітинні механізми АФК-чутливості недостатньо вивчені, але ряд факторів транскрипції, які регулюють

експресію генів антиоксидантів, добре характеризуються у прокариотів та в дріжджах. У вищих еукаріотів реакції на окислювальний стрес є більш складними та модулюються кількома регуляторами. У рослин АФК пов'язані зі згубним впливом різних екологічних стресових умов. Багато генів захисту рослин активізуються у відповідь на ці умови [20].

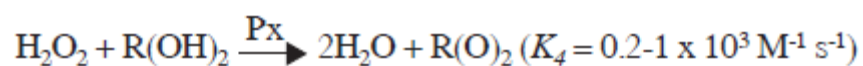
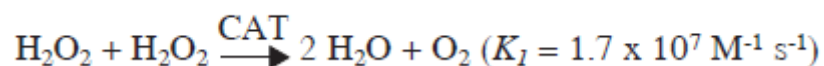
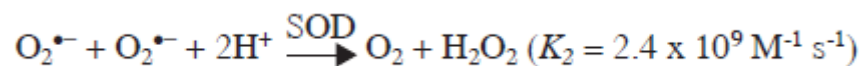
Для повного відновлення  $O_2$  до води потрібно чотири електрона.  $O_2$  надає перевагу поетапному одновалентному шляху відновлення, що призводить до частково відновлених проміжних сполук. До реакційноздатних видів відновленого кисню належать супероксидний радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекис водню ( $H_2O_2$ ) та гідроксильний радикал ( $OH^{\cdot}$ ). Останній також може бути утворений взаємодією  $O_2^{\cdot-}$  і  $H_2O_2$  у присутності іонів металів. І  $O_2^{\cdot-}$ , і  $OH^{\cdot}$  надзвичайно реактивні і можуть спричинити молекулярні пошкодження, що призводять до загибелі клітин. Гідроксильний радикал реагує практично з чим завгодно, завдаючи великого внутрішньоклітинного ураження.  $O_2^{\cdot-}$  – це кон'югована основа слабкої кислоти, перигідроксильного радикалу ( $HO_2$ ), рКа якого становить  $4,69 \pm 0,08$ . Таким чином, в кислому середовищі дуже реакційноздатний пергідроксильний радикал може переважати після зниження електронним діоксигеном на один електрон, тоді як при більш високих значеннях рН переважає  $O_2^{\cdot-}$ . Ця та фізично енергізована форма діоксигену, синглетний кисень ( $^1O_2$ ), є біологічно найважливішими АФК. Енергія активації  $\sim 22$  ккал/ моль потрібна для підняття молекулярного кисню ( $O_2$ ) зі свого основного стану у його перший синглетний стан. У вищих рослин ця енергія отримується з квантів за допомогою таких молекул переносу, як хлорофіл. ROS може взаємодіяти з білками, ліпідами та нуклеїновими кислотами, викликаючи сильне молекулярне пошкодження (перекисне окислення ліпідів, лізис мембран, амінокислотні модифікації, фрагментація пептидного ланцюга, підвищена схильність до протеолізу, окиснення Fe-S центрів, делеції та транслокації хромосом, ДНК-мутації, деградація основ) [20].

Мітохондріальна ДНК чутливіша до окислювального пошкодження, ніж ядерна ДНК, зокрема через відсутність організації хроматину та меншої можливості відновлення ДНК мітохондрій. У стресових умовах концентрація АФК



підвищується до пошкоджуючих рівнів хлоропластів, мітохондрій та пероксисом порівняно з базальним рівнем, виробленим у нормальних умовах росту. Під час стресових ситуацій фіксація CO<sub>2</sub> обмежена, що призводить до зниження відновлення вуглецю циклом Кальвіна, що, в свою чергу, відновлює окислений НАДФ<sup>+</sup>, щоб служити акцептором електронів у фотосинтезі. Коли ферредоксин при фотосинтетичному перенесенні електронів надмірно зменшується, електрони можуть бути переведені з PS-I в кисень з утворенням супероксидних радикалів (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) за допомогою процесу, званого реакцією Мелера, який запускає ланцюгові реакції, що генерують більш агресивні кисневі радикали. У пероксисомах H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> утворюється при окисненні гліколевої кислоти до гліоксилової кислоти під час фотодихання [21].

До неферментативних засобів захисту від оксидативного стресу відносяться сполуки з антиоксидантними властивостями, такі як вітаміни С і Е, глутатіон та β-каротин. Чисто ферментативні захисні засоби, такі як супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ) та пероксидази, захищають шляхом захвату супероксидних радикалів та перекису водню, перетворюючи їх у менш реакційноздатні види. СОД каталізують перехід O<sub>2</sub><sup>•-</sup> до H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а КАТ і пероксидази знижують H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 2H<sub>2</sub>O. Подібність реакцій СОД і КАТ полягає в тому, що кожна є окисно-відновною, при яких субстрат, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> для СОД і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для КАТ, є як відновлювачем, так і окислювачем, тоді як для пероксидаз потрібні різні відновлювачі, залежно від їх особливостей. В деяких умовах КАТ може діяти як ефективна пероксидаза. СОД перетворюють перший продукт одновалентного відновлення O<sub>2</sub> в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, який потім повинен бути знищений КАТ та/або пероксидазами. Таким чином, СОД і КАТ служать в тандемі як передові засоби антиоксидантного захисту [20]:



Металоензим супероксиддисмутаза (СОД, SOD, EC 1.15.1.1) перетворює O<sub>2</sub><sup>•-</sup> в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> і вперше був продемонстрований у кукурудзі, яка містила шість генетично та біохімічно різних ізозимів. Ензими мають активні центри, які містять або купрум та

цинк (Cu/Zn-супероксид-дисмутаза), або ферум (Fe-супероксид-дисмутаза), або манган (Mn-супероксид-дисмутаза). Cu/Zn-супероксид-дисмутаза знаходиться в цитозолі та хлоропласті рослинної клітини, Mn-супероксид-дисмутаза знаходиться в матриксі мітохондрій та пероксисом. Збільшення рівня СОД пов'язане з боротьбою з окислювальним стресом, викликаним абіотичним стресом і відіграє вирішальну роль у виживанні рослин [21].

Каталази (КАТ, САТ, ЕС 1.11.1.6), в основному локалізовані в пероксисомах, є тетрамерним гемом, що містить ферменти, які перетворюють  $2\text{H}_2\text{O}_2$  в  $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ . Багато рослин містять кілька форм ізоформ каталази, і вони можуть безпосередньо окислювати субстрати, такі як метанол, етанол, формальдегід та мурашина кислота. Каталази рослин можна класифікувати на три класи: каталази 1 класу є найбільш помітними у фотосинтетичних тканинах і беруть участь у видаленні  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що утворюється під час фотодихання; клас 2 високо виробляється в судинних тканинах і може відігравати роль у лігніфікації, їх точна біологічна роль залишається невідомою; 3 клас дуже поширений у насінні та молодих рослинах, і їх активність пов'язана з видаленням надлишку  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що утворюється під час деградації жирної кислоти в циклі гліюксилатів у гліюксисомах [21].

Глутатіон-пероксидази – це сімейство множинних ізоформ, які каталізують відновлення  $\text{H}_2\text{O}_2$  та цитотоксичних гідропероксидів до спиртів. Таким чином, крім очищення  $\text{H}_2\text{O}_2$ , GPx також служать для детоксикації продуктів перекисного окислення ліпідів, що утворюються внаслідок активності АФК. GPx в рослинах класифікують на три типи: селен-залежні (GPx, ЕС 1.11.1.9), селен-незалежні фосфоліпід-гідропероксид GPx (PHGPX) та глутатіон-трансферази (GST, ЕС 2.5.1.18), що демонструють активність GPx (GST-GPx). Ці два ферменти GPx та GST відрізняються між собою субодиницями, характером зв'язку селену в активному центрі та каталітичними механізмами [21].

Аскорбат-пероксидаза (APX, ЕС 1.11.1.1) – фермент, який використовує аскорбат як донор електронів. Підрозділяються на 5 різних ізоформ, включаючи форми, зв'язані з тилакоїдною і мікросомальною мембранами, а також розчинні стромальні, цитозольні та апопластичні ферменти. APX має більш високу

спорідненість до  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ніж КАТ і СОД, і може мати більш важливу роль в управлінні оксидативним стресом [21].

Глутатіон-редуктаза (ГР, GR, EC 1.6.4.2) була очищена з ряду рослинних тканин і є висококонсервованим ферментом. Вона каталізує НАДФН-залежну реакцію дисульфідного зв'язку GS-SG і, таким чином, важлива для підтримки відновленого пулу глутатіону. ГР локалізується в основному в стромі хлоропластів, але також зустрічається в мітохондріях, цитозолі та пероксисомах. Рослини мають кілька форм цього ферменту. ГР каталізує останній етап шляху перетворень аскорбат-глутатіон [21].

Аскорбінова кислота (вітамін С) – це один з найбільш широко вивчених антиоксидантів, що міститься в більшості рослинних клітин, органел та апопластів. Зазвичай аскорбат зустрічається у відновленій формі (90% пулу аскорбату), а його внутрішньоклітинна концентрація коливається від 20 мМ в цитозолі до 20–300 мМ в стромі хлоропластів. Аскорбат синтезується в мітохондріях і впливає на багато фізіологічних процесів, включаючи регуляцію росту, диференціацію та метаболізм. Дві молекули аскорбату використовуються АРХ в аскорбат-глутатіоновому циклі для відновлення води  $\text{H}_2\text{O}_2$  при одночасному генеруванні монодегідроаскорбату (МДА), який є радикалом з коротким терміном експлуатації і може непропорційно переходити до дегідроаскорбату та аскорбату. МДА також може бути відновлений безпосередньо до аскорбату. Донором електронів зазвичай є НАДФ і каталізується монодегідроаскорбат редуктазою (МДАР) або ферредоксином (у хлоропластах). Ізозими МДАР присутні у мітохондріях, хлоропластах та цитозолі. Аскорбат може безпосередньо захоплювати  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  і  $\cdot\text{OH}$  та регенерувати токоферол з токофероксильного радикала, забезпечуючи, таким чином, захист мембрани [21].

$\alpha$ -Токофероли – це сім'я антиоксидантів, які містяться в усіх органах рослин та водоростей. З чотирьох ізомерів ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  та  $\delta$ )  $\alpha$ -токофероли є найбільш біологічно активними та переважаючими антиоксидантами в мембранах хлоропластів і в основному відповідають за захист його від фотоокислювальної дії. Антиоксидантні властивості обумовлені здатністю «гасити» синглетний кисень за допомогою

механізму передачі заряду.  $\alpha$ -Токоферолі перешкоджають подовженню ланцюга при автоокисленні ліпідів, що є ефективною пасткою для вільних радикалів [21].

Глутатіон – це трипептид ( $\gamma$ -глутамілцистеїнілгліцин), який був виявлений практично у всіх відділах клітин, таких як цитозоль, хлоропласти, ендоплазматичний ретикулум, вакуолі та мітохондрії. Глутатіон є основним джерелом непротеїнових тіолів у більшості рослинних клітин. Хімічна реактивність тіолової групи глутатіону робить його особливо придатним для виконання широкого спектру біохімічних функцій. Нуклеофільна природа тіолової групи важлива при формуванні меркаптидних зв'язків з металами та для взаємодії з вибраними електрофілами. Він також зустрічається переважно у відновленій формі (GSH), а його концентрація найбільша у хлоропластах (1 мМ – 4 мМ). Біосинтетичний шлях глутатіону добре встановлений і на відміну від біосинтезу аскорбату, схожий у рослин, тварин та мікроорганізмів [21].

Каротиноїди – це пігменти, які містяться у рослинах та мікроорганізмах. У природі зустрічається понад 600 каротиноїдів. Антиоксидантна активність каротиноїдів виникає насамперед як наслідок здатності кон'югованої структури з подвійними зв'язками до делокалізації непарних електронів, які в першу чергу відповідають за здатність  $\beta$ -каротину «гасити» синглетний кисень без деградації, а також за хімічну реактивність  $\beta$ -каротину із вільними радикалами, такими як пероксильні ( $\text{ROO}^\bullet$ ), гідроксильні ( $^\bullet\text{OH}$ ) та супероксидні радикали ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). У досить високих концентраціях каротиноїди можуть захистити ліпіди від перекисного окислення [21].

Фенольні сполуки – це різноманітні вторинні метаболіти (флавоноїди, дубильні речовини, ефіри гідроксицинамату, лігнін, кумарини) у рослинних тканинах [22]. Поліфеноли мають ідеальну хімічну структуру для активізації вилучення вільних радикалів, і вони ефективніші антиоксиданти, ніж токоферолі та аскорбати. Антиоксидантні властивості поліфенолів впливають з їх високої реакційної здатності як донорів водню або електронів, так і від здатності радикалу, отриманого поліфенолом, стабілізувати і делокалізувати непарний електрон (функція розриву ланцюга), а також від їх здатності хелатувати іони перехідного

металу (припинення реакції Фентона). Іншим механізмом, що лежить в основі антиоксидативних властивостей фенолів, є здатність флавоноїдів змінювати кінетику перекисного окислення шляхом зміни порядку ліпідної упаковки та зменшення плинності мембран. Однак за певних умов (наприклад, висока концентрація фенольних антиоксидантів, наявність перехідних металів та високий рівень рН), вони можуть поводитись як прооксиданти [21].

Антиоксидантну активність фенольних сполук (включаючи флавоноїди) часто передбачають шляхом визначення термодинамічних властивостей вихідних сполук (згаданих вище) або антиоксидантного радикала, що утворюється в реакції, катіонів радикалів та аніонів. У літературі багато уваги приділяється оцінці вищезазначених параметрів для визначення механізму антиоксидантної реакції та найбільш реакційноздатного місця в структурних сполуках, відповідальних за реакційну здатність та участь у потрібному механізмі переносу електрона або атому Гідрогену. Загальновідомо, що антиоксидантна здатність фенольних сполук залежить від кількості гідроксильних груп у кільцевій структурі та їх розташування. Орто-положення гідроксильних груп надає високу стабільність радикалу, що утворився після процесу нейтралізації радикалів. Чим більша кількість гідроксильних груп, тим кращі їх антиоксидантні властивості. Наприклад, каваова кислота (3,4-дигідрокси-корична кислота) з двома гідроксильними групами виявляє кращі антиоксидантні властивості, ніж р-кумарова кислота (4-гідроксицианатна кислота), яка має лише одну гідроксильну групу, пов'язану з ароматичним кільцем. Парапозиція посилює антиоксидантну активність у порівнянні з орто- та метапозиціями. Крім того, антиоксидантна активність фенольних сполук залежить від властивостей відбирання електронів карбоксилатної групи в бензойних кислотах, що негативно впливає на здатність донорних гідроксибензоатів. У випадку флавоноїдів, наявність одиничної гідроксильної групи в 3'-положенні з невеликим електронодонорським потенціалом відповідає за низьку активність сполук (наприклад, гесперетин демонструє відносно низьку антиоксидантну активність). На відміну від цього, позиція 4' демонструє більш швидке утворення феноксільних радикалів. Більш того, флавоноїди здатні хелатувати іони заліза та міді, що

пов'язано з їх структурою та рН. Також відомо, що деякі фенольні сполуки (особливо флавоноїди) можуть впливати на активність ферментів, які беруть участь у процесі окислення в живих організмах, а саме глутатіон-пов'язані ферменти [23].

Мелатонін відомий як кінцевий антиоксидант, оскільки він утворює стійкі продукти окислення, які не підлягають подальшому використанню організмом. Він синтезується *de novo* у людини і відіграє головну роль у регуляції циркадних ритмів, але він також виробляється рослинами, де він виконує аналогічну роль у регуляції фотоперіодичних реакцій, а також діє як антиоксидант. Мелатонін використовується як лікарський засіб для лікування деяких циркадних порушень, таких як синдром затримки фази сну та сезонний афективний розлад, але його антиоксидантні властивості також є актуальними, оскільки він був показаний для захисту від радіації, а також може знизити ризик виникнення певних форм раку [24].

### **1.3. Генетична інженерія рослин та отримання «бородатих» коренів**

З моменту розробки концепції «клітинної культури *in vitro*» німецьким фізіологом Готлібом Габерландтом в 1902 р., вдалося культивувати клітини, органи або цілі рослини багатьох видів у суворо контрольованих умовах; такі підходи використовують різні біотехнологічні методи для використання тотипотентності (природна здатність ділити та виробляти диференційовані клітини) рослинної тканини. В даний час рослинні культури *in vitro* використовуються в сільськогосподарських цілях шляхом клонального розмноження рослин та впровадження нових генетичних варіацій та трансгенних рослин [25].

Культура клітин рослин і тканин пропонує багато переваг, включаючи здатність підтримувати клітини в контрольованих умовах незалежно від зміни умов навколишнього середовища, просте вилучення біологічно активних сполук, ефективне виробництво багатьох цінних сполук, можливість легко масштабувати виробничий процес, і більш швидке розмноження високоякісної рослинної сировини, особливо у випадку повільнорослих рослин або тих, що дають невелику кількість насіння. Крім того, ця стратегія дозволяє отримати вільний від патогенів

матеріал з високим рівнем бажаних біологічно активних сполук. Зазвичай калус, культури клітинної суспензії, коріння або пагони найчастіше використовують для отримання вторинних метаболітів *in vitro*. У вибраних випадках необхідно індукувати диференціацію клітин у культурах, оскільки деякі метаболіти можуть синтезуватися лише в спеціалізованих рослинних тканинах або залозах (наприклад, ефірні олії) [25].

Минуло понад 100 років з часу першої ізоляції *Agrobacterium tumefaciens*, яка згодом виявилася природним генетичним інженером геному рослини. Цей фітопатоген, що зустрічається в природному середовищі, викликає неопластичні захворювання (гали) різних видів рослин. Бактерія має природну здатність заражати ділянки ран у рослин, внаслідок чого утворюється характерна пухлина шляхом перенесення Т-ДНК з бактеріальної клітини в геном рослини через систему секреції бактерій IV типу (T4SS). Перше використання *A. tumefaciens* для отримання трансгенних рослин було в 1983 році, що передбачило настання нової доби у біотехнології рослин. Оскільки механізм передачі генетичного матеріалу до рослинної клітини став краще зрозумілим, таке зараження агробактеріями стало найпопулярнішим методом генетичної модифікації рослин. Під час трансформації Т-ДНК експортується з бактеріальних клітин до ядра рослинної клітини, де вона інтегрується в хромосомну ДНК. Цікаво, що при зараженні рослинної тканини *Agrobacterium* здатний гальмувати природну захисну реакцію рослини [25].

Молекулярний механізм генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium* добре вивчений. Перенесення генів з бактеріальної клітини в клітину рослини базується на перенесенні Т-ДНК, яка входить до мегаплазміди Ti. Цей рухливий генетичний елемент відповідає за індукцію пухлини та біосинтез опінів у рослинній тканині. Він містить два регіони, пов'язані з бактеріально-рослинними взаємодіями: регіони *vir*, що містять гени вірулентності (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virF* і *virH*), що кодують білки, які активно беруть участь у перенесенні та інтеграції трансгену з геномом рослини та області, що містить гени, які кодують синтез опінів, які використовуються як джерело вуглецю та азоту бактеріями. Ця процедура дозволяє створити трансгенні рослини шляхом так званої стабільної

трансформації, при якій нова ознака успадковується подальшими поколіннями, або перехідною трансформацією, при якій генетичний матеріал зберігається в ядрі клітини без постійної інтеграції з генетичним матеріалом. Починаючи з перших успішних спроб генетичної трансформації рослин *Agrobacterium* на початку 1980-х років, система продемонструвала великий потенціал у трансформації дводольних та однодольних рослин [25].

Нові розробки в генній інженерії дозволили набагато більше контролювати перенесення чужорідних генів до рослинних клітин. Зараз в трансгенезі можна використовувати ряд векторів, які дозволяють вибирати різні маркерні, репортерні гени та рестрикційні сайти; вони також дозволяють велику кількість копій бінарних векторів, які вже широко використовуються в біотехнологічних лабораторіях бактеріальних клітин. Трансформація на основі агробактерій звичайно відбувається згідно з наступним процесом: спочатку видаляються природним чином діючі онкогени, щоб позбавити бактерію патогенності; такий штам часто називають «обеззброєним». Нові гени додаються до T-ДНК разом з відповідними селекційними або репортерними генами (рис. 1.4).

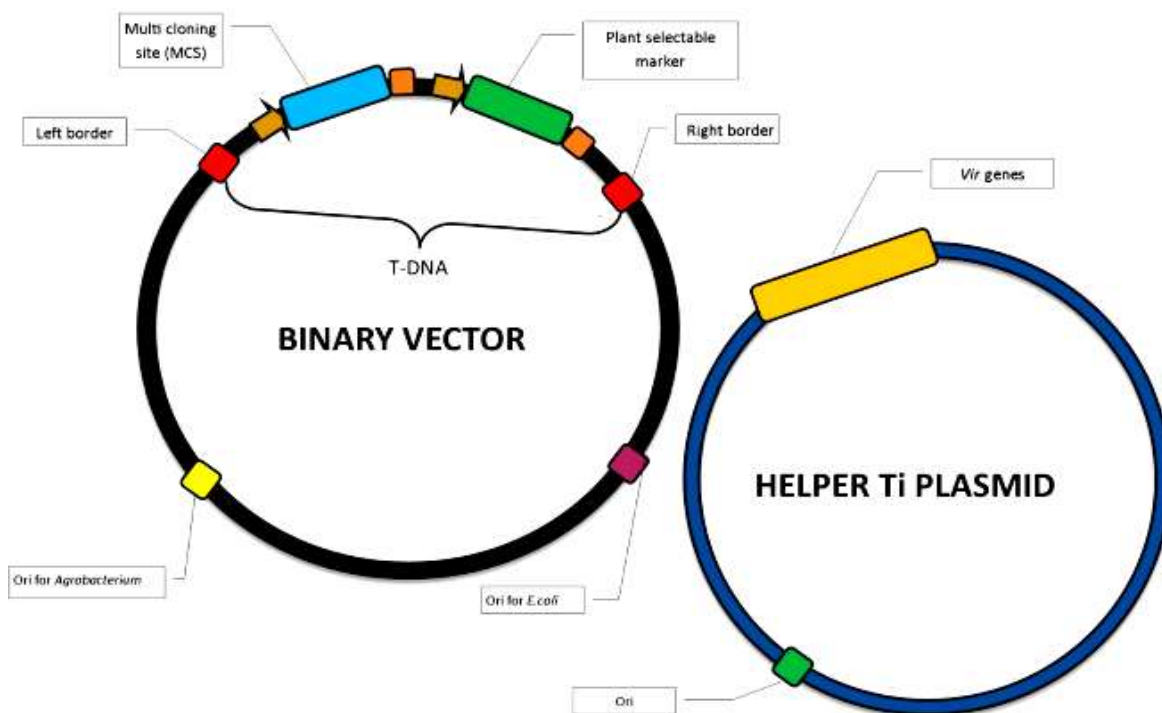


Рис. 1.4. Схематичне зображення бінарних векторів та плазміди-хелпера, що використовуються в генетичній трансформації рослин [25]



Через великі розміри плазміда Tі (індукує утворення пухлини) або Ri (індукує утворення «бородатих» коренів) не реплікується в кишковій паличці і, отже, виникає лише в бактеріальних клітинах у малій кількості копій, тим самим ускладнюючи її виділення; щоб полегшити маніпуляції, багато робіт проводяться за допомогою так званої бінарної векторної системи.

Ідея такого підходу полягає в розділенні вірусу та T-ДНК на два незалежних реплікони. T-ДНК розташована на бінарному векторі, що містить початок реплікації на *E.coli* та *Agrobacterium*. Цей вектор також містить ліву і праву межі, що позначають область T-ДНК, гени селекції для бактеріальних і рослинних клітин, і кількість специфічних сайтів, розпізнаних ензимами рестрикції, що дозволяють легко клонувати [25].

Використання агробактеріальної інформації необхідне для підвищення вмісту антиоксидантів у рослинній сировині. Органічні антиоксиданти синтезуються *de novo* рослинами, тому інженерні стратегії, спрямовані на підвищення доступності таких сполук, передбачають модифікацію ендogenous обміну рослин. Цього можна досягти, використовуючи різноманітні стратегії, наведені на рисунку 1.5 [24].

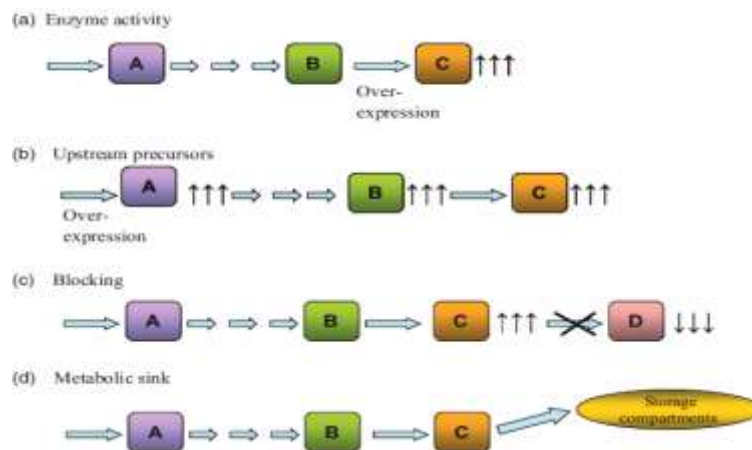


Рис. 1.5. Стратегії модифікації метаболізму рослин [24]

Найпопулярніша стратегія – надекспресія ферментів, позбавлених гальмування зворотного зв'язку (а). Однак можливо також надекспресувати одразу кілька ферментів для забезпечити адекватного потоку протягом усього метаболічного шляху (b), або експресувати регуляторні білки для координації

індукції ендogenous шляху без введення гетерологічних ферментів. Альтернативні стратегії досягнення накопичення конкретного бажаного метаболіту включають пригнічення конкурентного шляху або точки відгалуження для забезпечення потоку у відповідному напрямку (с) або створення/збільшення метаболічного «депо», що знижує гальмування зворотного зв'язку і дозволяє бажаному продукту стабільно накопичуватись (d) [24].

Наприклад, для надекспресії флавоноїдів, необхідно контролювати 4 показники: структурна надекспресія гена або його замовчування, регуляція транскрипції, контроль потоку та надекспресія транспортера [26]. Стосовно стратегій, використовують дві з вищерозглянутих. Перша – це введення різних структурних генів з інших рослин для створення рекомбінантного шляху біосинтезу. Наприклад, гени, що кодують стилбен-синтазу, халкон-синтазу, халкон-редуктазу, халкон-ізомеразу та синтазу флавона з різних джерел, вводились у трансгенні помідори, внаслідок чого накопичувалися стилбени (ресвератрол та піцеїд), дезоксихалькони (бутеїн та ізоліхірвітігенін), флаволи (лютеолін-7-глюкозид та лютеолін-аглікони) та флавоноли (кверцетинові глікозиди та глікозиди кемпферолу) у шкірці плодів. Загальна антиоксидантна здатність шкірки трансгенних плодів була втричі більше, ніж плодів дикого типу. Ці експерименти показують, що генна інженерія може не тільки підвищити рівень потенційно сприяючих здоров'ю антиоксидантних сполук у фруктах, але також може дати уявлення про основні метаболічні шляхи та дозволити виділення конкретних флавоноїдних сполук [24].

«Бородаті» корені виникають внаслідок зараження рослинної тканини бактерією *Agrobacterium rhizogenes*, що призводить до необмеженого росту організованої рослинної тканини. Здатність цих бактерій заражати рослини пояснюється наявністю великих плазмід, відомих як Ri-плазмід, що містять гени переносу *rol* (*rolA*, *rolB* і *rolC*), відповідальні за стабільну інтеграцію генетичного матеріалу в ДНК клітин господаря. З багатьох причин ця система отримання цінних біологічно активних сполук дуже зручна: «бородаті» корені швидко ростуть, не потребують регуляторів росту рослин, мають високу генетичну стійкість і здатні рости у великих масштабах. З огляду на всі переваги перед іншими типами систем

культивування рослин *in vitro*, вони здаються найкращою трансгенною альтернативою лікарським рослинам, що зустрічаються в природному середовищі. «Бородаті» корені виробляють відносно велику кількість біологічно активних сполук навіть без внесення нових генів. Крім того, здатність змінювати свої метаболічні шляхи за допомогою генної інженерії ставить їх на перший план в даний час використовуваних рослинними культурами *in vitro* [24].

Механізм дії *rolA* гену наступний: білок *rolA*, який виступає фактором транскрипції, долучається до метаболізму гіберелінів, оскільки зменшення їх вмісту було виявлено у *rolA*-трансгенних рослинах тютюну. Це могло б пояснити карликовість цих рослин, оскільки подібний фенотип був отриманий шляхом застосування інгібіторів синтезу гібереліну, хоча дикий фенотип не був повністю відновлений із застосуванням гіберелінів. Також повідомлялося, що ген *rolA* відповідає за зміни метаболізму поліаміну шляхом інгібування їх кон'югації. Крім того, вимірювання їх трансмембранної різниці потенціалів у відповідь на ауксини показало, що протопласти *rolA*-тютюну більш чутливі до ауксинів [27].

Механізм дії *rolB* гену, а також його головна функція, полягає в «аварійному» коренеутворенні у рослин. Адвентивне коріння, індуковане геном *rolB*, дає великі бічні корінці в умовах тканинної культури. Ці явища вказують на те, що білок *rolB* має вирішальний вплив на формування як бічних, так і придатних коренів. Отже, з'ясування функції білка *rolB* потрібне для розуміння коренеутворення в рослинах. Різниця в швидкості росту серед ліній «бородатих» коренів обумовлена різницею рівня експресії гена *rolB* [27].

Механізм дії *rolC* гену полягає в ефектах, які добре підтверджені у багатьох видів рослин: вони продукують подібні фенотипи у всіх аналізованих видів. Цей ген впливає на розмір та будову рослин, до них відносяться зменшення висоти, довжина міжвузлів, плодючість, верхівкове домінування та збільшення кількості квітів. Інші морфологічні ефекти – це зміни розміру, кольору та форми листя [27].

Механізм дії *rolD* гену – це стимуляція репродуктивного фазового переходу у рослинах. В томатах введення *rolD* має плейотропний ефект, впливаючи на продуктивність рослин, а також на захисну реакцію на патогени. Вважається, що

*rolD* чинить вплив на посилене цвітіння через зміни концентрації рослинних гормонів у трансформованих рослинах. У трансгенних рослин тютюну *rolD* викликає вражаючу завчасність у процесі цвітіння та збільшення кількості квітів, пов'язаних зі скупченням проліну або виснаженням орнітину [27].

Можливим є і створення трансгенних «бородатих» коренів. Біотрансформація культур «бородатих» коренів не тільки корисна для синтезу цінних сполук, що використовуються у фармацевтичній, харчовій та парфумерній галузях, але також може бути застосована до деградації та біоремедіації токсичних речовин, або знебарвлення барвників. Зростає інтерес до їх використання як біокаталізаторів для перетворення субстратів у продукти високої цінності. Видатним прикладом є пригнічення біосинтезу триптаміну за допомогою «приглушення» гена триптофан декарбоксилази (ТДК) у культурі «бородатих» коренів *S. roseus*, що усунуло виробництво монотерпенових індольних алкалоїдів і тим самим забезпечило «чистий» фон для біотрансформації. Експресія інших біосинтетичних генів не впливала на «приглушення» ТДК. Додавання аналога триптаміну до трансгенної культури призвело до отримання нових алкалоїдів, які природним чином не зустрічаються в *S. roseus*, що демонструє застосовність цього підходу для отримання нових фітохімікатів [28].

Для створення великомасштабного процесу культивування «бородатих» коренів необхідно використовувати біореактори, спеціально для цього призначені. Існує безліч типів реакторів, найчастіше використовують наступні [29]:

- рідкофазні (корені занурюються в середовище);
- реактори з мішалкою (stirred tank bioreactors): цей тип біореактора використовується для вирощування «бородатих» коренів, і включає мішалки, які полегшують перенесення маси до коріння, підтримуваного на дротяній сітці (рис. 1.6, А);
- аерліфтні реактори (airlift bioreactors): стиснене повітря використовується для аерації та перемішування і ґрунтується на принципі тяги трубки; вологе повітря пропускається через скляну сітку, яка функціонує як аератор; «бородаті» корені

потребують порівняно низької швидкості продувки кисню – близько 0,05-0,4 об. повітря/ об. рідини/хв. (рис. 1.6, B);

- реактори з барботажною колонкою (bubble column bioreactors): схожий на попередній реактор, але швидкість продування повітря потрібно поступово збільшувати з ростом «бородатих» коренів (рис. 1.6, C);

- реактори з конвективним потоком (convective flow bioreactors): реактор з мішалкою та колонка з культурою з'єднані трубками між собою (рис. 1.6, D);

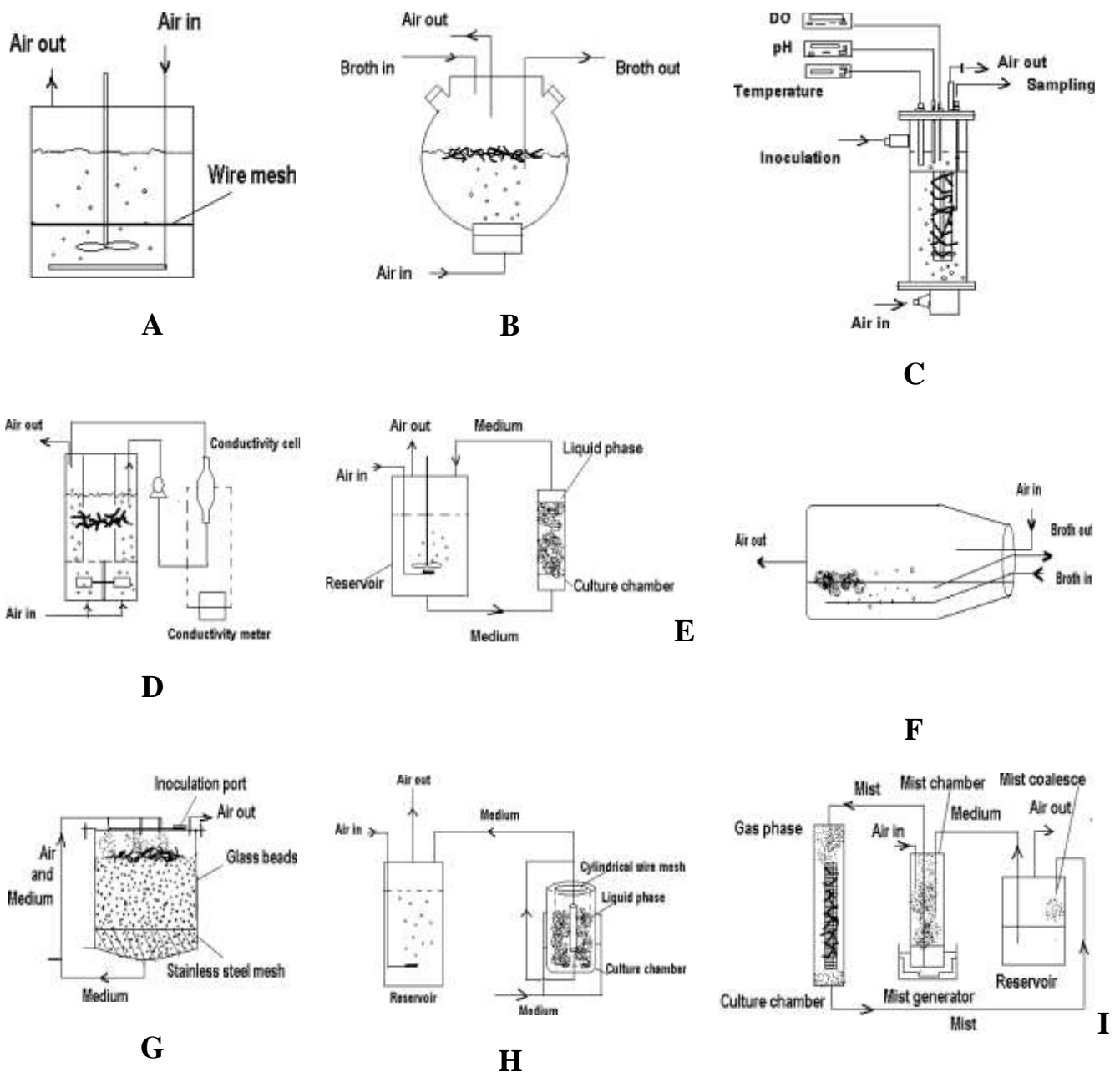


Рис. 1.6. Типи біореакторів для культивування «бородатих» коренів

- турбінні реактори (turbine blade bioreactors): аерліфтний реактор з мішалкою (рис. 1.6, E);
- роторні реактори (rotating drum bioreactors): складається з барабанного контейнера, встановленого на роликах для опори та обертання (рис. 1.6, F);
- реактор зі зрошувальним шаром (trickle bed reactor): середовище стікає крізь опору (скляні намистини) і рециркулює (рис. 1.6, G);
- реактор з радіальним потоком (radial flow reactors): середовище поступає до бокових портів циліндричного реактора та збирається крізь порт згори (рис. 1.6, H);
- реактор з поживним туманом (nutrient mist bioreactor): середовище знаходиться в окремій посудині з генератором туману (рис. 1.6, I).

#### **1.4. Дослідження антиоксидантної активності трансгенних рослин у світовій практиці**

У сучасних дослідженнях антиоксидантної активності рослин аналізують і здатність екстрактів до відновлення радикалів, і вміст сполук з антиоксидантними властивостями, і ферментативну систему рослин для захисту від оксидативного стресу, і чинники, які впливають на формування АФК у рослин (наведені у розділі 5 цієї роботи).

Трансформацію рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* проводили Kwak [30], Ji *et al.* [31], Liu *et al.* [32], Seong *et al.* [33], Ghimire *et al.* [34], Jia *et al.* [35], Kumar *et al.* [36], Jayaraj *et al.* [37], Zuk *et al.* [39], Park *et al.* [40], Chen *et al.* [41], Немаватхі *et al.* [42], Zhu *et al.* [43] та інші науковці. Результати проведених експериментів показали, що при трансформації рослин *Ipomoea batatas* Xushu вектором pGWB5 з *IbTC* та *GFP* збільшується вміст  $\alpha$ -токоферолу (листя:  $188.9 \pm 36.8 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$  – в 1.6 та 3.3 разів більше; корені:  $33.5 \pm 4.1 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$  – лише на 10% більше у 1 рослини) [30]. При трансформації *Nicotiana bentamiana* вектором pGWB5 з *IbHPPD*, *IbHPT*, *IbMPVQ* МТ, *IbTC* та *IbTMT*, взятих з *Ipomoea batatas* спостерігався збільшений вміст  $\alpha$ -токоферолу в листі у 1.81, 2.62, 2.70, 2.07 та 2.84 разів (порівняно з контролем) відповідно [31], вектором popW з *Ralstonia*

*solanacearum* – активність СОД виявилась у 1.5 разів вищою, а активність ПОД – у 2.6 разів вищою [32]. Але при трансформації вектором pMBP13 MsCOMT фенілпропаноїдний шлях метаболізму зсунувся до зменшення утворення фенольних сполук (вміст флавонолів зменшився на 20%) [33]. При проведенні трансформації *Perilla frutescens* вектором pYBI121, взятим з *Arabidopsis thaliana*, антиоксидантний потенціал екстрактів (екстрагенти: етил-ацетат, n-гексан, n-бутанол та 80 % метанол) зріс у 2.77, 1.99, 1.51, та 1.25 разів відповідно [34]; *Malus domestica* вектором MdNAC1 вміст вільних радикалів  $O_2^-$  зменшувався у межах 195 до 236  $nmol\ g^{-1}\ FW$ , порівняно з контролем (412  $nmol\ g^{-1}\ FW$ ) [35]. Після трансформації *Brassica juncea* вектором pYBI121 вміст MDA зріс у дикого типу в 1.9, 2.1, та 1.7 разів, а у трансгенної у 1.3, 1.3, та 1.2 разів при додаванні NaCl, CdCl<sub>2</sub>, та манітолу відповідно; накопичення H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> зросло у 3.4, 3.8, та 3.2 разів у дикорослої та у 2, 2.3, і 2 у трансгенної рослини; активність СОД, КАТ та APX у трансгенної рослини збільшилась у 1.4, 1.5, та 1.4 разів [36]. Після трансформації *Daucus carota* вектором pCAMBIA 1300, взятим з *Haematococcus pluvialis*, активність проти DPPH радикалу зросла на 160%, активність проти  $O_2^-$  зросла на 286% [37]; *Linum usitatissimum* вектором X04080 з *Petunia hybrida* – антиоксидантна активність (накопичення флавоноїдів) ліній W92 зросла у 5 разів [39]; *Oryza sativa* вектором pMJ101 – збільшення концентрації глутатіону у 1.57 разів, співвідношення GSH/GSSG – у 5.2 разів [40]; *Hordeum vulgare* вектором pCAMBIA13011 – вміст  $\delta$ -токотрієнолу у лініях OE-1 та OE-2 зріс у 2.66 та 2.44 разів відповідно,  $\beta$ -токотрієнолу – у 2.62 та 2.31 разів, але загальний вміст токоферолів зменшився на 14 % – 18 %, активність проти DPPH радикалу зросла на 17 % – 18 %, TEAX зріс до 33.84 та 33.46  $\mu mol/g$  [41]; *Solanum tuberosum* вектором pCAM2300 – вміст аскорбінової кислоти зріс на 141% [42]; *Arabidopsis thaliana* вектором pGEM-T з EsWAX1 (*E. salsugineum*) - вміст аскорбінової кислоти зріс на 23 % – 27 % [43].

Також Pierce *et al.* [38] трансформували рослини методом балістичної трансфекції. У *Glycine max* після трансформації вектором pCEN1B з crtB (*P. ananatis*) вміст  $\beta$ -каротину зріс до 741  $\mu g\ g^{-1}$ , але вміст кантаксантину та астаксантину зменшився (5  $\mu g$  – 52  $\mu g\ g^{-1}$  та 2  $\mu g$  – 7  $\mu g\ g^{-1}$  відповідно).

Дослідження культур «бородатих» коренів проводили Piatczak *et al.* [44], Bergier *et al.* [45], Matvieieva *et al.* [46], El-Esawi *et al.* [47], Gai *et al.* [48], Jiao *et al.* [49], Thiruvengadam *et al.* [50], Wang *et al.* [51], Zafari *et al.* [52], Tavassoli *et al.* [53]. У *Rehmannia glutinosa*, трансформованої за допомогою *A. rhizogenes* без внесення чужорідних генів, спостерігалось зменшення рівня TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) на 50% (екстракт пагонів) та 30% (екстракт коренів) [44]; у *Physalis ixocarpa* – збільшення ТАС (total antioxidant capacity) на 39% (екстракт коренів) та 64% (екстракт листя), збільшення загального вмісту фенолів (листя не трансформованих рослин > листя трансформованих рослин > коріння не трансформованих рослин > «бородаті корені»), збільшення вмісту аскорбату у листі [45]; у *Lactuca serriola* – збільшення загального вмісту фенолів (на 90.3%, 96.7%, 80.6%, 54.8% та 74.2% у лініях rolB1, rolB2, rolB3, rolB4 та rolB5 відповідно), загального вмісту флавоноїдів (на 69%, 76.2%, 64.3%, 38.1% та 52.4%), активності проти DPPH радикалу (50%, 42.1%, 39.5%, 31.6% та 36.8%) [47]; у *Isatis tinctoria* – збільшення загального вмісту флавоноїдів (438.10  $\mu\text{g/g}$  DW проти нетрансформованих – 341.73  $\mu\text{g/g}$  DW), зменшення значення  $\text{IC}_{50}$  (0.41 та 0.39  $\text{mg/DW}$  проти нетрансформованих – 0.56 та 0.48  $\text{mg/mL}$ ) [48]; у *Astragalus membranaceus* – збільшення загального вмісту ізофлавоноїдів (234.77  $\mu\text{g/g}$  DW проти контролю – 187.38  $\mu\text{g/g}$  DW), зменшення значення  $\text{IC}_{50}$  (1.40 та 1.73  $\text{mg/mL}$  проти контролю – 1.96 та 2.17  $\text{mg/mL}$ ) [49]; у *Polygonum multiflorum* – збільшення вмісту антрахінонів (емодин 211.32  $\mu\text{g/g}$  DW та парієтин 353.23  $\mu\text{g/g}$  DW, що у 3.7 та 3.5 разів більше, ніж у нестрасформованих), флавонолів (804.0  $\mu\text{g/g}$  проти 549.5  $\mu\text{g/g}$  у нетрансформованих), гідроксицинаматів (833.5  $\mu\text{g/g}$  проти 599.5  $\mu\text{g/g}$ ), але зменшення гідроксибензойної кислоти (1,355.0  $\mu\text{g/g}$  проти 1,481.5  $\mu\text{g/g}$ ) та рутину, збільшення загального вмісту фенолів (8,175.30  $\mu\text{g/g}$  GAE проти 5633.07  $\mu\text{g/g}$  GAE) та флавоноїдів (76.15  $\mu\text{g/g}$  QE проти (43.03  $\mu\text{g/g}$  QE), збільшення активності проти DPPH радикалу на 5% [50]; у *Echinacea purpurea* – збільшення вмісту полісахаридів та фенольних сполук (236.0 та 18.9  $\mu\text{g/g}$  DW відповідно; у нетрансформованих – 161.5 та 33.3  $\mu\text{g/g}$  DW відповідно) [51]; у *Prosopis farcta* – збільшення загального



вмісту флавоноїдів у 1.54 та 2.52 разів в порівнянні з нетрансформованими коренями на калусом, відповідно [52].

*Artemisia tilesii* хоч і давно використовується в лікувальних цілях, але її культури «бородатих» коренів *in vitro* є маловивченими. *Artemisia vulgaris* [46] була трансформована за допомогою *A. rhizogenes* без внесення чужорідних генів. Після трансформації збільшувався загальний вміст флавоноїдів (від  $13.3 \pm 1.0$  до  $73.1 \pm 10.6$  mg RE/g DW), зросла активність проти DPPH радикалу (від 0.23 до 0.36 мг сухого кореня трансформованих рослин необхідно проти  $1.09 \pm 0.05$  мг сухого кореня контролю), зменшилась активність СОД. Після трансформації *Althea officinalis* [53] також збільшувався загальний вміст флавоноїдів (до  $3.47 \pm 0.3$  mg/g) та фенолів (до  $1.57 \pm 0.1$  mg/g).

## 1.5. Висновки до розділу

Проаналізовано літературу стосовно використаних у дипломній роботі рослин, методів їх генетичної трансформації та здатності до зменшення оксидативного стресу. Для модифікації рослин найчастіше ампліфікують гени надсинтезу фенольних сполук того ж виду або змінюють сам шлях метаболізму задля більшого накопичення потрібної сполуки, або використовують вектори з інших видів (чи родів рослин), за допомогою *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*. Досліджують загальний вміст фенолів, флавоноїдів, активність ферментів та активність проти DPPH радикалів, а також вміст вітамінів С та Е і їх похідних.

Досліджено біологічноактивні сполуки рослин видів *Artemisia tilesii*, *A. vulgaris* та *Althaea officinalis*.

Розглянуто ферментативні (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіон-пероксидаза, аскорбат-пероксидаза, глутатіон-редуктаза) та неферментативні (аскорбінова кислота, токофероли, глутатіон, каротиноїди, фенольні сполуки, мелатонін) засоби захисту рослин від оксидативного стресу, методи підвищення антиоксидантного статусу рослин (створення трансгенних культур та «бородатих» коренів) та визначено їх переваги і недоліки.

Аналізуючи переваги різних типів культивування трансформованих рослин, можна сказати, що створення «бородатих» коренів є найперспективнішою технологією на сьогодні. Вони швидко ростуть, не потребують регуляторів росту, мають високу генетичну стійкість і здатні рости у великих масштабах (розглянуто методи збільшення масштабів виробництв при використанні різних типів біореакторів). І без внесення нових генів вони виробляють велику кількість біологічно активних сполук. А здатність змінювати свої метаболічні шляхи за допомогою генної інженерії надає нових можливостей для їх використання.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Характеристика рослинного матеріалу

Для проведення експериментальної частини дипломної роботи використовувались лінії «бородатих» коренів *Althaea officinalis* (12 ліній), *Artemisia tilesii* (10 ліній) та *A. vulgaris* (12 ліній), а також контрольні рослини, отримані з колекції лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом завідуючої лабораторії, д. б. н., Матвєєвої Н. А.

Зображення ліній та контрольних рослин наведені у додатках А – В. Для зручності їм було присвоєно порядкові номери. Лінії *A. officinalis*: 1 – А4/24.3.14 №9, 2 – А4/24.3.14 №8, 3 – А4/19.3.14 №10, 4 – А4/24.3.14 №3, 5 – 161/13.4.12 б/н, 6 – 161/13.4.12 №1, 7 – 161/13.4.12 №2, 8 – 161/13.11.12 №5, 9 – 161/13.4.12 №7, 10 – 124/13.12.13 №1, 11 – 124/24.3.14 №4, 12 – 124/24.3.14 №9, 13 – контроль. Лінії *A. tilesii*: 1 – А4 star/ 31.12.18 №1, 2 – А4 ЯИ 18.12+acet/ 31.12.18 №4, 3 – А4 star/ 31.12.18 №5, 4 – А4/31.12.18 №6, 5 – А4 ЯИ 18.12+acet/ 31.12.18 №6/1, 6 – 161/23.1.14 №2, 7 – 124/28.8.14 №2, 8 – 124/23.1.14 №5, 9 – 124/23.1.14 №10, 10 – 124/28.8.14 №5, 11 – контроль. Лінії *A. vulgaris*: 1 – А4/3.3.15 №1, 2 – А4/3.3.15 №2, 3 – А4/16.7.15 №1/2, 4 – 161/16.7.15 №1/3, 5 – 161/16.7.15 №2, 6 – 161/16.7.15 №2/2, 7 – 161/16.7.15 №2/3, 8 – 161/16.7.15 №2/4, 9 – 161/16.7.15 №1/2, 10 – 161/16.7.15 №1/2\_2, 11 – 124/16.7.15 №4, 12 – 124/16.7.15 №2, 13 – контроль.

Контрольні рослини були отримані шляхом поверхневої стерилізації насіння. За цією методикою насіння послідовно витримували 30 с в 70 % етанолі, 10 хв у 25 % розчині комерційного препарату «Полідез» та промивали тричі у стерильній дистильованій воді (5 хв, 5 хв, 20 хв). Оброблене таким чином насіння пророщували в чашках Петрі на агаризованому безгормональному середовищі 1/2 МС при 24 °С у термостатованому приміщенні.

Лінії «бородатих» коренів отримані в результаті проведення агробактеріальної трансформації за модифікованою методикою [54]. Всього 12 ліній отримані за допомогою агробактеріальної трансформації диким агропіновим штамом *A. rhizogenes* A4, 9 – штамом *A. rhizogenes* з цільовим геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (pCB124), 13 – штамом *A. rhizogenes* з цільовим геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини під контролем коренеспецифічного MII промотора цукрового буряку (pCB161) [54].

Як видно з рисунку 2.1 на прикладі *A. officinalis*, після трансформації отримані лінії одного і того ж виду значно відрізняються між собою та від контролю: змінюється не тільки структура коренів та їх галузистість, а навіть колір (у всіх трьох видах рослин у деяких лініях спостерігалася поява зеленого забарвлення, тобто здатність до фотосинтезу); також видно різке збільшення приросту біомаси з часом, підвищену швидкість росту та потовщення коренів.



Рис. 2.1. «Бородаті» корені *A. officinalis* (ліворуч та по центру), та контрольна рослина (праворуч)

Для проведення трансформації бактерії культивували на ротаційному шейкері (200 об/ хв) на середовищі LB [55] з карбеніциліном (100 мг/л) та рифампіцином (50 мг/л) протягом 24 годин при температурі 28°C. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (3000g, 10 хв), осад ресуспендували в розчині 10 мМ MgSO<sub>4</sub>. Суспензію бактерій використовували для генетичної трансформації досліджуваних рослин. Експланти (листя та міжвузля) з попередньо зробленими

насінками інкубували у бактеріальній суспензії протягом 30 хв, потім культивували в чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2 МС [56] від 6 до 8 діб. Ефективність трансформації оцінювалась за частотою утворення коренів із характерними для «бородатих» коренів ознаками (негативний геотропізм, значне галуження, ріст на середовищі без регуляторів росту). Частоту трансформації визначали як відношення кількості експлантів із коренями характерного фенотипу до загальної кількості використаних експлантів, виражене у відсотках [54].

Після формування коренів їх відділяли від експлантів та вирощували на агаризованому живильному середовищі 1/2 МС при температурі +24°C. На перших етапах культивування протягом 6 місяців після трансформації використовували середовище, яке містило антибіотик цефотаксим у концентрації 600 мг/л для повної елімінації агробактерій. Аналіз «бородатих» коренів здійснювався за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з праймерами, специфічними до гена *rolB* (5'-atgga tccsaattgctattccttccacga-3') та *virC*. Реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі у Tris-боратній буферній системі [54].

## 2.2. Визначення впливу генетичної трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин

Задля визначення впливу генетичної трансформації на антиоксидантну активність рослин, дослідження проводили у декілька етапів (рис. 2.2):

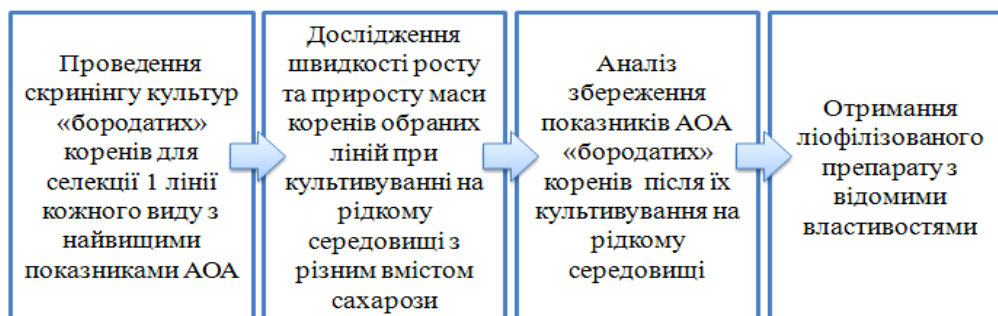


Рис. 2.2. Етапи виконання експериментальної частини дипломної роботи

### 2.2.1. Проведення скринінгу культур «бородатих» коренів

Визначення вмісту пероксиду водню. Вміст пероксиду водню визначали за методикою Kumar *et al.* [36] спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували по 0,25 г. Після чого наважку розтирали у фарфоровій ступці у 2,5 мл 0,1% трихлороцтової кислоти. Гомогенат переносили в пробірки («Eppendorf») об'ємом 2 мл і центрифугували при 12000g в мікроцентрифузі «EppendorfCentrifuge 5415 C» протягом 10 хв при кімнатній температурі. До 2 мл отриманого супернатанту додавали 0,25 мл 1 М буфера гідрофосфату калію (pH 7,0) та 0,5 мл 1 М йодиду калію. Після перемішування на вортексі проводили вимірювання оптичної густини суміші за  $\lambda=390$  нм у кварцевій кюветі 10×10 мм.

Для визначення вмісту  $H_2O_2$  необхідно побудувати калібрувальний графік. Приготували розчин  $H_2O_2$ : 57  $\mu$ л 30%  $H_2O_2$  на 100 мл дистильованої води. Отриманий розчин розвели у 10 разів: 1 мл розчину довели до 10 мл дистильованою водою. Результати представлені на рисунку 2.3.

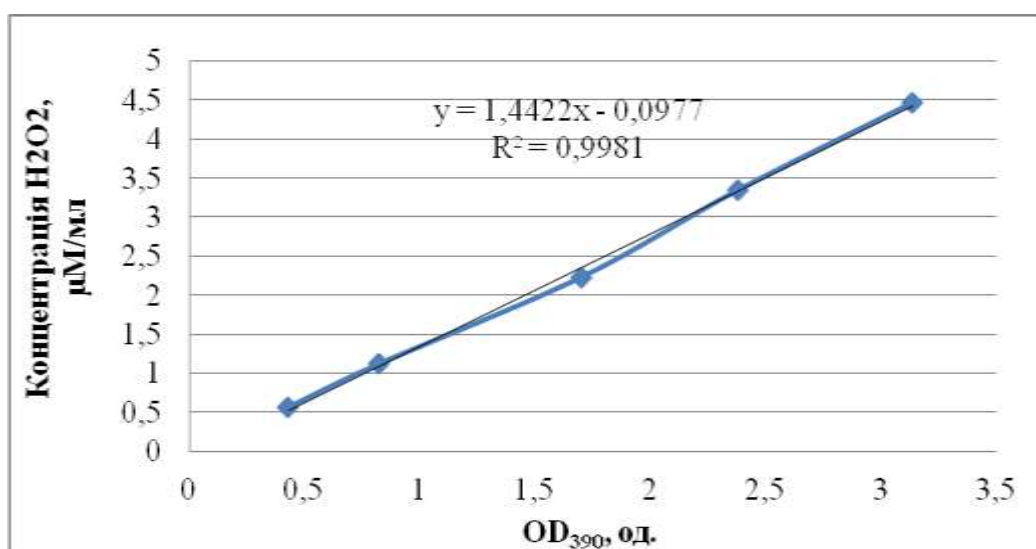


Рис. 2.3. Калібрувальний графік для визначення вмісту  $H_2O_2$  у екстрактах

За допомогою калібрувальної кривої отримали формулу для визначення вмісту пероксиду водню:



$$C = \frac{(1,4422 \cdot OD - 0,0977) \cdot V}{m}, \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}, \quad (2.1)$$

де  $OD$  – абсорбція, виміряна на спектрофотометрі;  $m$  – маса наважки коренів (0,25 г);  $V$  – об’єм реакційної суміші (2,5 мл).

Визначення активності каталази. Активність КАТ визначали за модифікованою методикою Аєбі [57] спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Реакція базується на зменшенні абсорбції реакційної суміші з часом при взаємодії каталази та пероксиду водню, що додають до буферу. Чим більша  $\Delta OD_{240}$ , тим активнішою є каталаза у екстракті. Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували по 0,5 г. Потім перетирали у фарфоровій ступці з 5 мл попередньо приготованого буферу. Для приготування 0,1 М фосфатного буферу з рН 7,0 додавали 61,0 мл 0,2 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  до 39,0 мл 0,2 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  і доводили бідистильованою водою до 200 мл. Гомогенат переносили в пробірки («Eppendorf») об’ємом 2 мл і центрифугували 20 хв в мікроцентрифузі «EppendorfCentrifuge 5415 C» при 15000 g. Супернатант переносили у чисті пробірки, поміщені у льодяну баню для запобігання втрати активності фермента під час процесу приготування усіх екстрактів. Активність каталази визначали при кімнатній температурі. Реакційне середовище містило 0,1 М фосфатний буфер рН 7,0 з перексидом водню 33 % (30 мкл на 50 мл буферу). В кювету об’ємом 3 мл наливали 2,8 мл реакційного середовища та 0,2 мл супернатанту для того, щоб запустити реакцію. Суміш швидко струшували та одразу вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при  $\lambda = 240$  нм. Вимір повторювали через 1 хвилину. В контрольну пробу замість супернатанту у реакційне середовище долили 0,2 мл буфера. Для підрахунку активності каталази використовували наступну формулу:

$$AK = \Delta OD_{240} \cdot V_c / (0,036 \cdot C_b \cdot V_e), \quad (2.2)$$

де  $AK$  – активність каталази, мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мг білка · хв;  $V_n$  – об’єм реакційного середовища (2,8 мл);  $0,036 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  – коефіцієнт екстинції  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $C_b$  – вміст білка в пробі, мг;  $V_n$  – об’єм екстракту (0,2 мл). Вміст розчиненого білка в супернатанті визначали за методом Бредфорда [58].

Визначення активності супероксиддисмутази. Активність СОД визначали за методикою *Beyer et al.* [59] спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Реакція базується на здатності рибофлавіну генерувати на світлі СОД-радикали, які окислюють нітросиній тетразолій (NBT) в присутності метіоніну до формазану, що має синє забарвлення, що зображено на рисунку 2.4. СОД, що знаходиться в супернатанті, каталізує утворення перекису водню, використовуючи рибофлавін як джерело супероксидрадикалу і метіонін як донор водню. При цьому не відбувається окислення NBT, і відповідно синє забарвлення не розвивається в тій чи іншій мірі. Тобто, чим вища активність СОД, тим меншою буде інтенсивність синього забарвлення реакційної суміші.

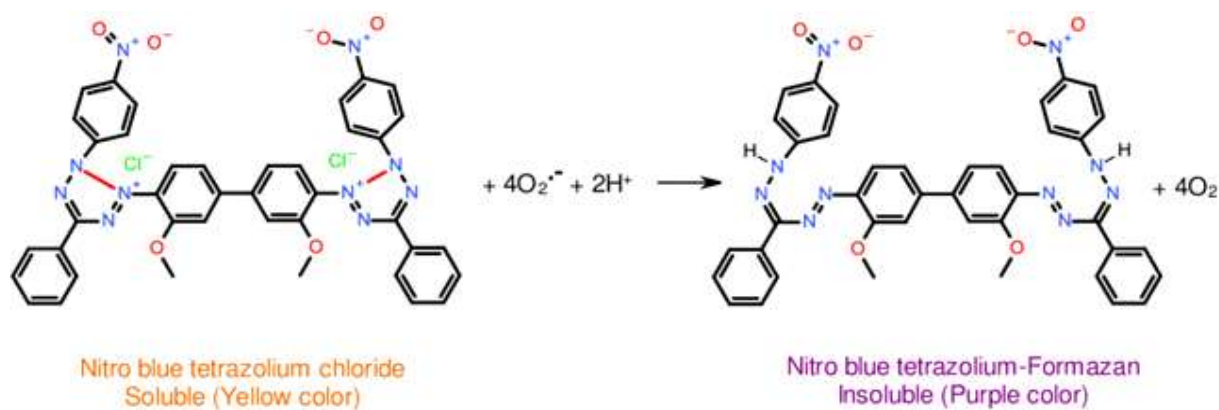


Рис. 2.4. Механізм реакції NBT з супероксидами (утворення NBT-формазану)

Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували по 0,1 г. Після чого наважку розтирали у фарфоровій ступці у 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (рН 8,0). Для приготування буфера готували 1М Tris-HCl: до 12,1 г Tris додавали 80 мл бідистильованої води, доводили до рН 8,0 концентрованою соляною кислотою і додавали бідистильовану воду до мітки 100 мл; після цього брали 5 мл 1М Tris-HCl і доводили до 100 мл бідистильованою водою. Отриманий гомогенат переносили в пробірки («Eppendorf») об'ємом 2 мл і центрифугували 15 хв в мікроцентрифузі «EppendorfCentrifuge 5415 C» при 13000 g. Супернатант переносили у чисті пробірки, поміщені у льодяну баню для запобігання втрати



активності фермента. Реакцію з нітросинім тетразолієм проводили у кюветах. Реакційна суміш містила 40 мкл супернатанту; 2160 мкл буферу 50 мМ Tris-HCl; 520 мкл 65 мМ метіоніну (194 мг метіоніну розчинили у бідистиляті і довести до 20 мл); 188 мкл 630 мкМ нітросинього тетразолію (11 мг нітросинього тетразолію розчинили у 20 мл H<sub>2</sub>O); 50 мкл 1 мМ рибофлавіну (7,5 мг рибофлавіну розчинили у 18 мл бідистиляту, додали 400 мкл 1М NaOH до повного розчинення рибофлавіну і довели об'єм до 20 мл бідистилятом). Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, три – освічували протягом 5 хв при 26 °С люмінісцентною лампою білого світла. Абсорбцію визначали при  $\lambda = 550$  нм. Нульова проба містила усі перелічені компоненти, за винятком рослинного екстракту (кількість буферу збільшували до 2200 мкл). Розрахунок проводили за наступною формулою:

$$\text{СОД (од. акт.)} = (\text{OD}_1/\text{OD}_2 - 1) \cdot \text{ФР}, \quad (2.3)$$

де  $\text{OD}_1$  – оптична густина нульової проби;  $\text{OD}_2$  – оптична густина експериментальної проби; ФР – фактор розведення (об'єм реакційної суміші, мл/об'єм взятого рослинного екстракту, мл).

Активність СОД визначали в од. акт./ мг білка (за Бредфордом) [58]:

$$\text{СОД (од. акт./ мг білка)} = \text{СОД}_1 / (C_6 \cdot V_e), \quad (2.4)$$

де  $\text{СОД}_1$  (од/мл сусп.) – активність СОД з формули 2.3,  $C_6$  – концентрація білка в екстракті, мг/мл;  $V_e$  – об'єм екстракту, мл (0,04).

Визначення вмісту флавоноїдів. Вміст флавоноїдів визначали за методикою Rekal and Puzynska [60] спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Реакція базується на здатності флавоноїдів при взаємодії з катіонами Алюмінію утворювати комплексні сполуки, забарвлені в жовтий колір, які потім вступають в реакцію з NaOH, що мають малинове забарвлення (рис. 2.5).

Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували по 0,3 г і розтирали у фарфоровій ступці в 3 мл 70% етанолу. Отриманий гомогенат переносили в пробірки («Eppendorf») об'ємом 2 мл і центрифугували в мікроцентрифузі «EppendorfCentrifuge 5415 C» при 15 000 g протягом 10 хв. Реакційна суміш у кюветі містила 0,25 мл супернатанту екстракту, 1 мл

бідистильованої води, 0,075 мл 5% розчину  $\text{NaNO}_2$ . Витримували 5 хвилин. Потім додавали 0,075 мл 10% розчину  $\text{AlCl}_3$  і витримували ще 5 хвилин. Після цього вносили 0,5 мл 1М  $\text{NaOH}$  та 0,6 мл бідистильованої води. Абсорбцію визначали при  $\lambda = 510$  нм. Розчин порівняння містив усі вище описані реактиви, лише супернатант був замінений на дистилат.

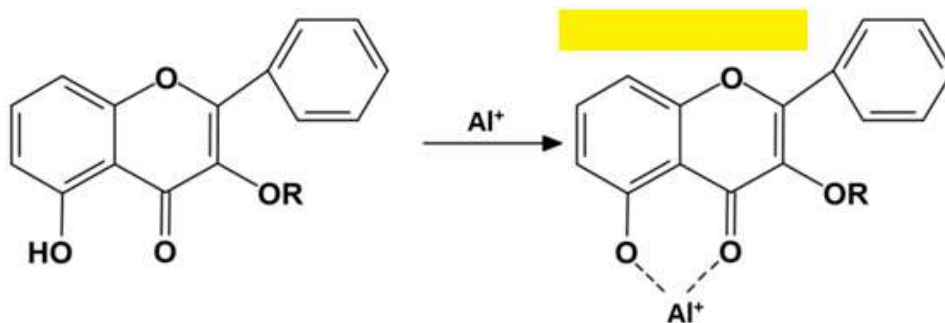


Рис. 2.5. Механізм формування комплексних сполук флавоноїдів з іонами Алюмінію в ході проведеної реакції

Для побудови калібрувальної кривої (рис. 2.6) зважували 10 мг рутину, розчиняли у 10,0 мл 70% етанолу. З отриманого розчину концентрацією 1мг/мл готували розведення з наступними концентраціями, мг/мл: 0,5; 0,25; 0,125; 0,062. Відбирали по 0,25 мл отриманих розчинів та проводили визначення флавоноїдів за тією ж методикою.

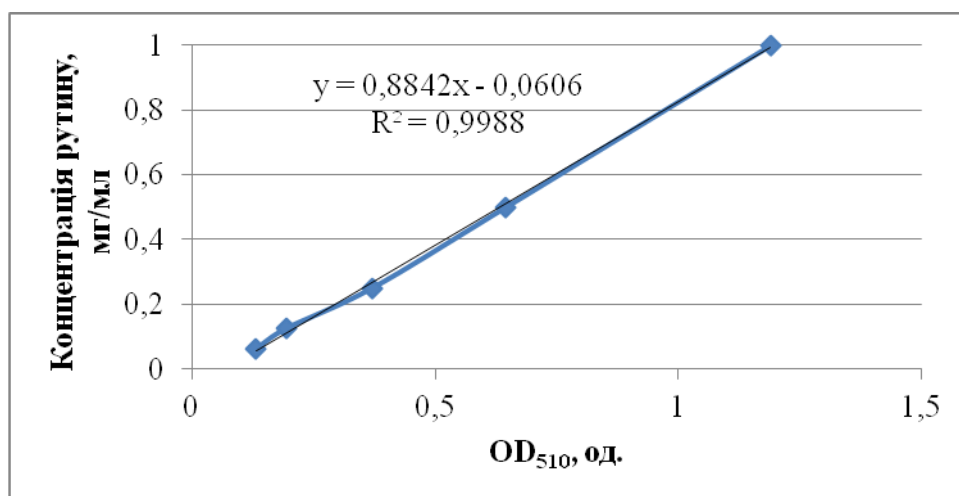


Рис. 2.6. Калібрувальний графік для визначення вмісту флавоноїдів у екстрактах «бородатих» коренів

За допомогою калібрувальної кривої (рис. 2.6) визначали міст флавоноїдів у 1,0 мл досліджуваного екстракту за формулою (2.5):

$$C = (0,8842 \cdot OD) - 0,0606, \quad (2.5)$$

де  $C$  – концентрація флавоноїдів у 1,0 мл досліджуваного екстракту, мг/мл;  $OD$  – оптична густина досліджуваного розчину, од.

Вміст флавоноїдів у 1,0 г вологого зразка проводили за формулою (2.6):

$$C_1 = \frac{C \cdot V}{m}, \quad (2.6)$$

Де  $C_1$  – концентрація флавоноїдів у 1,0 г вологої маси рослинного матеріалу, мг/г;  $C$  – концентрація флавоноїдів у спиртових екстрактах, мг/мл;  $V$  – об'єм спирту, що використовувався для приготування екстракту (3 мл);  $m$  – маса рослинного матеріалу, що використовувався для досліджень (0,3 г).

Активність проти DPPH радикалу. Антиоксидантну активність (АОА) спиртових екстрактів «бородатих» коренів досліджували за допомогою DPPH-тесту [61] спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Для порівняння реакцію проводили не тільки з екстрактами, а і з рутином (1мг/мл) та аскорбіною кислотою (1мг/мл). Реакція базується на здатності DPPH (1,1-дифеніл-2-пікрилгідразил) змінювати забарвлення з фіолетово-синього на жовте при відновленні (рис. 2.7). Тобто, чим вища АОА екстрактів, тим меншою буде інтенсивність фіолетово-синього кольору.

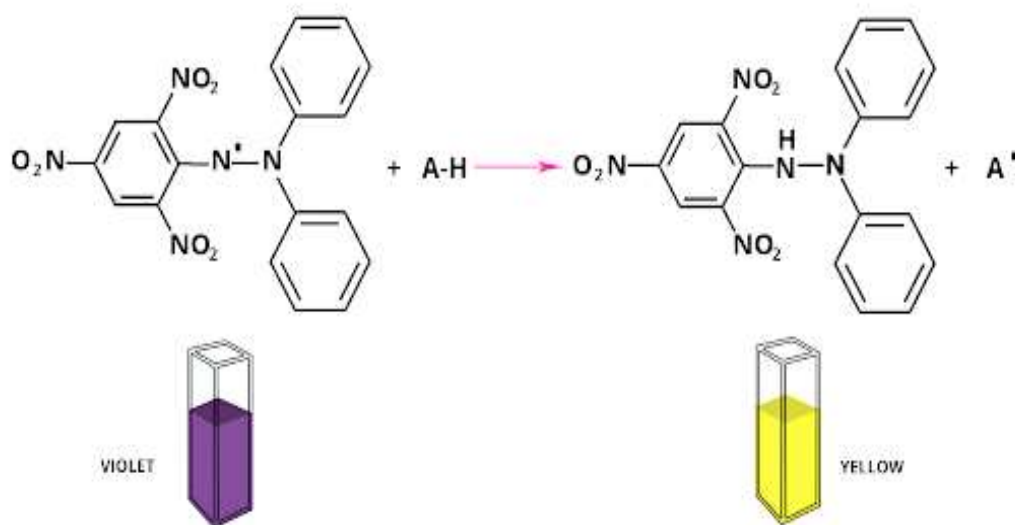


Рис. 2.7. Механізм реакції відновлення DPPH-радикалу

Для приготування розчину DPPH концентрацією 0,0001 М (0,0394 г/л) на торсійних вагах зважували 4 мг DPPH та розчиняли його у 100 мл 96 % етанолу.

Реакцію проводили у кюветах, з послідовним зменшенням концентрації спиртового екстракту коренів, рутину та аскорбінової кислоти: до 0,5 мл екстракту додавали 1,5 мл розчину DPPH; до 0,25 мл екстракту – 1,750 мл розчину DPPH і т.д. до найменшої концентрації екстракту у 0,008 мл та 1,992 мл розчину DPPH (тобто, загальний об'єм реакційної суміші був 2 мл у кожній кюветі). Для здійснення реакції кювети витримували протягом 20 хвилин у темному місці. Паралельно готували контрольну пробу – 2 мл розчину DPPH для того, щоб виміряти інтенсивність забарвлення самого розчину без екстрактів. Розчином порівняння був 96 % етанол. Після витримування усіх кювет протягом 20 хвилин визначали оптичну густину усіх розчинів при довжині хвилі  $\lambda=550$  нм.

Рівень антиоксидантної активності (АОА, %) розраховували за наступною формулою (2.7):

$$AOA = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \cdot 100, \quad (2.7)$$

де  $D_1$ –оптична густина контрольної проби, од;  $D_2$ – оптична густина реакційної суміші після проведення реакції з DPPH, од.

Після отримання відсоткових значень будували графіки відсоткового інгібування радикалу для кожного екстракту, за графіком знаходили рівняння (прямопропорційна залежність маси взятої наважки коренів до активності інгібування радикалу). Ефективна концентрація ( $EC_{50}$ ) була розрахована як концентрація екстракту (волога маса кореня), необхідна для вилучення 50 % DPPH у зразку, виражена у мг FW на мл 70 % етанолу.

Дослідження відновлювальної активності. Визначення активності екстрактів коренів до відновлювання іонів заліза  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$  визначали за методикою Zhao *et al.* [62] з модифікаціями [63] спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Реакція базується на зміні забарвлення реакційної суміші з ледь-помаранчевого на зелений колір. Чим інтенсивніше зелене забарвлення, тим вища відновлювальна активність екстрактів.

Реакційна суміш містила: 0,312 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 6,6); 0,312 мл 1% гексаціаноферату(III) калію та спиртовий екстракт коренів, доведений бідистилятом до загального об'єму екстракту у 0,25 мл. Для порівняння реакцію проводили не тільки з екстрактами, а і з рутином (1мг/мл) та аскорбіновою кислотою (1мг/мл). Реакцію проводили у кюветах, з послідовним зменшенням концентрації екстракту коренів, рутину та аскорбінової кислоти: до 0,125 мл екстракту додавали 0,125 мл бідистиляту; до 0,062 мл екстракту – 0,188 мл бідистиляту; до 0,031 мл екстракту – 0,219 мл бідистиляту; до 0,016 мл екстракту – 0,234 мл бідистиляту. Потім кювети інкубували на водяній бані при 50 °С протягом 30 хв. Після цього до реакційної суміші додавали 0,312 мл 10% трихлороцтової кислоти, 1,25 мл води бідистильованої та 0,25 мл 0,1% хлориду заліза(III). Розчин порівняння готували за такою ж методикою, але замість екстракту додавали 0,25 мл бідистиляту. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі  $\lambda=700$  нм. Аналогічно до визначення АОА, будували графіки зміни оптичної густини для кожного екстракту, рутину та аскорбінової кислоти. За графіками були визначені рівняння для підрахунку ефективних концентрацій ( $EC_{0,5}$ ), що відповідають кількості вологої маси коренів (мг FW / мл етанолу), необхідної для отримання  $OD = 0,5$ .

Загальний вміст білка. Визначення загального вмісту білка проводили за методом Бредфорда [58] спектрофотометрично за допомогою спектрофотометра «EppendorfBioPhotometerplus». Реакція базується на зміні інтенсивності синього забарвлення реакційної суміші з часом при взаємодії реактиву Бредфорда з білком, що міститься в екстрактах. Приготування реактиву Бредфорда: 100 мг Кумасі брильянтового синього G250 розчиняють у 50 мл 96 % етанолу, додають 100 мл 85 % фосфорної кислоти і доводять бідистильованою водою до 1 л.

Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували по 0,5 г. Потім перетирали у фарфоровій ступці з 5 мл 0,1 М фосфатного буферу з рН 7,0. Гомогенат переносили в пробірки («Eppendorf») об'ємом 2 мл і центрифугували 20 хв в мікроцентрифузі «EppendorfCentrifuge 5415 C» при 15000 g. Для проведення реакції до 0,1 мл супернатанту додавали 1 мл реактиву Бредфорда і

залишали пробірки на 30 хвилин для проходження реакції. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі  $\lambda=595$  нм.

Для побудови калібрувальної кривої (рис. 2.8) готували стоковий розчин BSA концентрацією 100 мкг / мл буферу. Далі брали 10 пробірок («Eppendorf») об'ємом 2 мл, і додавали в першу пробірку 100 мкл стокового розчину BSA без надлишку буфера, в другу – 90 мкл розчину BSA та 10 мкл буферу, в третю – 80 мкл розчину BSA та 20 мкл буферу і т.д. Розчином порівняння було 100 мкл буферу. До всіх пробірок додавали 1 мл реактиву Бредфорда. Оптичну густину вимірювали за тією ж методикою. Для визначення вмісту білка у пробах користувались рівнянням, отриманим з калібрувальної кривої.

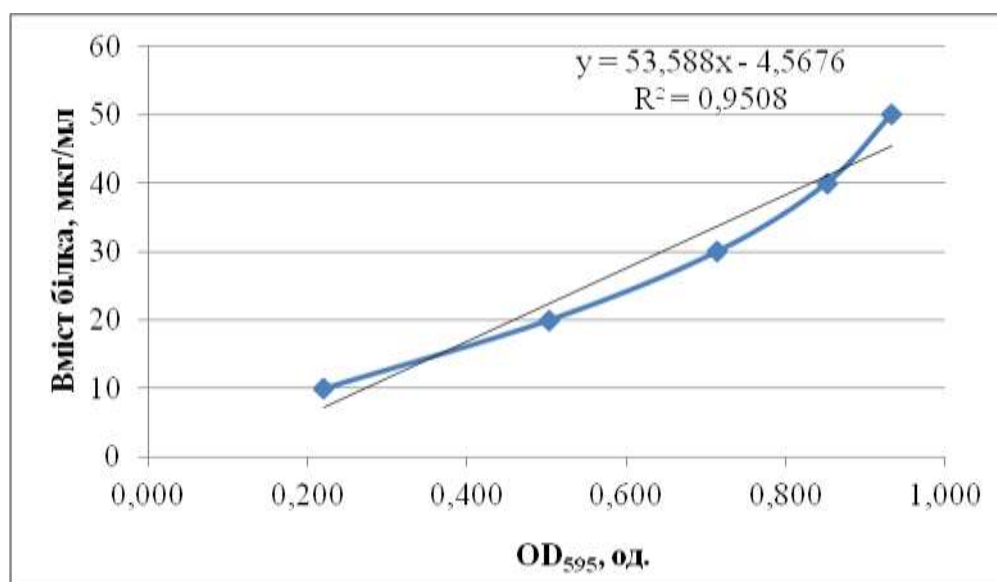


Рис. 2.8. Калібрувальний графік для визначення вмісту білка у екстрактах «бородатих» коренів

2.2.2. Визначення приросту маси коренів на рідкому середовищі з різним вмістом сахарози

Наступним етапом експериментальної частини роботи було культивування трьох ліній «бородатих» коренів (лінії кожного виду з найвищими показниками АОА) на рідке середовище 1/2 МС [56] з різними концентраціями сахарози: 20 г/л (стандартна концентрація), 30 г/л, 40 г/л (рис. 2.9) протягом 3 тижнів. Визначення приросту маси коренів з часом визначали методом прямого зважування на

лабораторних вагах моделі L 310 зі стандартним відхиленням  $\pm 0,005$  г. Для цього усі рослини попередньо просушували використовуючи фільтрувальний папір.

Після культивування готували спиртові екстракти коренів (у 70 % етанолі) та проводили аналіз на вміст флавоноїдів, відновлювальну активність та антиоксидантну активність за допомогою DPPH-тесту, описаних вище.

Дослід проводили у трьох повторностях, в стерильних умовах. Об'єм середовища у кожній колбі – 100 мл. Початкові маси коренів становили до 0,5 г.



Рис. 2.9. Культура коренів *A. tilesii* на рідкому середовищі МС та вмістом сахарози 20 г/л до початку культивування

## 2.5. Висновки до розділу

Наведено методику отримання трансформованих рослин – культур «бородатих» коренів *Artemisia tilesii*, *A. vulgaris* та *Althaea officinalis*, які слугували вихідним матеріалом для проведення експериментальної частини роботи. Описано методи визначення вмісту перекису водню, флавоноїдів та білків у рослинах, а також дослідження їх ферментативної системи (СОД і КАТ) і аналізу їх екстрактів на антиоксидантну та відновлювальну активність. Охарактеризовано методику культивування коренів на рідких середовищах МС з різним вмістом сахарози.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Аналіз впливу генетичної трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин

При дослідженні впливу *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації на функціонування системи антиоксидантного захисту у рослинах *Artemisia tilesii*, *A. vulgaris* та *Althaea officinalis*, корені трансформованих рослин порівнювали з контрольними культурами (нетрансформованими). Також порівнювали лінії кожного виду між собою, адже 12 ліній отримані за допомогою агробактеріальної трансформації диким штамом *A. rhizogenes* A4, 9 – штамом *A. rhizogenes* з цільовим геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (pCB124), 13 – штамом *A. rhizogenes* з цільовим геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини під контролем коренеспецифічного MII промотора цукрового буряку (pCB161) [54].

**Вміст пероксиду водню.** Досліджувані рослини значно відрізнялися за вмістом водню як в контрольних зразках, так і після проведення трансформації. Вміст  $H_2O_2$  коливався в межах від  $0,595 \pm 0,186$  мкмоль/ г ВМ (*A. vulgaris*, лінія №10) до  $32,107 \pm 0,124$  мкмоль/ г ВМ (*A. tilesii*, лінія №7) (рис. 3.1 – 3.3).

Найвищим вміст  $H_2O_2$  у *A. officinalis* був у лінії №11 ( $19,077 \pm 0,279$  мкмоль/ г ВМ), що перевищував вміст у контрольних рослинах на 23,8 %; у *A. tilesii* – лінія №7 ( $32,10 \pm 0,12$  мкмоль/ г ВМ), що у 5 разів більше, ніж у контролі; у *A. vulgaris* – лінія №7 ( $30,77 \pm 1,67$  мкмоль/ г ВМ), що у 3,4 разів більше, ніж у контролі. Відмінності у рівні накопичення  $H_2O_2$  абсолютно не корелювали зі штамом бактерій, які використовувались для трансформації: не залежно від штаму *A. rhizogenes*, вміст пероксиду водню між лініями «бородатих» коренів одного виду відрізнявся у 24 рази у *A. officinalis* (лінії № 10 та 11), у 5,6 разів у *A. tilesii* (лінії № 1 та 7) та у 51 раз у *A. vulgaris* (лінії № 7 та 10). Контролі відрізнялись між собою у 2–3 рази.



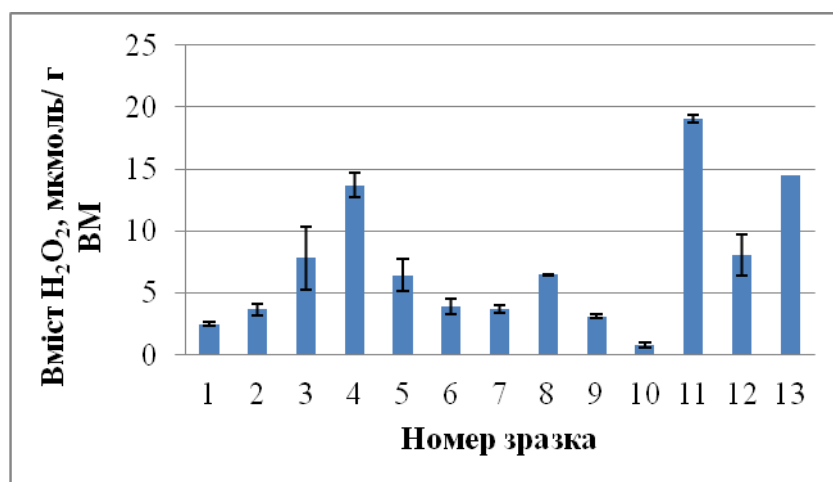


Рис. 3.1. Вміст пероксиду водню у зразках «бородатих» коренів *A. officinalis*

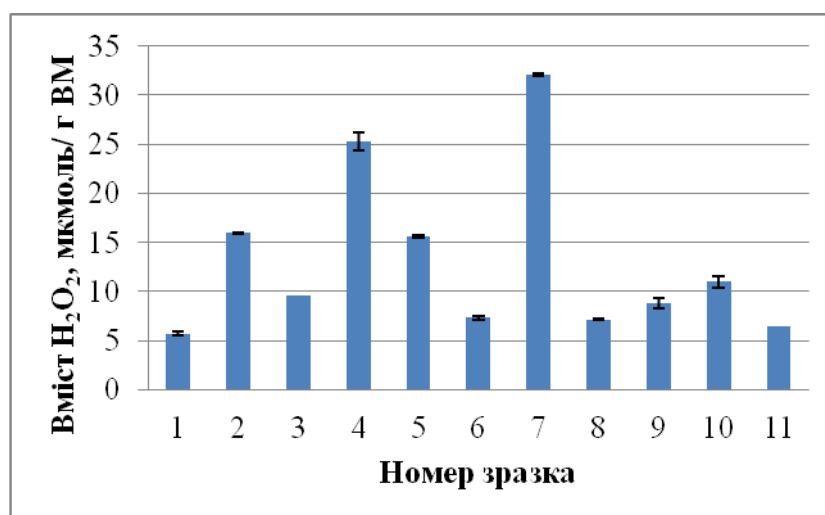


Рис. 3.2. Вміст пероксиду водню у зразках «бородатих» коренів *A. tilesii*

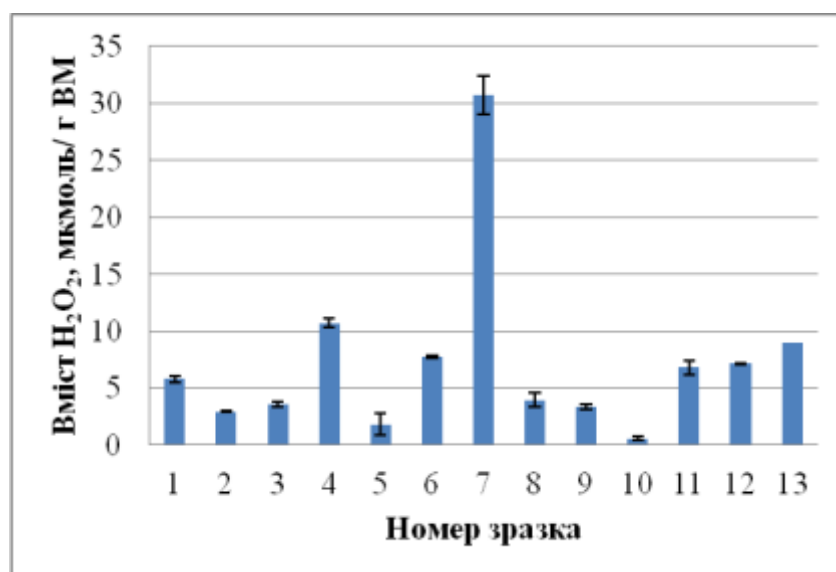
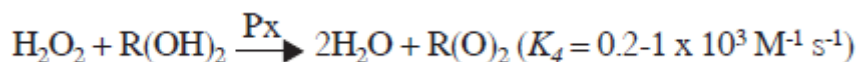
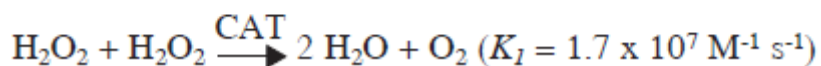
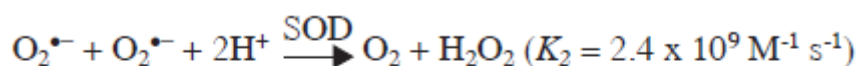


Рис. 3.2. Вміст пероксиду водню у зразках «бородатих» коренів *A. vulgaris*

**Активність каталази.** За активністю каталази у екстрактах були також значні відмінності і між різними видами, і між лініями одного виду, і між лініями трансформованих рослин та контрольними культурами. Активність каталази серед ліній «бородатих» коренів коливалася в межах від  $0,042 \pm 0,035$  мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мкг білка\*хв (*A. officinalis*, лінія №1) до  $10,4 \pm 1,12$  мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мкг білка\*хв (*A. vulgaris*, лінія №8) (рис. 3.4 – 3.6).

Найвищою активність каталази у *A. officinalis* була у лінії №9 ( $1,8 \pm 0,2$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /мкг білка\*хв), що перевищувала активність КАТ у контрольних рослинах у 4,4 рази; у *A. tilesii* – лінія №10 ( $7,84 \pm 2,83$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /мкг білка\*хв), що було у 2 рази меншою, ніж у контролі; у *A. vulgaris* – лінія №8 ( $10,4 \pm 1,12$  мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мкг білка\*хв), що всього на 8 % більше, ніж у контролі. Знову, як і в результатах аналізу вмісту пероксиду водню, відмінності у активності КАТ не корелювали зі штамом бактерій, які використовувались для трансформації: активність каталази у межах одного виду між лініями «бородатих» коренів відрізнялася у 44 рази у *A. officinalis* (лінії № 1 та 10), у 5,2 разів у *A. tilesii* (лінії № 6 та 10) та у 7,8 разів у *A. vulgaris* (лінії № 1 та 8).

Необхідно також проаналізувати кореляцію між вмістом пероксиду водню у зразках та активністю каталази, адже пероксид водню утворюється в результаті реакції за участю супероксиддисмутази, і в свою чергу є вихідною речовиною для реакції за участю каталази:



Таким чином, чим більший вміст пероксиду водню у зразку, тим більшою має бути активність каталази. І дійсно, порівнюючи рисунки 3.1 та 3.4, 3.2 та 3.5, 3.3 та 3.6, можна побачити відносну кореляцію майже в усіх лініях. Найбільше кореляцію видно на прикладі *A. officinalis*, проте активність КАТ у всіх ліній цього виду і навіть у контрольної рослини була приблизно в 20 разів меншою, ніж у лініях *Artemisia*.

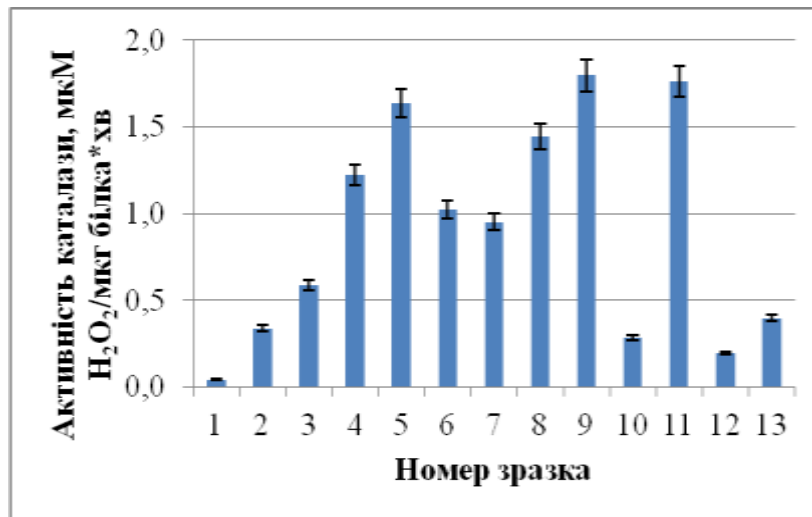


Рис. 3.4. Активність каталази у зразках «бородатих» коренів *A. officinalis*

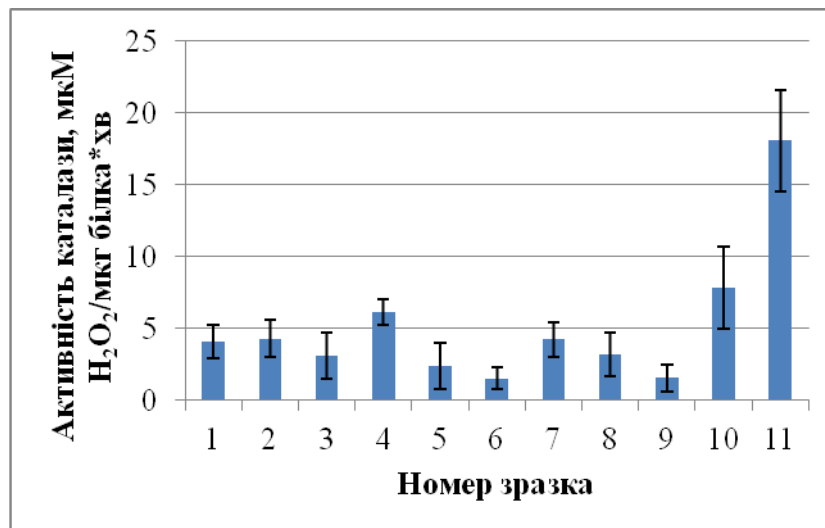


Рис. 3.5. Активність каталази у зразках «бородатих» коренів *A. tilesii*

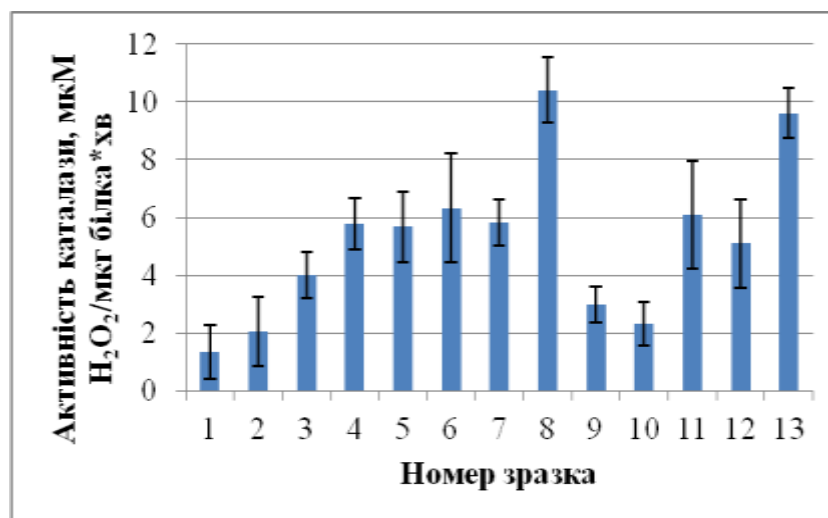


Рис. 3.6. Активність каталази у зразках «бородатих» коренів *A. vulgaris*

**Активність супероксиддисмутази.** Активність СОД також значно відрізнялась і між різними видами, і між лініями одного виду, і між лініями трансформованих рослин та контрольними культурами. Активність СОД серед ліній «бородатих» коренів коливалася в межах від  $1,95 \pm 0,47$  од./мкг білка (*A. officinalis*, лінія №3) до  $52,84 \pm 12,6$  од./мкг білка (*A. vulgaris*, лінія №12) (рис. 3.8 – 3.10). Цікавим є те, що навіть зовнішньо приготовані екстракти коренів у Tris-HCl буфері значно відрізнялись між собою (рис. 3.7), що можна пояснити різним вмістом поліфенольних сполук.



Рис. 3.7. Екстракти «бородатих» коренів у буфері Tris-HCl: 1 – *A. officinalis* трансформована; 2 – *A. officinalis* контроль; 3 – *A. tiliaceae* трансформована; 4 – *A. tiliaceae* контроль; 5 – *A. vulgaris* трансформована; 6 – *A. vulgaris* контроль

Найвищою активність СОД у *A. officinalis* була у лінії №11 ( $45,76 \pm 13,76$  од./мкг білка), що перевищувала активність КАТ у контрольних рослинах у 2 рази; у *A. tiliaceae* – лінія №4 ( $27,19 \pm 13,17$  од./мкг білка), активність СОД якої була така ж, як і у контрольній рослині; у *A. vulgaris* – лінія №12 ( $52,84 \pm 12,6$  од./мкг білка), в якої активність СОД перевищувала контроль майже у 2 рази. Відмінності у активності СОД також не корелювали зі штамом бактерій, які використовувались для трансформації: активність СОД у межах одного виду між лініями «бородатих» коренів відрізнялася у 23,5 рази у *A. officinalis* (лінії № 3 та 11), у 6,2 разів у *A. tiliaceae* (лінії № 4 та 9) та у 11,5 разів у *A. vulgaris* (лінії № 10 та 12). Цікаво, що активність СОД усіх контрольних рослин була майже однаковою (від 23 до 30 од./мкг білка).

Необхідно також проаналізувати кореляцію між вмістом пероксиду водню у зразках та активністю СОД, адже пероксид водню – продукт реакції за участю СОД,

і тому накопичення  $H_2O_2$  призводить до інгібування її активності. Порівнюючи рисунки 3.1 та 3.8, 3.2 та 3.9, 3.3 та 3.10, кореляція є лише у половини трансформованих ліній (найбільше кореляцію видно на прикладі *A. officinalis*). Це можна пояснити тим, що надлишок  $H_2O_2$  вступає в реакцію з пероксидазами, тому за високої активності пероксидази інгібування СОД відбуватись не буде.

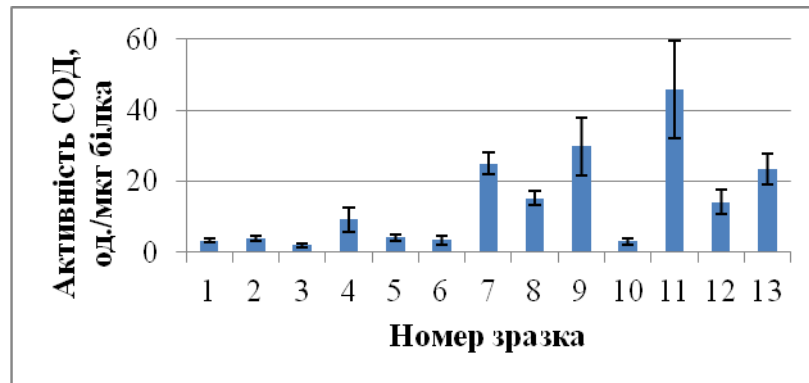


Рис. 3.8. Активність СОД у зразках «бородатих» коренів *A. officinalis*

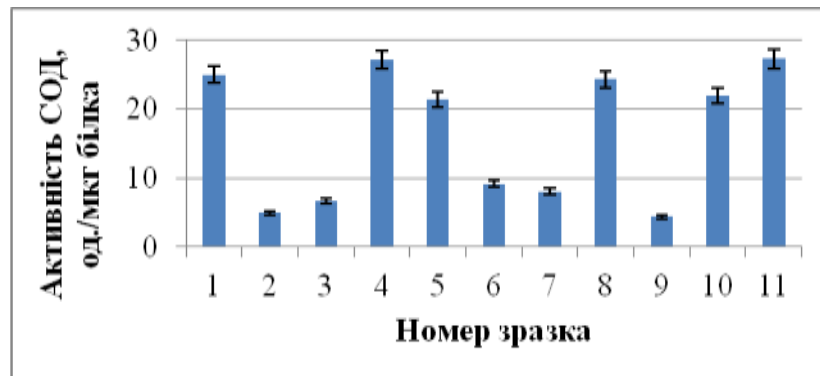


Рис. 3.9. Активність СОД у зразках «бородатих» коренів *A. tilesii*

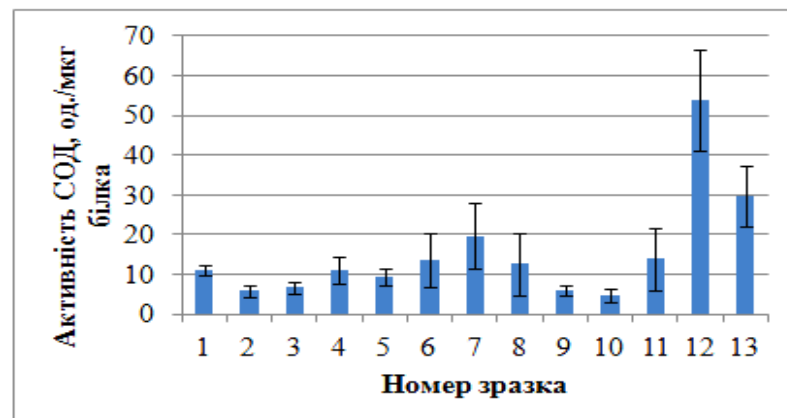


Рис. 3.10. Активність СОД у зразках «бородатих» коренів *A. vulgaris*

**Вміст флавоноїдів.** Досліджувані рослини значно відрізнялися за вмістом флавоноїдів як в контрольних зразках, так і після проведення трансформації. Вміст флавоноїдів коливався в межах від  $0,158 \pm 0,038$  мг RE/ г ВМ (*A. officinalis*, лінія №2) до  $10,066 \pm 0,477$  мг RE/ г ВМ (*A. vulgaris*, лінія №7) (рис. 3.11 – 3.13).



Рис. 3.11. Вміст флавоноїдів у зразках «бородатих» коренів *A. officinalis*

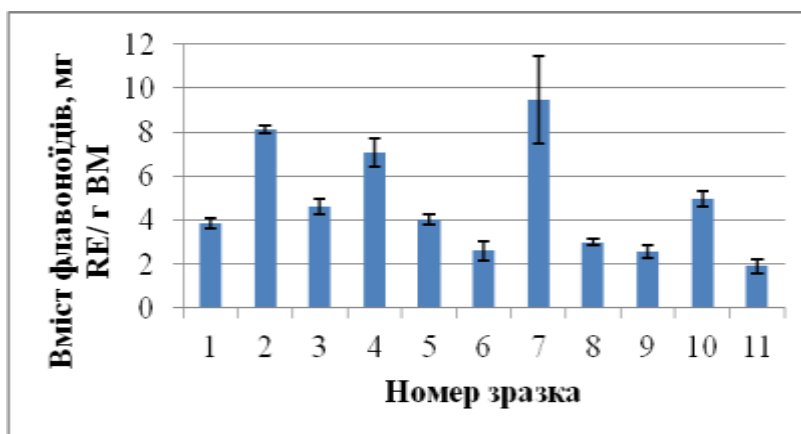


Рис. 3.12. Вміст флавоноїдів у зразках «бородатих» коренів *A. tylesii*

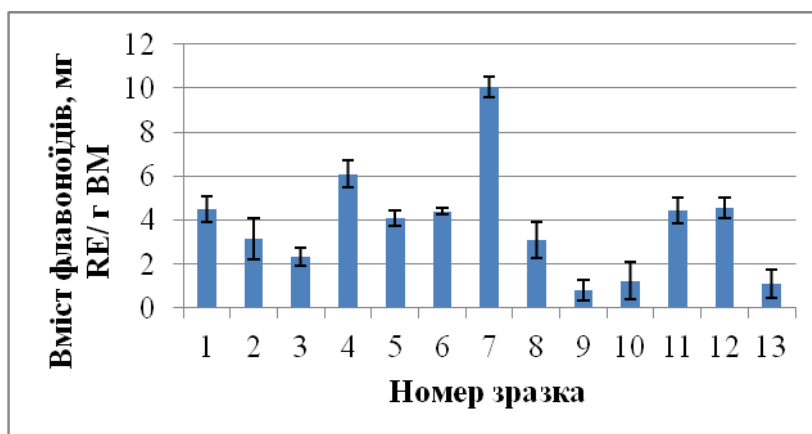


Рис. 3.13. Вміст флавоноїдів у зразках «бородатих» коренів *A. vulgaris*

Найвищим вміст флавоноїдів у *A. officinalis* був у лінії №11 ( $4,416 \pm 0,3301$  мг RE/ г ВМ), що перевищував вміст у контрольних рослинах у 9,3 рази; у *A. tilesii* – лінія №7 ( $9,469 \pm 1,971$  мг RE/ г ВМ), що у 5 разів більше, ніж у контролі; у *A. vulgaris* – лінія №7 ( $10,066 \pm 0,477$  мг RE/ г ВМ), що у 9,1 разів більше, ніж у контролі.

Відмінності у рівні накопичення флавоноїдів також не корелювали зі штамом бактерій, які використовувались для трансформації: вміст флавоноїдів в межах «бородатих» коренів одного виду відрізнявся у 28 разів у *A. officinalis* (лінії № 2 та 7), у 3,62 разів у *A. tilesii* (лінії № 6 та 7) та у 12,4 разів у *A. vulgaris* (лінії № 7 та 9). Вміст флавоноїдів у контролів не перевищував 2 мг RE/ г ВМ.

**Антиоксидантна активність.** Антиоксидантна активність, як і всі інші параметри, відрізнялась і між різними видами, і між лініями одного виду, і між лініями трансформованих рослин та контрольними культурами. Чим менша  $EC_{50}$ , тим вищою є антиоксидантна активність. АOA ( $EC_{50}$ ) серед ліній «бородатих» коренів коливалася в межах від 2,02 мг ВМ (*A. vulgaris*, лінія №7) до 27,023 мг ВМ (*A. officinalis*, лінія №2) (рис. 3.14 – 3.16).

Найвищою АOA у *A. officinalis* була у лінії №11 (7,23 мг ВМ), що перевищувала АOA у контрольних рослинах у 3,8 рази; у *A. tilesii* – лінія №4 (3,21 мг ВМ), що перевищувала АOA у контрольних рослинах у 2,7 рази; у *A. vulgaris* – лінія №7 (2,02 мг ВМ), в якій АOA перевищувала контроль у 8 разів. Відмінності у АOA також не корелювали зі штамом бактерій, які використовувались для трансформації: у межах одного виду між лініями «бородатих» коренів АOA відрізнялася у 3,7 разів у *A. officinalis* (лінії № 2 та 11), у 3,1 рази у *A. tilesii* (лінії № 4 та 8) та у 7,27 разів у *A. vulgaris* (лінії № 7 та 9). АOA у контрольних рослинах значно відрізнялася (від 8,59 до 27,3 мг ВМ), але майже в усіх лініях (крім 1) була вищою, ніж у трансформованих рослин.

Необхідно також проаналізувати кореляцію між вмістом флавоноїдів у зразках та антиоксидантною активністю, адже флавоноїди – це поліфенольні сполуки, які є неферментативними (це вторинні метаболіти) антиоксидантами. Порівнюючи рисунки 3.11 та 3.14, 3.12 та 3.15, 3.13 та 3.16, кореляція однозначна є: чим більший

вміст флавоноїдів, там вища антиоксидантна активність (менша  $EC_{50}$ ). Кореляція спостерігається в усіх видів у більшості ліній – особливо у тих зразках, де показники обох параметрів найвищі.

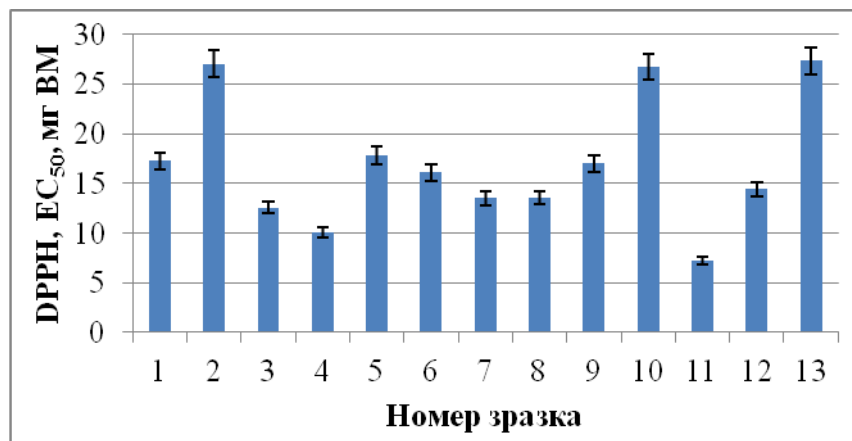


Рис. 3.14. Антиоксидантна активність зразків «бородатих» коренів *A. officinalis*

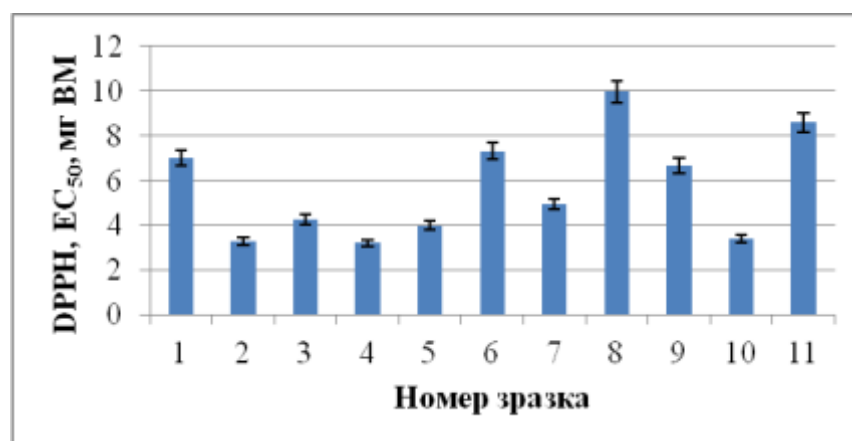


Рис. 3.15. Антиоксидантна активність зразків «бородатих» коренів *A. tilesii*

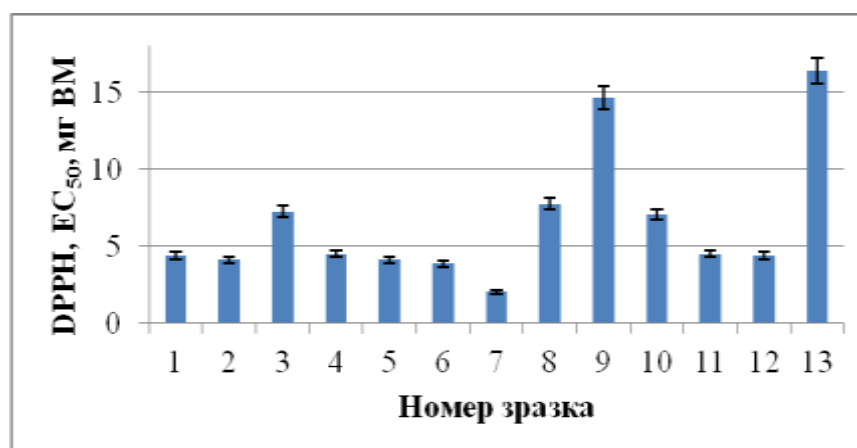


Рис. 3.16. Антиоксидантна активність зразків «бородатих» коренів *A. vulgaris*



**Відновлювальна активність.** Відновлювальна активність, як і АОА, відрізнялась і між різними видами, і між лініями одного виду, і між лініями трансформованих рослин та контрольними культурами. Параметром відновлювальної активності є  $EC_{0,5}$  – це кількість рослинного матеріалу (волога маса коренів), необхідна для відновлення такої кількості іонів заліза  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$ , щоб досягти  $OD = 0,5$ . Відповідно, чим менша  $EC_{0,5}$ , тим вищою є відновлювальна активність екстракту рослини. Відновлювальна активність ( $EC_{0,5}$ ) серед ліній «бородатих» коренів коливалася в межах від 1,39 мг ВМ (*A. vulgaris*, лінія №7) до 29,24 мг ВМ (*A. officinalis*, лінія №2) (рис. 3.17 – 3.19).

Найвищою відновлювальна активність у *A. officinalis* була у лінії №11 (3,37 мг ВМ), що перевищувала контроль у 2 рази; у *A. tilesii* – лінія №7 (1,42 мг ВМ), що перевищувала ВА у контрольних рослинах також у 2 рази; у *A. vulgaris* – лінія №7 (1,39 мг ВМ), в якій ВА перевищувала контроль у 4,5 разів. Відмінності у ВА також не корелювали зі штамом *A. rhizogenes*, які використовувались для трансформації: у межах одного виду між лініями «бородатих» коренів ВА відрізнялася у 8,7 разів у *A. officinalis* (лінії № 2 та 11), у 3,3 рази у *A. tilesii* (лінії № 6 та 7) та у 7,73 разів у *A. vulgaris* (лінії № 7 та 9). ВА у контрольних рослинах відрізнялася між собою (від 3 до 7 мг ВМ), і, на відміну від АОА, була вищою, ніж у 15 ліній культур коренів.

Необхідно проаналізувати кореляцію між вмістом флавоноїдів у зразках та відновлювальною активністю, адже флавоноїдам, як антиоксидантам, властива здатність до відновлення іонів металів. Порівнюючи рисунки 3.11 та 3.17, 3.12 та 3.18, 3.13 та 3.19, кореляція спостерігається так само, як і у АОА: чим більший вміст флавоноїдів, там вища відновлювальна активність (менша  $EC_{0,5}$ ). Кореляція спостерігається в усіх видів – особливо у тих зразках, де показники обох параметрів найвищі. Порівнюючи антиоксидантну активність (рис. 3.14 – 3.16) та відновлювальну активність (рис. 3.17 – 3.19) можна дійти висновку, що ці два параметри повністю корелюють в усіх лініях «бородатих» коренів і *A. officinalis*, і *A. tilesii*, і *A. vulgaris*: високі значення АОА відповідають високим значенням ВА. Такий результат обумовлений тим, що неферментативні антиоксиданти мають здатність відновлювати не тільки радикали (як DPPH), а і катіони металів.

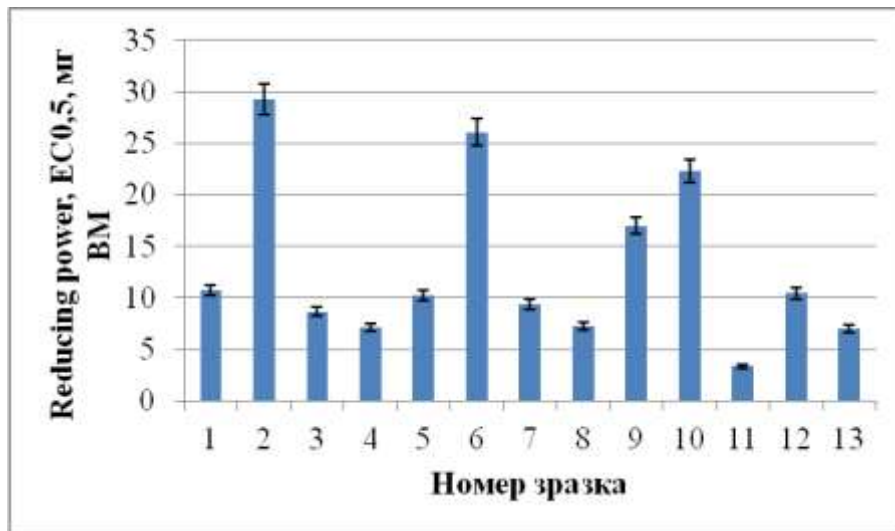


Рис. 3.17. Відновлювальна активність зразків «бородатих» коренів *A. officinalis*

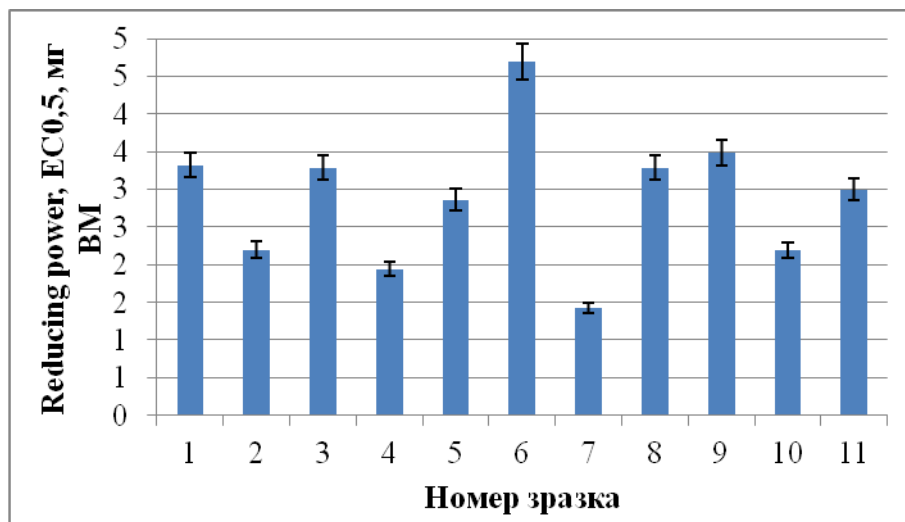


Рис. 3.18. Відновлювальна активність зразків «бородатих» коренів *A. tiliisii*

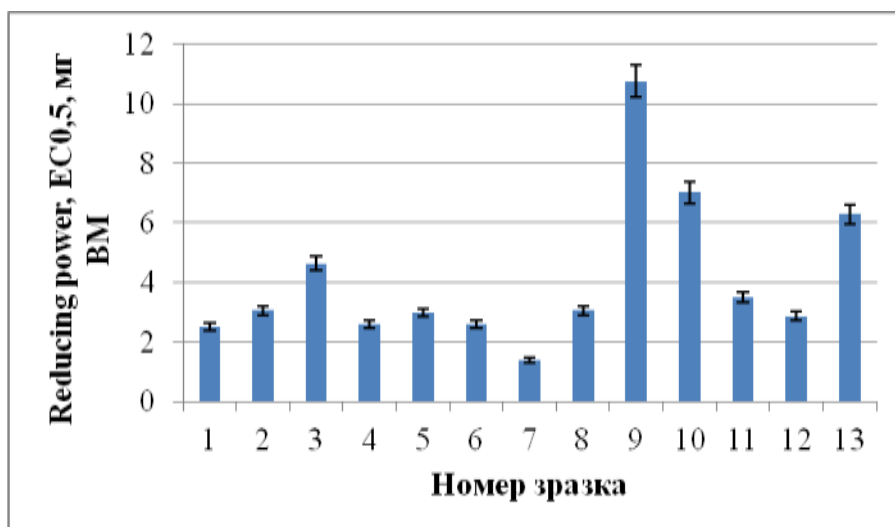


Рис. 3.19. Відновлювальна активність зразків «бородатих» коренів *A. vulgaris*

**Загальний вміст білка.** Досліджувані рослини відрізнялися за вмістом білка як в контрольних зразках, так і після проведення трансформації. Вміст білків коливався в межах від  $6,41 \pm 1,48$  мг/мл (*A. officinalis*, лінія №9) до  $32,3 \pm 3,4$  мг/мл (*A. tilesii*, лінія №3) (рис. 3.20 – 3.22).

Найвищим вміст білка у *A. officinalis* був у лінії №1 ( $29,94 \pm 0,35$  мг/мл), що був на 11 % меншим, ніж у контролі; у *A. tilesii* – лінія №3 ( $32,3 \pm 3,4$  мг/мл), що мала вміст білка у 11 разів більше, ніж у контролі; у *A. vulgaris* – лінія №9 ( $21,6 \pm 0,41$  мг/мл), що у 5,1 разів більше, ніж у контролі.

Відмінності у загальному вмісті білків також не корелювали зі штамом бактерій, які використовувались для трансформації: в межах «бородатих» коренів одного виду вміст білка відрізнявся у 4,67 рази у *A. officinalis* (лінії № 1 та 9), у 2,2 рази у *A. tilesii* (лінії № 3 та 5) та у 2,48 разів у *A. vulgaris* (лінії № 1 та 9). Вміст білка у контрольних рослин значно відрізнявся: від 2,88 до 33,62 мг/мл.

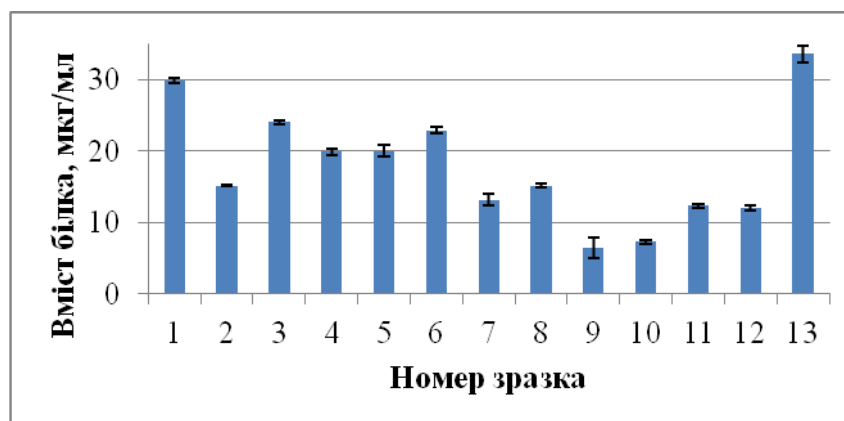


Рис. 3.20. Вміст загального білка у зразках «бородатих» коренів *A. officinalis*

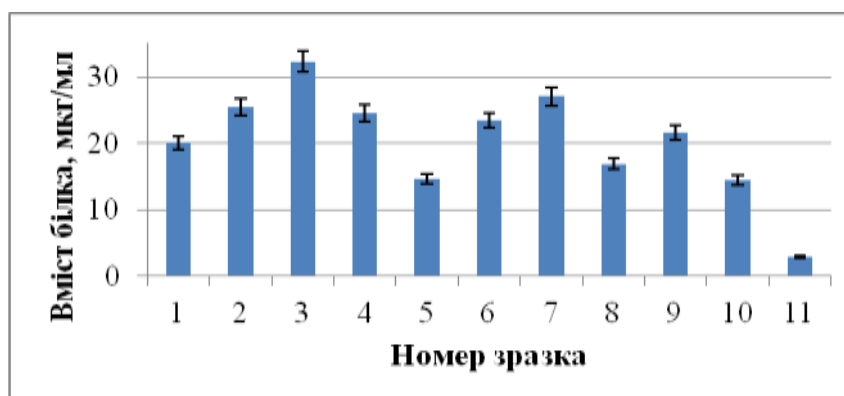


Рис. 3.21. Вміст загального білка у зразках «бородатих» коренів *A. tilesii*

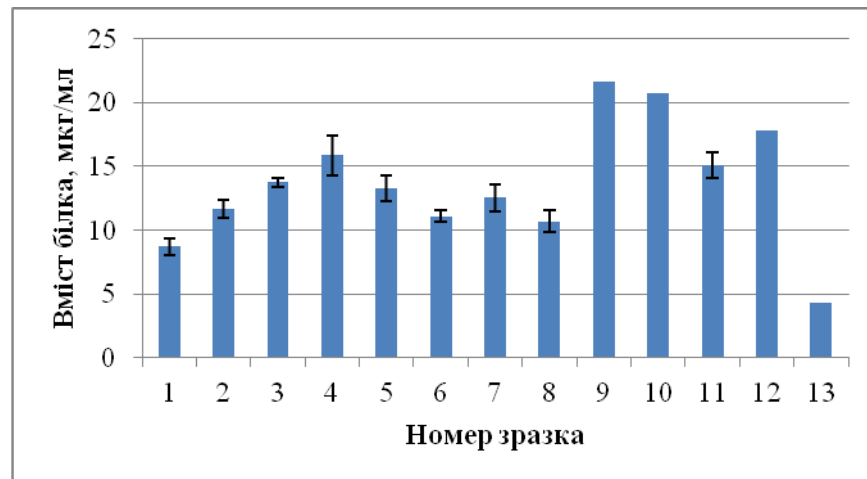


Рис. 3.22. Вміст загального білка у зразках «бородатих» коренів *A. vulgaris*

### 3.2. Аналіз технологічних параметрів росту культур «бородатих» коренів на рідкому середовищі з різним вмістом сахарози

Наступним етапом експериментальної частини роботи було культивування ліній «бородатих» коренів з найвищими показниками АОА на рідкому середовищі 1/2 МС [56] з різними концентраціями сахарози: 20 г/л (стандартна концентрація), 30 г/л, 40 г/л протягом 3 тижнів. Обраними за результатами скринінгу лініями «бородатих» коренів були наступні (рис. 3.23 – 3.25): *A. officinalis* – лінія № 11 (на графіках це 1 та 2 стовпчики), *A. tilesii* – лінія №7 (3 та 4), *A. vulgaris* – лінія №7 (5 та 6), адже усі вони мали високі показники вмісту флавоноїдів, активності ферментативної системи, АОА та ВА.



Рис. 3.23. Корені *A. officinalis* після 3 тижнів культивування на рідкому середовищі МС з концентрацією сахарози 20 г/л



Рис. 3.24. Корені *A. tilesii* після 3 тижнів культивування на рідкому середовищі МС з концентрацією сахарози 20 г/л

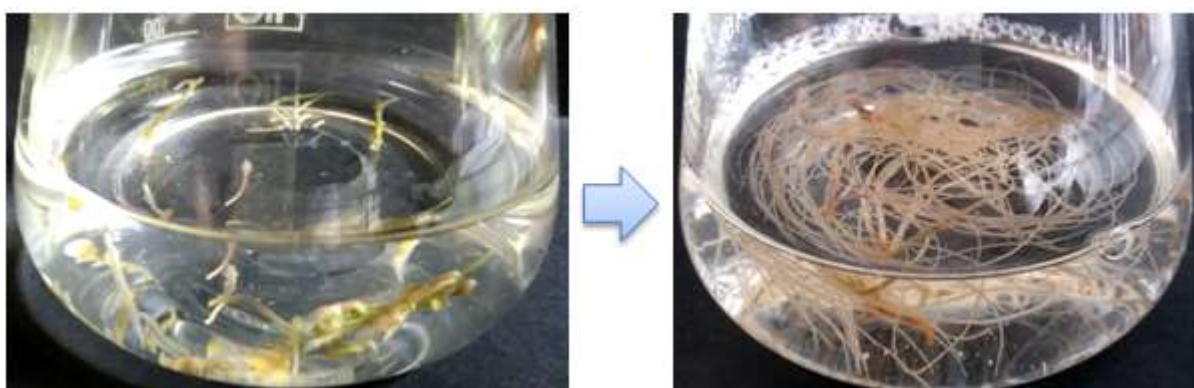


Рис. 3.25. Корені *A. vulgaris* після 4 тижнів культивування на рідкому середовищі МС з концентрацією сахарози 20 г/л

Культивування на рідкому середовищі з вмістом сахарози 20 г/л показали швидкий приріст маси у *A. officinalis* ( $\Delta m = 3,18 \pm 0,15$  г) та *A. tilesii* ( $\Delta m = 3,05 \pm 0,14$  г). Культура коренів *A. vulgaris* росла дуже повільно, тому тривалість її культивування було продовжено до 4 тижнів ( $\Delta m = 0,47 \pm 0,03$  г). І навіть тоді приріст маси *A. vulgaris* був у 6,5 разів менший, ніж у інших видів.

Після цього готували спиртові екстракти коренів (у 70 % етанолі) та проводили аналіз на вміст флавоноїдів, відновлювальну активність та антиоксидантну активність за такими ж методами, як і у підрозділі, описаному вище. Результати показали (рис. 3.26 – 3.28), що культура *A. tilesii* мала найвищий вміст флавоноїдів ( $7,92 \pm 1,23$  мг RE/ г ВМ, що у 8 разів вищий, ніж у інших видів), найвищу антиоксидантну активність ( $EC_{50} = 3,98$  мг ВМ, що у 5 разів вище, ніж у інших видів), найвищу відновлювальну активність ( $EC_{0,5} = 1,21$  мг ВМ, що у 4,5 разів вище, ніж у інших

видів), отже усі показники корелювали між собою. Проте усі показники екстрактів коренів після культивування на рідкому середовищі були меншими, ніж при культивуванні на агаризованому середовищі. Це можна пояснити недостатньою оксигенацією культур та більшим накопиченням біомаси, а не вторинних метаболітів з часом.

Також культивували ті самі культури на рідкому середовищі з вмістом сахарози 30 г/л та 40 г/л протягом 2 тижнів. Приріст маси у *A. officinalis* при культивуванні на 30 г/л був  $\Delta m = 2,38 \pm 0,01$  г та при культивуванні на 40 г/л був  $\Delta m = 2,08 \pm 0,03$  г; у *A. tilesii* на 30 г/л  $\Delta m = 1,72 \pm 0,13$  г та на 40 г/л  $\Delta m = 1,42 \pm 0,01$  г; у *A. vulgaris* на 30 г/л  $\Delta m = 1,06 \pm 0,02$  г та на 40 г/л  $\Delta m = 1,24 \pm 0,16$  г. Отже, при збільшенні вмісту сахарози у середовищі приріст маси збільшився лише у *A. vulgaris*. Загальне збільшення приросту мас не є достатнім для культивування «бородатих» коренів на середовищах зі збільшеною концентрацією сахарози. Іншими словами, це технологічно не вигідно та економічно недоцільно.

Аналіз культур на вміст флавоноїдів, відновлювальну активність та антиоксидантну активність не показав достатнього накопичення вторинних метаболітів, АОА та ВА. Тобто при збільшенні концентрації сахарози у культур «бородатих» коренів спостеріалася збільшена швидкість росту, але накопичення вторинних метаболітів було значно меншим. Отже, доцільно використовувати в майбутньому концентрацію сахарози 20 г/л.

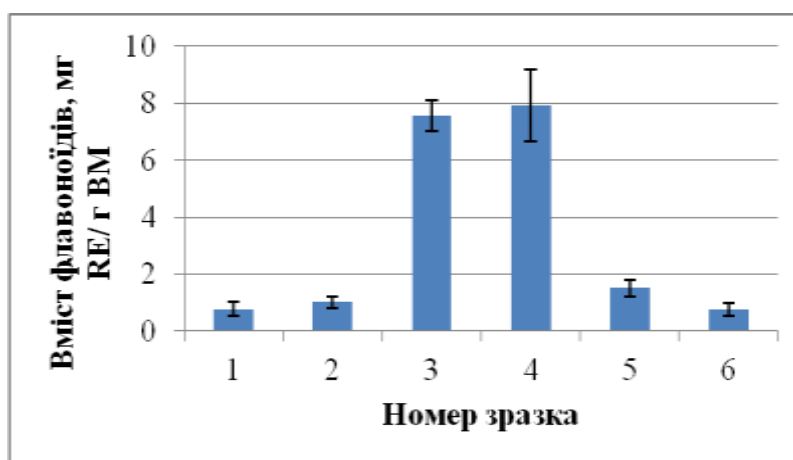


Рис. 3.26. Вміст флавоноїдів «бородатих» коренів після культивування на рідкому середовищі

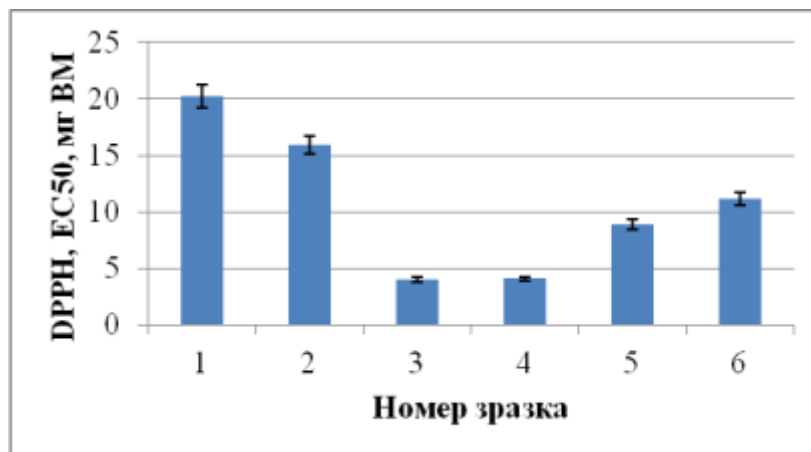


Рис. 3. 27. Антиоксидантна активність «бородатих» коренів після культивування на рідкому середовищі

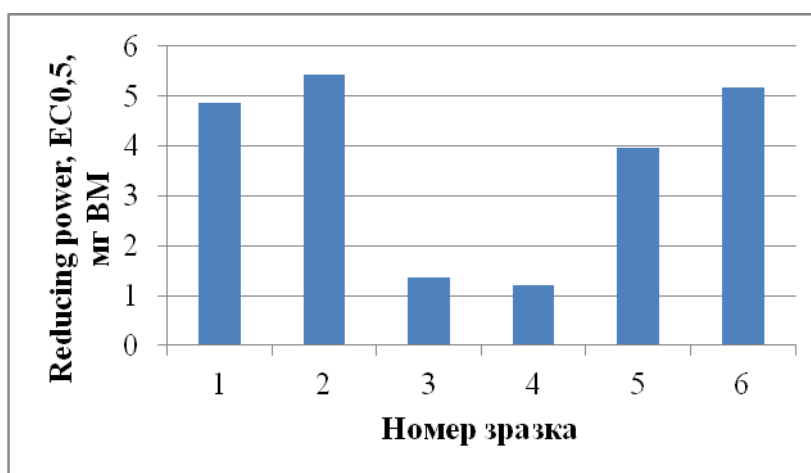


Рис. 3. 28. Відновлювальна активність «бородатих» коренів після культивування на рідкому середовищі

### 3.3. Висновки до розділу

За результатами комплексного скринінгу культур «бородатих» коренів для подальшої роботи було обрано наступні лінії: *A. officinalis* – лінія № 11, *A. tylesii* – лінія №7, *A. vulgaris* – лінія №7, адже усі вони мали високі показники вмісту флавоноїдів, активності ферментативної системи, АОА та ВА. Переведення цих трьох ліній на рідкі середовища МС з різними концентраціями сахарози показало, що найкращим є культивування з концентрацією 20 г/л.



## РОЗДІЛ 4

### ОХОРОНА ПРАЦІ

Експериментальна частина дипломної роботи була виконана в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії (ІКБГІ) НАН України. Робота виконана з урахуванням вимог охорони праці, пожежної безпеки, екологічної безпеки та безпеки в надзвичайних ситуаціях.

Згідно з Законом України «Про охорону праці» необхідно забезпечити належні умови праці біотехнологу-досліднику [64]. Тому в даному розділі проводиться детальний аналіз шкідливих і небезпечних виробничих факторів (НШВФ), пропонуються заходи щодо поліпшення умов праці та запобігання виникненню небезпечних ситуацій.

#### **4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГІ НАН України**

Проаналізувавши умови праці при виконанні дипломної роботи у лабораторії ІКБГІ НАНУ можна виділити ряд шкідливих та небезпечних виробничих факторів, які впливають на здоров'я і працездатність людини. Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 [65] на працівника у лабораторії адаптаційної біотехнології діють наступні небезпечні та шкідливі виробничі фактори: фізичні (підвищена температура повітря робочої зони, підвищений рівень шуму на робочому місці, підвищений рівень ультрафіолетової радіації, підвищена рухливість повітря) та хімічні (токсичні хімічні НШВФ та подразнюючі хімічні НШВФ).

Підвищена температура повітря робочої зони. Джерелом цього фактору є скороварки, термостати, автоклави, сушильні шафи, дистилятори та електричні плити. У теплу пору року робота вказаних приладів призводить до підвищення температури повітря робочого приміщення до 34 °С – 38 °С при відносній вологості 40% – 60 %, що негативно впливає на організм працівника [66].



Підвищений рівень шуму на робочому місці. Основними джерелами шуму у приміщенні лабораторії є термостат електричний сухоповітряний ТС-80М, центрифуга EppendorfCentrifuge 5451С, шафа сушильна електрична СШ-30, холодильник побутовий «Gorenje», ламінар-бокси. Нормативний рівень звуку згідно з ДСН 3.3.6.037-99 для приміщень, де виконуються висококваліфіковані роботи, вимірювальні та аналітичні роботи становить 50 дБ [67]. Рівень шуму ламінар-боксів – 55 дБ, що перевищує норму.

Підвищений рівень ультрафіолетової радіації. Для стерилізації поверхонь ламінарних боксів використовують ультрафіолетові стерилізатори. Згідно з СН 4557-88 [68], що регламентує нормування ультрафіолетового випромінювання, допустимі значення густини УФ-променів для діапазону 220 – 280 нм становлять 0,01 Вт/м<sup>2</sup>.

Підвищена рухливість повітря. Джерелом цього фактору є система подачі стерильного повітря в ламінарних боксах «Lamsystems». Швидкість повітряного потоку становить 0,4 м/с, об'єм поданого повітря – 1000 м<sup>3</sup>/год. Швидкість потоку у 0,4 м/с значно перевищує оптимальну (0,1 м/с – 0,2 м/с залежно від пори року та категорії проведених робіт) відповідно до ГОСТ 12.1.005-88 [69].

Токсичні хімічні НШВФ. До цієї групи хімічних факторів належить спирт етиловий, що використовувався для приготування екстрактів. Етиловий спирт належить до 4-го класу небезпеки, а його ГДК у повітрі робочої зони (за ГОСТ 12.1.005-88) становить 1000 мг/м<sup>3</sup>. Також до цієї групи відносять ДРРН (дифенілпікрілгідразил), який використовувався для проведення тесту на активність екстрактів до відновлення радикалів. Ця сполука належить до 1 класу небезпеки, і є надзвичайно небезпечною для працівників (ГДК – 0,1 мг/м<sup>3</sup>).

Подразнюючі хімічні НШВФ. До подразнюючих хімічних факторів належить луг (їдкий натр, NaOH), що використовувався для приготування розчину рибофлавіну. За ступенем дії на організм людини ця шкідлива речовина входить до 2-го класу небезпеки і є високонебезпечною для працівників. Згідно з ГОСТ 12.1.005-88 ГДК лугу становить 0,1 мг/м<sup>3</sup> – 1 мг/м<sup>3</sup>, а летальна концентрація в повітрі становить 0,5 мг/м<sup>3</sup>.

## **4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГІ НАН України**

Зменшення рівня впливу підвищеної температури. У виробничих та наукових лабораторіях, таких як і лабораторія адаптаційної біотехнології ІКБГІ, необхідно підтримувати мікроклімат робочої зони, який відповідає санітарним нормам відповідно до вимог ДСН 3.3.6.042-99 [70]. Для запобігання перегрівання організму робітників та лаборантів передбачено організаційно-технологічні та будівельно-планувальні заходи. До першої групи відносять: знаходження робочої зони (на час проведення експериментів) окремо від джерел надмірних теплоутворень (термостатів та електроплиток), забезпечення максимальної автоматизації проведення дослідів для зменшення часу впливу даного фактора, використання природної вентиляції (аерації). Також сушильні шафи та термостати мають теплоізоляцію для зменшення теплового випромінювання. До другої групи належить орієнтація вікон схід – захід, наявність жалюзі та системи кондиціонування, а також загальнообмінні системи витяжної вентиляції.

Зменшення впливу підвищеного рівня шуму. На сьогодні в лабораторії відсутні заходи зменшення впливу цього фактора на організм працівника. Відповідно до ГОСТ 12.1.029-80 [71] можливо запропонувати наступні методи колективного захисту: зменшення шуму в самому джерелі (придбання ламінар-боксів з меншим рівнем шуму, адже він не відповідає санітарним нормам; ремонт та оновлення загальнообмінних вентиляційних систем; віддалене розташування центрифуг та холодильників від робочих місць), і/ або зменшення рівня шуму на шляху його поширення (звукоізоляція та звукопоглинання – встановлення звукоізоляційних кожухів).

Зменшення впливу підвищеного рівня ультрафіолетової радіації. При роботі УФ-стерилізатора в ламінар-боксі роботи не ведуться. Для проведення оцінки результатів гель-електрофорезу при наявному УФ-опроміненні у лабораторії адаптаційної біотехнології завжди користуються захисними масками зі

світлофільтрами [72], а також одягають спеціальний одяг та одноразові медичні рукавички.

Зменшення рівня впливу підвищеної рухливості повітря. Оскільки основним джерелом даного фактора є ламінар-бокси, необхідно обмежувати роботу в них до необхідного мінімуму (розлив стерильних середовищ, проведення пересівів, стерилізація інструментів). Також при роботі у ламінар-боксах пропонується використовувати засоби індивідуального захисту – захисні маски та спеціальний одяг (для попередження захворювань працівників в результаті протягу).

Зменшення рівня впливу хімічних (токсичних та подразнюючих) НШВФ. Захист від несприятливого впливу хімічних речовин у лабораторії адаптаційної біотехнології можна здійснювати застосовуючи наступні методи: обладнання лабораторії загальнообмінною системою витяжної вентиляції, наявністю засобів індивідуального захисту (окуляри, одноразові медичні рукавички та спеціальний одяг), наявність аптечки для надання першої допомоги на випадок травмування.

Витяжні системи є необхідними при роботі з токсичними речовинами, а також для проведення експериментів з підгрівом реакційної суміші. Як було зазначено у попередньому підрозділі, деякі з використаних реактивів відносять до 1 класу небезпеки (ГДК у повітрі робочої зони становить  $0,1 \text{ мг/м}^3$ ), тому необхідне оновлення витяжних систем.

Також є низка правил загальної роботи у лабораторії: залишки кислот та лугів заборонено виливати в раковину (необхідне встановлення спеціальних ємностей під витяжною системою у спеціально відведеному місці [73]); робота з хімічними речовинами проводиться тільки на хімічному столі, який покритий кислототривким пластиком і миється в кінці кожного робочого дня; використаний скляний хімічний посуд (колби, чашки) одразу ж нейтралізують та миють; скляний посуд великих розмірів (концентровані розчини реактивів, які використовують для приготування стокових розчинів) переносять окремо обома руками; у якості пробірок та піпеток користуються одноразовими мікропробірками та автоматичними піпетками з одноразовими пластиковими носиками; заборонено перевертати автоматичні піпетки, якщо в носиках є залишки реактивів; використаний одноразовий посуд

одразу викидають; заборонено використовувати будь-які реактиви, на яких відсутній напис та/ або маркування; нагрів реакційної суміші проводять на автономній водяній бані, а не над газовим пальником – для зменшення ризику перегрівання та закипання суміші у пробірці; усі приготовані стокові та робочі розчини підписують (назва, дата, концентрація, експеримент); рН розчинів доводять лугами/ кислотами до необхідного значення по краплинах, а не доливаючи одразу велику концентрацію їдких речовин.

У лабораторії заборонено їсти та пити, класти будь-які особисті речі на робочу поверхню столів, захаращувати робочий стіл непотрібним на даний момент посудом та реактивами, визначати хімічні речовини на запах та смак. Категорично заборонено працювати в лабораторії наодинці, і перед кожним проведенням нового експерименту необхідно попередити наукового керівника та розписатись у журналі. На робочих місцях біля кожного обладнання вивішені інструкції з його експлуатації. Усі реактиви є маркованими (назва, формула, дата, клас небезпеки, токсичність, умови зберігання). Усім студентам та робітникам проводять кожні півроку інструктажі з техніки безпеки у лабораторії [74].

**Розрахунок загальнообмінної вентиляції для зменшення впливу хімічних НШВФ у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГІ НАН України.** Найбільш небезпечним фактором з вищевказаних є хімічні токсичні НШВФ, адже частина реактивів, які використовувались для проведення експериментальної частини дипломної роботи (дослідження антиоксидантної активності екстрактів), відносяться до 1 класу небезпеки, тобто є надзвичайно небезпечними (коефіцієнт можливого інгаляційного отруєння – більше 300). Їх гранично допустима концентрація у повітрі робочого приміщення складає  $0,05 \text{ мг/м}^3 - 0,1 \text{ мг/м}^3$ , а час роботи працівників та лаборантів з даними речовинами займає декілька годин кожного робочого дня (приготування розчину реактиву потрібної концентрації, постановка експерименту, оцінка результатів). Для зведення впливу цього фактора до мінімуму усі токсичні та подразнюючі речовини переводять у рідкий стан (готують робочі розчини відомої концентрації), та працюють з ними обов'язково у засобах індивідуального захисту. Але для забезпечення оптимальних умов праці є

необхідним оновлення потужних загальнообмінних витяжних систем, адже встановлення місцевих витяжних систем над робочими хімічними столами або витяжних шаф неможливе через наявність у лабораторії ламінар-боксів для асептичної роботи з культурами рослин.

Системи загальнообмінної витяжної вентиляції приміщення лабораторії необхідно проектувати не лише задля нормалізації ГДК хімічних факторів у повітрі, але і для видалення з приміщення надлишків тепла і вологи від технологічного обладнання. Пропонується створення централізованої системи вентиляції, при якій витяжні повітроводи від кожного окремого приміщення лабораторій (на 1 поверсі є кілька лабораторій – адаптаційної біотехнології, генетики, молекулярної біології) об'єднуються в єдиний вертикальний або горизонтальний колектор, який розміщується за межами будівлі або на технічному поверсі в приміщенні вентиляційної камери.

При проектуванні і монтажі централізованої системи витяжної вентиляції необхідно дотримуватись наступних рекомендацій: на всіх гілках системи витяжної вентиляції, які входять в приміщення хімічної лабораторії, необхідно монтувати вогнезатримувальні клапани; у приміщенні венткамери необхідна установка резервного вентилятора, який автоматично вмикається при зупинці основного; в приміщенні лабораторії, де проводяться дослідження з застосуванням вибухонебезпечних або вибухопожежонебезпечних речовин, необхідно додатково монтувати повітропроводи, вентилятори і електродвигун вентилятора у вибухобезпечному виконанні.

Для успішної роботи системи вентиляції важливо, щоб ще на стадії проектування були виконані такі санітарно-гігієнічні і технічні вимоги [75]:

- об'єм припливу повітря в приміщення повинен відповідати об'єму витяжки; різниця між цими об'ємами не повинна перевищувати 10% –15%.
- свіже повітря необхідно подавати в ті частини приміщення, де кількість шкідливих виділень мінімальна (чи їх взагалі немає), а видаляти, де виділення максимальні.

Оскільки робота з токсичними та подразнюючими хімічними факторами у

лабораторії адаптивної біотехнології проводиться кожного робочого дня, можливо розрахувати повітрообмін ( $L_n$ ) для приведення концентрацій цих хімічних сполук до санітарної норми. Необхідний повітрообмін розраховують виходячи з призначення приміщення та технологічного процесу, який у ньому проходить. При виділенні пари або газів у приміщенні необхідний повітрообмін визначається виходячи з умови розбавлення їх до гранично допустимих концентрацій [75]:

$$L_n = \frac{G}{(c_{\text{вид}} - c_{\text{пр}})}, \text{ м}^3/\text{год},$$

де  $G$  – кількість пари, газів або пилу, що виділяється, мг/год;

$c_{\text{вид}}$  – концентрація шкідливих речовин у повітрі, що видаляється, мг/м<sup>3</sup> (не повинна перевищувати ГДК);

$c_{\text{пр}}$  – концентрація шкідливих речовин у повітрі, що подається в приміщення, мг/м<sup>3</sup> (не повинна перевищувати 0,3 ГДК).

Розрахуємо необхідне значення  $L_n$  для безпечної роботи з DPPH (найтоксичніший реактив з тих, що використовуються в лабораторії, адже гідразини відносять до 1 класу небезпеки). Його концентрація у повітрі робочої зони становить 40 мг/год. ГДК – 0,1 мг/м<sup>3</sup>. За  $c_{\text{пр}}$  візьмемо 0 [75]. Тоді:

$$L_n = \frac{G}{(c_{\text{вид}} - c_{\text{пр}})} = \frac{40}{(0,1 - 0)} = 400 \text{ м}^3/\text{год}.$$

Отже, враховуючи невеликий об'єм приміщення лабораторії, для зменшення впливу хімічних НШВФ на працівників необхідним є оновлення системи загальнообмінної вентиляції з мінімальним повітрообміном 400 м<sup>3</sup>/год.

#### **4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГІ НАН України**

У лабораторії адаптаційної біотехнології можливими джерелами пожежі та

(або) вибуху можуть бути:

- займання легкозаймистих речовин (переважно органічні – етанол у спиртівках, які використовуються для асептичної роботи з культурами рослин та стерилізації інструментів) в результаті їх неправильного зберігання;

- недотримання правил безпеки у лабораторії (виникнення екзотермічних реакцій в результаті неналежного приготування робочих розчинів легкозаймистих та вибухонебезпечних речовин);

- неналежне поводження з відкритим вогнем та «проскакування» полум'я, що може призвести до загоряння прилеглих предметів і приготованих робочих розчинів хімічних речовин, а також до загоряння засобів індивідуального захисту (рукавичок та спеціального одягу);

- загоряння під час роботи сухожарової шафи (під час стерилізації хімічного посуду);

- несправне електроустаткування, несправності в електропроводці, електричних розетках і вимикачах;

- обігрівання приміщення електронагрівальними приладами з відкритими нагрівальними елементами, що може спричинити займання прилеглих предметів;

- недотримання заходів пожежної безпеки.

До пожежної профілактики відносять організаційні і технічні заходи, спрямованих на забезпечення безпеки людей, на запобіганні пожежі, обмеження її поширення, а також створення умов для успішного гасіння пожежі. Необхідно, щоб персонал лабораторії мав знання про пожежобезпечну поведінку, вчасно проходив інструктаж. У лабораторії адаптаційної біотехнології суворо дотримуються наступних правил техніки безпеки [74]:

- легкозаймисті речовини зберігають відповідно до інструкцій, передбачених ІКБГІ; лабораторні столи заборонено промивати рідинами, що легко займаються; робочу зону заборонено захарашувати використаними реактивами та хімічним посудом;

- при роботі з органічними реактивами заборонено працювати наодинці; відпрацьовані реактиви та їх залишки одразу нейтралізуються та виливаються у

відповідні раковини; у випадку припинення дії вентиляції усі роботи, пов'язані з виділенням легкозаймистих прів та газів припиняються;

- при роботі з відкритим вогнем завжди необхідно дотримуватись техніки безпеки; усі предмети тримати в зоні стерильності спиртівки, але не над самим вогнем;

- сухожарову шафу заборонено відчиняти під час роботи, для попередження потрапляння кисню з робочої зони;

- перед пуском в роботу будь-якого обладнання (лабораторного апарата) ретельно перевіряють його технічний стан, і лише після усунення всіх дефектів, що були виявлені, можна вмикати апарат; усі несправності важливо вчасно виявляти та усувати, робити повірку та ремонт обладнання;

- усі електронагрівальні прилади обов'язково установлюють окремо від хімічних столів з реактивами та іншими легкозаймистими речовинами;

- у лабораторії є справні вогнегасники, які повіряють; під час роботи в лабораторіях необхідно пам'ятати про можливість утворення вибухонебезпечних сумішей парів газів і пилу з повітрям; при застосуванні вибухонебезпечних речовин треба підтримувати такий режим, при котрому концентрації були б вище верхньої або нижче нижньої межі вибуху.

Приміщення лабораторії з різною пожежною небезпекою розділені протипожежними перегородками з гіпсокартону із заповненням мінеральними плитами; у коридорах на шляхах евакуації персоналу передбачені протидимові та протипожежні перегородки; електропроводка за підвісною стелею виконана з кабелів з мідними жилами у оболонці, що не розповсюджує горіння; проводки кабелів та проводів крізь стіни виконані у обрізах сталевих труб та закриті вогнетривкою сумішшю; передбачений блискавкозахист будівлі від прямих ударів блискавки.

На випадок пожежі в лабораторії є вогнегасники, пісок, листовий азбест, чотирихлористий вуглець, пожежний рукав. За умов виникнення пожежі в лабораторії наявні засоби гасіння необхідно негайно використовувати залежно як від причини, що обумовлюють її виникнення, так і від характеру палаючого



об'єкта. Одночасно треба викликати місцеву пожежну команду.

Хорошим засобом гасіння дрібних пожеж є пісок, який повинен бути сухим і сипучим. Якщо зайнялися дерев'яні предмети, пожежу можна гасити водою, піском і за допомогою вогнегасника. Нерозчинні у воді органічні речовини слід гасити піском або ж накриванням листовим азбестом. У всіх випадках можна гасити чотирхлористим вуглецем. Можна застосовувати також спеціальні сольові розчини (насичений розчин вуглекислого натрію або суміш, що складається з 40-50 % води, 40-55 %  $ZnCl_2$  і 5-20%  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) [74].

#### **4.4. Висновки до розділу**

Проаналізовано небезпечні та шкідливі виробничі фактори у лабораторії адаптаційної біотехнології ІКБГІ НАНУ, а також організаційно-технічні та будівельно-планові заходи зменшення рівня впливу цих НШВФ. Серед фізичних та хімічних факторів найголовнішим обрано хімічні токсичні речовини, адже робота з ними проводиться кожного дня, і запропоновано оновлення системи загальнообмінної витяжної вентиляції приміщення лабораторії задля зменшення впливу даного фактора на працівників. Проведено розрахунок повітрообміну ( $L_n$ ) для приведення концентрацій цих хімічних сполук до санітарної норми. Також досліджено забезпечення пожежної та вибухової безпеки у лабораторії, а саме джерела можливої пожежі та (або) вибуху, профілактичні заходи для їх попередження та методи їх усунення.

## РОЗДІЛ 5

### ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

#### Вплив та роль факторів навколишнього середовища, спричинених антропогенною діяльністю на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин

##### 5.1. Поняття про адаптаційні процеси рослин

Серед змін, спричинених людиною в природних системах, є ті, що виникли в результаті промислового забруднення: діоксиду сірки, гербіцидів, фотохімічних забруднювачів, пестицидів, радіації та багато іншого. Присутність кожного з них забезпечує селективну силу, яка сприяє одним генотипам, знеохочує інші та ліквідує види, яким не вистачає генетичного різноманіття, щоб вижити. Таким чином, впливає на появу та поширення рослин. Там, де знищується велика кількість видів, а земля оголюється до ерозії (утворення так званої «індустріальної пустелі»), вплив вкрай небажаний. В інших випадках толерантних генотипів існувало достатньо видів, щоб дозволити їм розмножуватися та заповнювати звільнені ніші. У випадках, коли пошкоджені лише деякі види рослин, характер змін буде залежати від природи толерантних особин та видів. Поширений перехід від лісу до більш толерантних трав та злаків [76].

Забруднення довкілля для рослин є новим екологічним фактором, який значно обмежує процеси їхньої життєдіяльності. Адаптаційні зміни живих організмів до дії поллютантів (контамінантів) довкілля через нетривалий термін можуть відбуватися лише у межах реакції. Тобто, стійких генетичних змін ще не відбулося. В зв'язку з цим дуже важливим є вивчення як механізмів впливу забруднювачів, так і реакції відповіді на стресові умови рослинних організмів [77].

Рослинний організм має здатність до захисту від дії несприятливих абіотичних і біотичних факторів середовища, що виражається його адаптацією: біохімічною (молекулярною), фізіологічною та анатомо-морфологічною. Адаптація – це

сукупність первинних пристосувальних реакцій, які спрямовані на підтримку потрібного для життєдіяльності організму гомеостазу і забезпечують можливість видоспецифічного виживання рослин. Біохімічна або молекулярна адаптація проявляється в зміні іонного і молекулярного складу цитоплазми та мембранних структур (викликаючи зміну їх функціональної активності). Це первинна реакція рослин на стрес. В результаті такої адаптації змінюються співвідношення катаболізму та анаболізму, ріст і розвиток, дихання і фотосинтез, тобто відбувається фізіологічна адаптація. Анатомо-морфологічна адаптація проявляється в специфічних особливостях будови клітин, тканин, окремих органів і організму в цілому, що виникли в процесі еволюції в різних екологічних умовах [77].

Залежно від адаптаційних пристосовань (реакції на довготривалий стрес), рослини поділяють на три групи:

- К-стратегі (віоленти) – підтримують вегетативний ріст (накопичення біомаси) за помірного екологічного стресу;

- S-стратегі (патієнти) – під час дії стресору припиняють наявний ріст, уповільнюють перехід до цвітіння, отже, ресурси витрачаються на процеси адаптації, а не на розмноження;

- R-стратегі (експлеренти) – за стресових умов припиняють ріст, але мають прискорення початку цвітіння і формування насіння.

## **5.2. Вплив забруднення ґрунту на фізіолого-біохімічні реакції рослин**

Природні сполуки, отримані з лікарських рослин, відіграють центральну роль у охороні здоров'я та розробці ліків як у класичній, так і в сучасній медицині. У природі надлишкове вироблення АФК (активних форм кисню) є дуже реактивним щодо біологічних молекул, які є ліпідами, білками та ДНК. Це призводить до дисбалансу між окисниками та антиоксидантами в клітині рослини. Хоча людський організм захищений вродженою антиоксидантною захисною системою, необхідний належний запас антиоксидантів з природних джерел [78].

Абіотичні стреси призводять до надмірного утворення у рослинах АФК, які складаються як з форм вільних радикалів (таких як супероксид гідроксил, пергідрокси- та алкокси-радикали) та інших форм, включаючи пероксид водню та синглетний кисень. Стрес призводить до накопичення АФК, яке поглинається ферментативними антиоксидантами, такими як СОД (супероксиддисмутаза), АРХ (аскорбат пероксидаза), GPX (глутатіонпероксидаза) і КАТ (каталаза), та неферментативними низькомолекулярними метаболітами, такими як аскорбат, глутатіон,  $\alpha$ -токоферол, каротиноїди та флавоноїди. Антиоксиданти присутні у всіх органелах, що представляє значення детоксикації АФК для виживання клітини. У стресовому стані для підтримання підвищеної метаболічної координації без надмірного продукування АФК та окисних пошкоджень обов'язковим є підтримання потоку енергії через органели. Також рослини містять антиоксиданти, що екзогенно надходять через ґрунт [78].

Усі ґрунти характеризуються родючістю, здатністю забезпечувати рослини водою та елементами мінерального живлення. Природна родючість ґрунтів залежить від багатьох факторів, клімату, повітря, води, мікроорганізмів, рельєфу місцевості та в умовах України зазнає впливу комплексу техногенних чинників. М. Л. Рева і Г. І. Хархота у своїх дослідженнях розрізняють три типи техногенних ґрунтів: частково порушений ґрунтовий шар і ґрунтоутворюючі породи (після розробки нерудних копалин); промислові землі (після розробки інших корисних копалин); ерозія ґрунтів, обумовлена антропогенними факторами (безсистемна оранка земель, некерований випас тварин, вирубка лісів) [77].

Джерелами надходження забруднювачів у ґрунт є підприємства металургійної (викиди оксидів металів), хімічної (викиди твердих часток у вигляді солей, які до того ж взаємодіють з газоподібними викидами у атмосфері), машинобудівної промисловості, автотранспорт, сільське господарство (хімічні добрива, гербіциди, інсектициди, фунгіциди та інші отруйні речовини). Наприклад, вивчення в умовах Донбасу вмісту Fe, Cu, Mn, Zn за генетичними горизонтами показало, що підвищена їх кількість спостерігається в гумусовому горизонті. Кислі гази та токсичний пил акумулюються ґрунтом, взаємодіють з гумусом, сприяють його мінералізації,

зниженню родючості, порушенню біологічної і біохімічної структури ґрунту. За умов забруднення відбувається зміна фізичних і хімічних властивостей ґрунту [77].

У статті О. Михайленко *et al.* [79] досліджували вплив забруднення ґрунту на накопичення фенольних сполук (які є антиоксидантами) у рослин України (Вінницька, Черкаська та Закарпатська області), Латвії та Литви (різні види роду Ірис). Зразки ґрунту відбирали для агрохімічних аналізів поблизу рослин, що обирали для дослідження, з глибини 0–30 см. В кожній зоні відбору проб готували по одній змішаній пробі ґрунту (приблизно 1 кг) і передавали до Лабораторії агрохімічного аналізу (Каунас, Литва). Результати агрохімічного аналізу ґрунту виявили широкі варіації досліджуваних властивостей ґрунту серед місць відбору проб: рН ґрунту в дослідних зразках з Литви та Латвії був близьким до нейтрального, тобто слабкого (рН 6,1 – 6,5), нейтрального (рН 6,6 – 7,3) або слабкого (рН 7,4 – 7,8), тоді як в Україні рН ґрунту в більшості випадків був сильно (рН 5,1 – 5,5), дуже сильно (рН 4,5 – 5,0) або надзвичайно кислим (рН 3,5 – 4,4). У місцях вивчення популяцій Литви та Латвії переважали ґрунти з дуже низьким (<50 мг/кг) вмістом фосфору, а в Україні коливались від дуже низького (<50 мг/кг) до високого вмісту (> 200 мг/кг) фосфору. У досліджуваних місцях видів ірисів у всіх країнах переважали ґрунти з помірним (101 мг/кг – 150 мг/кг) та достатнім (151 мг/кг – 200 мг/кг) вмістом калію. Вміст азоту в зразках ґрунту коливався в широких межах, однак у зразках з України він, як правило, вищий (коливався від 0,08% до 1,24%), ніж у ґрунтах Литви та Латвії (коливався від 0,05% до 0,26%). Вміст гумусу в ґрунті більшості досліджуваних місць в Україні був помірним (3% – 4%) або високим (> 4%), тоді як у досліджуваних місцях у Литві та Латвії – низьким (<3%). За допомогою ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії) було досліджено вміст 25 фенольних сполук у відібраних рослинах. Аналіз впливу властивостей ґрунту на накопичення фенольних сполук різних класів виявив негативну кореляцію впливу вмісту фосфору та калію на накопичення деяких фенольних кислот (*p*-кумаринова кислота, кемпферол), а також впливу рН.

Вченими Х. Лі *et al.* [80] було досліджено вплив використання хімікатів на гумус та антиоксидантний потенціал рослин. 1-метилциклопропен (МЦП) часто

використовують як регулятор росту рослин та при зберіганні зібраного врожаю (дозволяє подовжити свіжість плодів на складах), тому необхідно знати, чи має ця хімічна речовина (та інші гексанали) вплив на збереження фенольних, поліфенольних сполук, каротиноїдів та антоціанів. Результати дослідження показали, що при додаванні цієї речовини загальний вміст фенолів у плодах не змінився, але індивідуальні сполуки змінили свою концентрацію (відбулася зміна у біохімічних реакцій синтезу поліфенолів).

Подібні дослідження якості ґрунтів, але вже в Китаї, де забруднення земель є однією з найважливіших екологічних проблем, проводили дослідники Ї. Юань *et al.* [81] та у Ірані – З. Заргуш [82]. Результати експериментів показали кореляцію між забрудненням ґрунтів та накопиченням рослинами антиоксидантів (проводили DPPH-тест, загальний вміст фенолів та полісахаридів).

Низькі концентрації важких металів можуть служити важливими мікроелементами і, отже, можуть сприятливо впливати на ріст рослин. Особливо вони необхідні видам, які мають високу потребу в металах, які можуть бути токсичними при більш високих концентраціях. Такі хімічні речовини можна вважати природними забруднювачами, оскільки вони присутні як фонова концентрація в земній корі [76]. Але через токсичні викиди промисловості можливоий негативний ефект на рослини. Вплив забруднення ґрунтів металами на антиоксидантний статус рослин проводили І. Ахмад *et al.* [78]. Промислові та сільськогосподарські відходи призводять до накопичення фітотоксичних металів, що призводить до хлорозу та некрозу, а також до зниження швидкості росту. Також є реакція на схожість насіння до різних доз кадмію (Cd), хрому (Cr), цинку (Zn), міді (Cu), свинцю (Pb) та ртуті (Hg). Іони міді ( $\text{Cu}^{2+}$ ) спричиняють світлозалежне перекисне окислення ліпідів, відновлення пігментів в житі (*Secale cereale*) та зниження рівня ендогенної КАТ (каталази). Так відбувалося тому, що йони купруму редокс-активні і каталізують реакції Фентона, які продукують  $\text{OH}^-$  і спричиняють перекисне окислення. Cd-стрес знижує вміст хлорофілу та гему в проростках квасолі (*Vigna radiata*) за рахунок стимуляції ліпоксигенази та інгібування антиоксидантних ферментів, СОД та КАТ одночасно. Таке гальмування зумовлене зв'язуванням

металу з важливою сульфгідрильною групою ферментів, що посилює фітотоксичну дію металів. Вільне залізо (Fe) може брати участь у реакціях Фентона і каталізувати вироблення  $\text{OH}^-$  та інших АФК. Більше того, Fe є складовою частиною антиоксидантних ферментів КАТ, АРХ та феросупероксиддисмутази. Коли рослини ростуть в різних стресових умовах, таких як холод, спека, сіль, осмотика, сильне освітлення, посуха та хімічні речовини, це призводить до окислювального стресу, головним чином за рахунок зниженого антиоксидантного захисту та посиленого утворення вільних радикалів, спричинених каталітичною дією Fe.

### **5.3. Вплив забруднення повітря на фізіолого-біохімічні реакції рослин**

Штучне (антропогенне) забруднення атмосфери відбувається внаслідок зміни її складу та властивостей під впливом діяльності людини. За агрегатним станом, хімічним складом та характером впливу на атмосферу штучні джерела забруднення умовно поділяють на технічні (пил цементних заводів, дим і сажа від згоряння вугілля) та хімічні (пило- або газоподібні речовини, які можуть вступати в хімічні реакції). Фотохімічний тип забруднення атмосфери (смог) характеризується вмістом у приземному шарі повітря великої кількості вуглеводнів перекисної природи. Основними джерелами надходження їх в атмосферу служать продукти неповного згоряння бензину й масел у двигунах внутрішнього згоряння і летучі фракції нафти. В Україні більше половини токсикантів становлять окиси вуглецю, близько 20 % – пилові частинки, по 10 % сірчистий газ та вуглеводні, решта – оксиди азоту та інші домішки. Через кожні 10 років рівень токсичних речовин в атмосфері збільшується вдвоє [77].

Вважається, що полютанти в момент надходження в атмосферу або в нічний час не завдають значної шкоди живим організмам. Токсичність забруднюючих речовин різко зростає після деякого періоду освітлення сонячними променями. Згідно з теорією Хаагена-Сміта, утворення смогу відбувається в результаті фотохімічної взаємодії його компонентів з атомарним киснем. Діоксид азоту, сірчистий ангідрид і альдегіди здатні поглинати ультрафіолетові промені і

переходити в активний стан. Вивільнюваний при цьому атомарний кисень реагує з молекулярним киснем повітря. Озон і окисли азоту реагують з органічними домішками повітря, у результаті чого утворюються ненасичені вуглеводні, альдегіди, кетони, кислоти й інші речовини із сильно вираженою фітотоксичною дією [77, 83].

За утворення надлишку озону в повітрі відзначене подальше окислення двоокисів азоту і сірки з утворенням відповідно азотної і сірчистої кислот. Кислоти, що утворилися, утримуються в повітрі у вигляді рідкого аерозолі. Контактуючи з листям, вони викликають точкові ушкодження. Кислі і лужні гази, реагуючи між собою, а також з активними компонентами повітря (водяна пара, кисень тощо), утворюють нові сполуки. Усі вони в газоподібному чи розчиненому у воді вигляді проникають у рослини, викликаючи порушення їхньої життєдіяльності. Іноді шкідлива дія токсичних газів і аерозолів виявляється на відстані до 50 км від підприємств [77].

Одним із забруднювачів, який часто зустрічається у викидах промислових підприємств, є сірчистий газ  $\text{SO}_2$ . Хоча діоксид сірки рідко є природним компонентом нашої атмосфери, більшість рослин мають різну ступінь толерантності до його присутності. Деякі з них є надзвичайно чутливими, і саме вони незабаром зникають внаслідок забруднення  $\text{SO}_2$ . Нестача рослин біля плавильників міді знову і знову наводила особливо наочні приклади змін у розподілі рослин: рослинність поблизу старовинних мідних, залізних або цинкових плавильників завжди змінена [76]. Механізм токсичної дії  $\text{SO}_2$  полягає в порушенні діяльності багатьох ферментів у наслідок підкислення цитоплазми, зміни іонного балансу, нагромадження баластових токсичних речовин, у руйнуванні фотосинтетичних структур, появи автокаталітичних ланцюгових реакцій вільнорадикального і фотодинамічного окислювання [77, 84].

Високі концентрації фтору, так само, як високі концентрації  $\text{SO}_2$ , розріджують популяції чутливих до них рослин, звільняючи місце для більш толерантних до джерел фтору видів. На приклад, навколо алюмінієвого заводу в Чехословаччині уся рослинність загинула, за винятком надзвичайно толерантного виду – *Conium*



*maculatum* (отруйний болиголов). Однак протягом наступних років, оскільки було встановлено обладнання для боротьби із забрудненням, інші види відновлювались у цій місцевості [76]. Забруднення навколишнього середовища фторидами викликає значне зниження вмісту пігментів у листі та пригнічення фотосинтезу, порушення активності окисних ферментів, водного режиму, зрушення рН та окислювально-відновного потенціалу. Підвищення концентрації фтористого водню в атмосфері поблизу хімічного комбінату приводить до збільшення частоти хромосомних аберацій, розривів хромосом, посиленню мутаційного процесу у злакових сільськогосподарських культур, змінюється гідроліз [77, 84].

Азот входить до складу амінокислот і, відповідно, білків. Тому дія забруднення навколишнього середовища азотистими сполуками носить двоякий характер. До певних концентрацій синтез амінокислот і білка цими сполуками може стимулюватися, тоді як їхні високі концентрації є токсичними і придушують синтетичні процеси. Так, показано, що підвищені концентрації аміаку в газових сумішах у стійких видів приводять до значного підвищення вмісту вільних амінокислот. У чутливих видів цей показник або збільшується незначно, або знижується. Очевидно, така реакція рослин є одним з механізмів детоксикації аміаку у клітині [77, 85].

Залежно від адаптаційної реакції до вищевказаних впливів, у рослин виділяють невидимі, хронічні та видимі або гострі пошкодження [77].

#### **5.4. Вплив іонізуючих випромінювань на фізіолого-біохімічні реакції рослин**

Розуміння впливу іонізуючого випромінювання (ІВ) на рослини має важливе значення для охорони навколишнього середовища, сільського господарства, садівництва та космічної науки, проте рослини мають значні біологічні відмінності від тварин, з яких отримано багато відповідних знань. Вплив ІВ на рослини найкраще зрозуміти при гострих високих дозах, оскільки вже були проведені контрольовані експерименти на місцях із використанням точкових джерел, польові

дослідження безпосередньо після ядерних аварій та контрольовані лабораторні експерименти. Сукупність досліджень впливу ІР на рослини показує, що хоча існує чимало польових досліджень впливу хронічних низьких доз на рослини, існує мало контрольованих експериментів, в яких використовувались хронічні низькі дози. Припускають, що хронічне ІВ низького рівня іноді може мати вплив на молекулярний та цитогенетичний рівні організації рослин [86].

Радіобіологічні реакції рослини багато в чому залежать від вихідного розподілу енергії ІВ, яке поглинається в ході опромінення клітинами і тканинами організму. Тому у радіобіологічних дослідженнях умови опромінення (тип ІВ, доза випромінювання, потужність дози, тривалість періоду опромінення, стан об'єкта, інші фактори фізичної або хімічної природи) визначають результат експерименту. Експозиційна доза випромінювання – це інтегральна енергетична характеристика поля випромінювань. Експозиційна доза – міра іонізаційної дії випромінювання (її одиниця – Кл·кг<sup>-1</sup>). 1 Кл·кг<sup>-1</sup> – експозиційна доза рентгенівського або  $\gamma$ -випромінювання, за якої у сухому атмосферному повітрі утворюються іони, що несуть електричний заряд кожного знаку, рівний 1 Кл. Одиницею поглиненої дози є грей (Гр) – доза, за якої 1 Дж енергії поглинається 1 кг матеріалу, що опромінюється. Швидкість нагромадження поглиненої дози називається потужністю поглиненої дози (одиниця  $R_{\text{погл}} - \text{Гр}\cdot\text{с}^{-1}$ ) [77].

Радіобіологічні реакції рослин на опромінення наступні:

- посилення ростових і формотворних процесів за дії малих доз радіації (короткострокова або тривала радіостимуляція). Реакція радіостимуляції відрізняється гармонічною інтенсифікацією усіх фізіологічних і пов'язаних з ними біохімічних процесів [77];

- порушення морфогенезу, обумовлені інактивацією меристем за більш високих доз опромінення: морфологічні аномалії, радіоморфози, відмирання коренів та пагонів, розтягнення вегетаційного періоду, відсутність репродуктивної фази розвитку. Загибель рослинного організму у відповідь на опромінення настає за дуже високих доз радіації і спостерігається не відразу після опромінення, але через певний проміжок часу, протягом якого гинуть меристематичні тканини [77];

- біохімічні і фізіологічні реакції на опромінення (аномальне нагромадження продуктів проміжного метаболізму). На порушення біохімічних процесів впливають як інактивація окремих ферментних систем, так і ураження загальної регуляції процесів в опроміненій рослині [77];

- генетичні uszkodження (соматичні мутації, генні мутації, хромосомні аберації, геномні мутації), які реалізуються у наступних поколіннях [77].

У радіаційному синдромі рослин можна бачити риси спільності із радіаційним синдромом тваринного організму: наявність критичних тканин і органів, однакові типи цитогенетичних uszkodжень, втрата контролю над інтегральними функціями організму, утворення соматичних мутацій, трансформація клітин і радіаційний канцерогенез [77].

## **5.5. Висновки до розділу**

У цьому розділі проаналізовано вплив антропогенних факторів навколишнього середовища на фізіолого-біохімічні реакції рослин, їх загальну адаптацію та накопичення вторинних метаболітів, якими є антиоксиданти. Досліджено механізм спричинення оксидативного стресу факторами людської діяльності, а саме: забруднення ґрунтів важкими металами та іншими хімічними речовинами (інсектициди та ін.), забруднення повітря промисловими викидами з наступним утворенням фітотоксичних оксидів, а також негативна дія іонізуючих випромінювань. Показано шляхи утворення АФК (активних форм кисню) у рослин під впливом даних факторів, та наслідки їх недостатнього знешкодження (невидимі, хронічні та видимі або гострі пошкодження рослин).

## ВИСНОВКИ

1. Теоретично обґрунтовано використання рослин родин *Althaea* та *Artemisia* у розробці препаратів з антиоксидантними властивостями завдяки високому в них вмісту цінних вторинних метаболітів. Для підвищення рівня синтезу цих сполук можливим є метод *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації, під час якої відбувається вбудовування неспецифічних *rol*-генів бактерії до геному рослини, що спричинює зміни метаболізму та появу «бородатих» коренів.

2. Порівнюючи результати скринінгу «бородатих» коренів з контрольними рослинами рослин можна дійти висновку, що і накопичення вторинних метаболітів, і ферментативна система значно відрізнялася від контролю і в більшості ліній показники були вищими, ніж в контролі. Скринінг проводили за такими параметрами: вміст пероксиду водню, флавоноїдів та загального білка, активність СОД та КАТ, а також здатність до інгібування DPPH-радикалів та відновлення катіонів заліза. Найвищим вміст  $H_2O_2$  у *A. officinalis* був у лінії №11 ( $19,077 \pm 0,279$  мкмоль/ г ВМ), у *A. tilesii* – лінія №7 ( $32,10 \pm 0,12$  мкмоль/ г ВМ); у *A. vulgaris* – лінія №7 ( $30,77 \pm 1,67$  мкмоль/ г ВМ). Найвищою активність каталази у *A. officinalis* була у лінії №9 ( $1,8 \pm 0,2 H_2O_2/мкг$  білка\*хв), у *A. tilesii* – лінія №10 ( $7,84 \pm 2,83 H_2O_2/мкг$  білка\*хв), у *A. vulgaris* – лінія №8 ( $10,4 \pm 1,12$  мкмоль  $H_2O_2/мкг$  білка\*хв). Найвищою активність СОД у *A. officinalis* була у лінії №11 ( $45,76 \pm 13,76$  од./мкг білка), у *A. tilesii* – лінія №4 ( $27,19 \pm 13,17$  од./мкг білка), у *A. vulgaris* – лінія №12 ( $52,84 \pm 12,6$  од./мкг білка). Найвищим вміст флавоноїдів у *A. officinalis* був у лінії №11 ( $4,416 \pm 0,3301$  мг RE/ г ВМ), у *A. tilesii* – лінія №7 ( $9,469 \pm 1,971$  мг RE/ г ВМ), у *A. vulgaris* – лінія №7 ( $10,066 \pm 0,477$  мг RE/ г ВМ). Найвищою АОА у *A. officinalis* була у лінії №11 ( $7,23$  мг ВМ), у *A. tilesii* – лінія №4 ( $3,21$  мг ВМ), у *A. vulgaris* – лінія №7 ( $2,02$  мг ВМ). Найвищою відновлювальна активність у *A. officinalis* була у лінії №11 ( $EC_{0,5} = 3,37$  мг ВМ), у *A. tilesii* – лінія №7 ( $EC_{0,5} = 1,42$  мг ВМ), у *A. vulgaris* – лінія №7 ( $EC_{0,5} = 1,39$  мг ВМ). Найвищим вміст білка у *A. officinalis* був у лінії №1 ( $29,94 \pm 0,35$  мг/ мл), у *A. tilesii* – лінія №3 ( $32,3 \pm 3,4$  мг/ мл), у

*A. vulgaris* – лінія №9 ( $21,6 \pm 0,41$  мг/ мл). Обраними для подальшої роботи за результатами скринінгу лініями «бородатих» коренів були наступні: *A. officinalis* – лінія № 11, *A. tilesii* – лінія №7, *A. vulgaris* – лінія №7, адже усі вони мали високі показники вмісту флавоноїдів, активності ферментативної системи, АОА та ВА.

3. Визначено, що серед ліній «бородатих» коренів з найвищими показниками АОА на рідкому середовищі МС з вмістом сахарози 20 г/л швидкість росту та приріст маси *A. vulgaris* був у 6,5 разів менший, ніж у інших видів. *A. tilesii* мала найвищий вміст флавоноїдів ( $7,92 \pm 1,23$  мг RE/ г ВМ, що у 8 разів вищий, ніж у інших видів), найвищу антиоксидантну активність ( $EC_{50} = 3,98$  мг ВМ, що у 5 разів вище, ніж у інших видів), найвищу відновлювальну активність ( $EC_{0,5} = 1,21$  мг ВМ, що у 4,5 разів вище, ніж у інших видів). Проте жодний з видів не зберіг того ж рівня накопичення вторинних метаболітів, антиоксидантної та відновлювальної активності при культивуванні на рідкому середовищі, що і на агаризованому. Це можна пояснити недостатньою оксигенацією культур та більшим накопиченням біомаси, а не вторинних метаболітів з часом.

4. Аналізуючи результати усіх проведених експериментів, можна зазначити, що *A. rhizogenes*-опосередкована трансформація беззаперечно впливає на функціонування системи антиоксидантного захисту рослин та накопичення вторинних метаболітів-антиоксидантів. Більш того, цей вплив не залежить від того, чи проведено трансформацію за допомогою дикого штаму агробактерій (А4), чи агробактерій з цільовими генами (ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини під контролем 35S промотора рСВ124 та під контролем МІІ промотора рСВ161), адже лінії відрізнялись не лише між видами та у порівнянні з контрольними рослинами, а і в межах одного виду: АОА відрізнялася у 3,7 разів у *A. officinalis* (лінії № 2 та 11), у 3,1 рази у *A. tilesii* (лінії № 4 та 8) та у 7,27 разів у *A. vulgaris* (лінії № 7 та 9).

5. За отриманими результатами комплексного дослідження доведено можливість використання культур «бородатих» коренів *A. tilesii*, *A. vulgaris* та *A. officinalis* як ліофілізованих препаратів спиртових та водних екстрактів у фармацевтичних цілях, оскільки такі препарати є натуральними антиоксидантами з широким спектром дії.

## СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kasote D. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications / D. Kasote, S. Katyare, M. Hegde [*et al.*] // International Journal of Biological Sciences. – 2015. – Vol. 11(8). – P. 982–991.
2. Xu D.-P. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources / D.-P. Xu, Y. Li, X. Meng, T. Zhou [*et al.*] // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18(1). – P. 96–128.
3. Kasote D. Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy / D. Kasote, S. Katyare, M. Hegde // Biofactors. – 2013. – Vol. 39. – P. 392–406.
4. Alam M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity / M. Alam, N. Bristi, M. Rafiquzzaman // Saudi Pharm J. – 2013. – Vol. 21. – P. 143–152.
5. Chand S. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: an overview/ S. Chand, R. Dave // Afr. J. Microbiol. Res. – 2009. – Vol. 3. – P. 981–996.
6. Carocho M. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives / M. Carocho, I. Ferreira IC. // Food Chem. Toxicol. – 2013. – Vol. 51. – P. 15–25.
7. Foyer C. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses / C. Foyer // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17. – P. 1866–1875.
8. Malik S. Chemical Profile and Biological Activities of Essential Oil from *Artemisia vulgaris* L. Cultivated in Brazil / S. Malik, L. de Mesquita, C. Silva [*et al.*] // Pharmaceuticals. – 2019. – Vol. 12(2). – P. 49–59.
9. Zaghlool S. Gastro-Protective and Anti-Oxidant Potential of *Althaea officinalis* and *Solanum nigrum* on Pyloric Ligation: Indomethacin-Induced Ulceration in

Rats / S. Zaghlool, A. Abo-Seif, M. Rabeh [et al.] // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – P. 1–32.

10. Бойко Г.В. Особенности распространения видов рода *Artemisia* L. флоры Украины / Г.В. Бойко // *Промышленная ботаника*. – 2013. – Вып. 13. – С. 73–79.

11. Hunt P. «Caiggluk» Tilesius Wormwood (Stinkweed): *Artemisia tilesii* / P.Hunt, S. Wright // *Alaska Department of Natural Resources*. – 2007. – P. 1–2.

12. Saarela J. Vascular plants of Victoria Island (Northwest Territories and Nunavut, Canada): a specimen-based study of an Arctic flora / J. Saarela, P. Sokoloff, L. Gillespie, R. Bull [et al.] // *PhytoKeys*. – 2020. – Vol. 141. – 330 p.

13. Native American Ethnobotany Database [Electronic resource]. – 2020. – Access mode: <http://naeb.brit.org/uses/search/?string=artemisia+tilesii/> (last access: 1.12.20). – Title from the screen.

14. Відкритий онлайн атлас-визначник рослин [Електронний ресурс]. – 2020. – Режим доступу: <https://www.plantarium.ru/> (дата звернення: 30.11.20). – Назва з екрана.

15. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А. М. Гродзінський. – К.: Українська Енциклопедія ім. М. Бажана, 1992. – 544 с.

16. Native American Ethnobotany Database [Електронний ресурс]. – 2020. – Access mode: <http://naeb.brit.org/uses/search/?string=artemisia+vulgaris/> (last access: 30.11.20). – Title from the screen.

17. Z. Zubair A Comprehensive Review with Pharmacological Potential of «Mother of Herbs» *Artemisia vulgaris* Linn / Z. Zubair, I. Shameem, M. Seyed // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – Vol. 9 (8). – P. 240–251.

18. Hwang Y. Isolation and identification of mosquito repellents in *Artemisia vulgaris* / Y. Hwang // *J. Chem. Ecol.* – 1985. – Vol. 11. – P. 1297–1306.

19. Ross I. *Althaea officinalis*. Medicinal Plants of the World / I. Ross // *Humana Press Inc.* – 2001. – Vol. 2. – P. 37–42.

20. Scandalios J. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses / J. Scandalios // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2005. – Vol. 38(7). – P. 995–1014.
21. Ahmad P. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress / P. Ahmad, C. Jaleel, M. Salem [*et al.*] // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2010. – Vol. 30(3). – P. 161–175.
22. He L. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species / L. He, T. He, S. Farrar [*et al.*] // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Vol. 44(2). – P. 532–553.
23. Olszowy M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? / M. Olszowy // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2019. – Vol. 144. – P. 135–143.
24. Zhu C. Biofortification of plants with altered antioxidant content and composition: genetic engineering strategies / C. Zhu, G. Sanahuja, D. Yuan [*et al.*] // *Plant Biotechnology Journal*. – 2012. – Vol. 11(2). – P. 129–141.
25. Kowalczyk T. Transgenesis as a Tool for the Efficient Production of Selected Secondary Metabolites from in Vitro Plant Cultures / T. Kowalczyk, S. Wieczfinska, E. Skała [*et al.*] // *Plants*. – 2020. – Vol. 9(2). – P. 1–21.
26. Wang Y. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms / Y. Wang, S. Chen, O. Yu // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 91(4). – P. 949–956.
27. Srivastava S. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites / S. Srivastava, A. Srivastava // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2007. – Vol. 27(1). – P. 29–43.
28. Ono N. The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities / N. Ono, L. Tian // *Plant Science*. – 2011. – Vol. 180(3). – P. 439–446.
29. Pistelli L. Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production / L. Pistelli, A. Giovannini, B. Ruffoni [*et al.*] // *Bio-Farms for Nutraceuticals*. – 2010. – P. 167–184.



30. Kim S.-E. Transgenic sweetpotato plants overexpressing tocopherol cyclase display enhanced  $\alpha$ -tocopherol content and abiotic stress tolerance / S.-E. Kim, C.-J. Lee, C. Ji // *Plant Physiology et Biochemistry*. – 2019. – Vol. 144. – P. 1–32.
31. Ji C. Molecular characterization of tocopherol biosynthetic genes in sweetpotato that respond to stress and activate the tocopherol production in tobacco / C. Ji, Y.-H. Kim, H. Kim [*et al.*] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2016. – Vol. 106. – P. 118–128.
32. Liu H. Overexpression of a harpin-encoding gene popW from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants / H. Liu, Y. Wang, X. Zhou [*et al.*] // *Plant Cell Reports*. – 2016. – Vol. 35(6). – P. 1333–1344.
33. Seong E. Antisense-overexpression of the MsCOMT gene induces changes in lignin and total phenol contents in transgenic tobacco plants / E. Seong, J. Yoo, J. Lee [*et al.*] // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – Vol. 40(2). – P. 1979–1986.
34. Ghimire B. Improved antioxidant activity in transgenic *Perilla frutescens* plants via overexpression of the  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase ( $\gamma$ -tmt) gene / B. Ghimire, E. Seong, C. Lee [*et al.*] // *Protoplasma*. – 2015. – Vol. 252(5). – P. 1285–1290.
35. Jia D. An apple (*Malus domestica*) NAC transcription factor enhances drought tolerance in transgenic apple plants / D. Jia, Q. Jiang, S. van Nocker, X. Gong [*et al.*] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2019. – Vol. 139. – P. 504–512.
36. Kumar D. Modulation of antioxidant machinery in  $\alpha$ -tocopherol-enriched transgenic *Brassica juncea* plants tolerant to abiotic stress conditions / D. Kumar, M. Yusuf, P. Singh [*et al.*] // *Protoplasma*. – 2013. – Vol. 250(5). – P. 1079–1089.
37. Jayaraj J. Transgenic carrot plants accumulating ketocarotenoids show tolerance to UV and oxidative stresses / J. Jayaraj, Z. Punja // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2008. – Vol. 46(10). – P. 875–883.
38. Pierce E. C. Ketocarotenoid Production in Soybean Seeds through Metabolic Engineering / E. Pierce, P. LaFayette, M. Ortega [*et al.*] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10(9). – P. 1–15.

39. Zuk M. Engineering Flax Plants To Increase Their Antioxidant Capacity and Improve Oil Composition and Stability / M. Zuk, A. Prescha, M. Stryczewska [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2012. – Vol. 60(19). – P. 5003–5012.
40. Park S.-I. Improved stress tolerance and productivity in transgenic rice plants constitutively expressing the *Oryza sativa* glutathione synthetase OsGS under paddy field conditions / S.-I. Park, Y.-S. Kim, J.-J. Kim [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2017. – Vol. 215. – P. 39–47.
41. Chen J. Overexpression of HvHGGT Enhances Tocotrienol Levels and Antioxidant Activity in Barley / J. Chen, C. Liu, B. Shi [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2017. – Vol. 65(25). – P. 5181–5187.
42. Hemavathi C. Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses / C. Hemavathi, C. Upadhyaya, N. Akula [et al.] // Biotechnology Letters. – 2009. – Vol. 32(2). – P. 321–330.
43. Zhu L. Enhanced expression of EsWAX1 improves drought tolerance with increased accumulation of cuticular wax and ascorbic acid in transgenic *Arabidopsis* / L. Zhu, J. Guo, C. Zhou // Plant Physiology and Biochemistry. – 2014. – Vol. 75. – P. 24–35.
44. Piąteczak E. Antioxidant Properties of Methanol Extracts from the Shoots and Roots of pRi-Transformed Plants of *Rehmannia glutinosa* Libosch / E. Piąteczak, M. Debska, B. Kontek [et al.] // Acta poloniae pharmaceutica. – 2016. – Vol. 73. – P. 433–438.
45. Bergier K. Antioxidant potential of *Agrobacterium*-transformed and non-transformed *Physalis ixocarpa* plants grown *in vitro* and *ex vitro* / K. Bergier, E. Kuzniak, M. Skłodowska // Postepy higieny i medycyny doświadczalnej. – 2012. – Vol. 66. – P. 976–982.
46. Matvieieva N. Flavonoid content and antioxidant activity of *Artemisia vulgaris* L. «hairy» roots / N. Matvieieva, K. Drobot, V. Duplij [et al.] // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2019. – Vol. 49(1). – P. 1–6.

47. El-Esawi M. Genetic Transformation and Hairy Root Induction Enhance the Antioxidant Potential of *Lactuca serriola* L. / M. El-Esawi, M. Elkelish, H. Elansary [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–8.
48. Gai Q.-Y. Establishment of Hairy Root Cultures by Agrobacterium Rhizogenes Mediated Transformation of *Isatis Tinctoria* L. for the Efficient Production of Flavonoids and Evaluation of Antioxidant Activities / Q.-Y. Gai, J. Jiao, M. Luo [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10(3). – P. 1–15.
49. Jiao J. Efficient Production of Isoflavonoids by *Astragalus membranaceus* Hairy Root Cultures and Evaluation of Antioxidant Activities of Extracts / J. Jiao, Q.-Y. Gai, Y.-J. Fu [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62(52). – P. 12649–12658.
50. Thiruvengadam M. Production of anthraquinones, phenolic compounds and biological activities from hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb / M. Thiruvengadam, N. Praveen, E.-H. Kim [et al.] // Protoplasma. – 2013. – Vol. 251(3). – P. 555–566.
51. Wang B. Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures / B. Wang, G. Zhang, L. Zhu [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2006. – Vol. 53(1). – P. 101–104.
52. Zafari S. A comparative study of biotechnological approaches for producing valuable flavonoids in *Prosopis farcta* / S. Zafari, M. Sharifi, N. Chashmi // Cytotechnology. – 2018. – Vol. 70(2). – P. 603–614.
53. Tavassoli P. Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.) / P. Tavassoli, A. Safipour // 3 Biotech. – 2018. – Vol. 8(8). – P. 1 – 8.
54. Матвєєва Н. А. Створення рослин-продуцентів біологічно активних сполук шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації: дис. докт. біол. наук: 03.00.20 / Матвєєва Надія Анатоліївна; НАН України. – Київ, 2015. – 361 с.

55. Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems // *Journal of bacteriology*. – 2004. – Vol. 186(3). – P. 595–600.
56. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
57. Aebi H. Catalases in vitro / H. Aebi // *Methods in Enzymol.* – 1984. – 105. – P. 121–126.
58. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
59. Beyer W. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in compositions / W. Beyer, I. Fridovich // *Analit. Biochem.* – 1987. – Vol. 161(2). – P. 559–566.
60. Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay / K. Pyrzynska // *Food Analytical Methods*. – 2014. – Vol. 7(9). – P. 1776–1782.
61. Semenov V. Method for determining the antioxidant activity of biological material / V. Semenov, A. Yarosh // *Ukrainian Biochemical Journal*. – 1985. – Vol. 57(3). – P. 50–52.
62. Zhao H. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties / H. Zhao, W. Fan, J. Dong [*et al.*] // *Food Chem.* – 2008. – Vol. 107. – P. 296–304.
63. Matvieieva N. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia tilesii* Ledeb / N. Matvieieva, B. Morgun, O. Lakhneko // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2020. – Vol. 152(10). – P. 177–183.
64. Закон України «Про охорону праці» від 14.10.1992 № 2694-XII (нова редакція від 21.11.2002 №229-IV).
65. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация ГОСТ 12.0.003-74. – [Действующий от 1974-10-13]. – М.: Стандартинформ 2006. – 4 с. – (Межгосударственный стандарт).

66. ДСН 3.3.6.042-99. Санитарные нормы микроклимата производственных помещений.
67. ДСН 3.3.6.037-99. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку.
68. СН 4557-88. Санитарные нормы ультрафиолетового излучения в производственных помещениях.
69. ГОСТ 12.1.005-88. Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
70. ДСН 3.3.6.042-99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень. Постанова № 42 від 01.12.1999.
71. ГОСТ 12.1.029-80 Система засобів безпеки праці. Засоби і методи захисту від шуму. Класифікація.
72. ГОСТ 12.4.080-79 ССБТ. Светофильтры стеклянные для защиты глаз от вредных излучений на производстве. Технические условия.
73. Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень. Навч. посібник. / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
74. ІКБГІ НАН України. Інструкція №2 з техніки безпеки для працюючих в лабораторії; НАН України. – Київ. – 2015. – 5 с.
75. Методичні вказівки до дипломного проекту «Розрахунок загальнообмінної вентиляції» з розділу «Охорона праці» / Укладачі: Л. О. Гурець, О. П. Будьоний. – Суми: Видавництво СумДУ, 2010. – 23 с.
76. Treshow M. Pollution Effects on Plant Distribution / M. Treshow // Environmental Conservation. – 1980. – Vol. 7(04). – P. 279 – 286.
77. Адаптація рослин до антропогенних чинників (підручник для студентів спеціальностей біологія, екологія та середня освіта вищих навчальних закладів) / Ю. Г. Приседський, Ю. В. Лихолат // ДонНУ імені Василя Стуса. – Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД». – 2017. – 98 с.
78. Ahmad I. Effects of Different Metal Stresses on the Antioxidant Defense Systems of Medicinal Plants / I. Ahmad, A. Mabood, A. Ahmad, H. Tabassum // Reactive

Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. – 2017. – P. 215–256.

79. Mikhailenko O. Effect of ecological factors on the accumulation of phenolic compounds in *Iris* species from Latvia, Lithuania and Ukraine / O. Mikhailenko, Z. Gudžinskas, V. Kovalyov *et al.*// *Phytochemical Analysis*. – 2020. – Vol. 31(5). – P. 1–19.

80. Li H. Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods / H. Li, R. Tsao, Z. Deng // *Canadian Journal of Plant Science*. – 2012. – Vol. 92. – P. 1101–1111.

81. Yuan Y. The Effects of Ecological Factors on the Main Medicinal Components of *Dendrobium officinale* under Different Cultivation Modes / Y. Yuan, X. Tang, Z. Jia *et al.*// *Forests*. – 2020. – Vol.11(94). – P. 1–16.

82. Zargoosh Z. Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss / Z. Zargoosh, M. Ghavam, G. Bacchetta, T. Gianluigi, A. Tavili // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9(10). – P. 1–15.

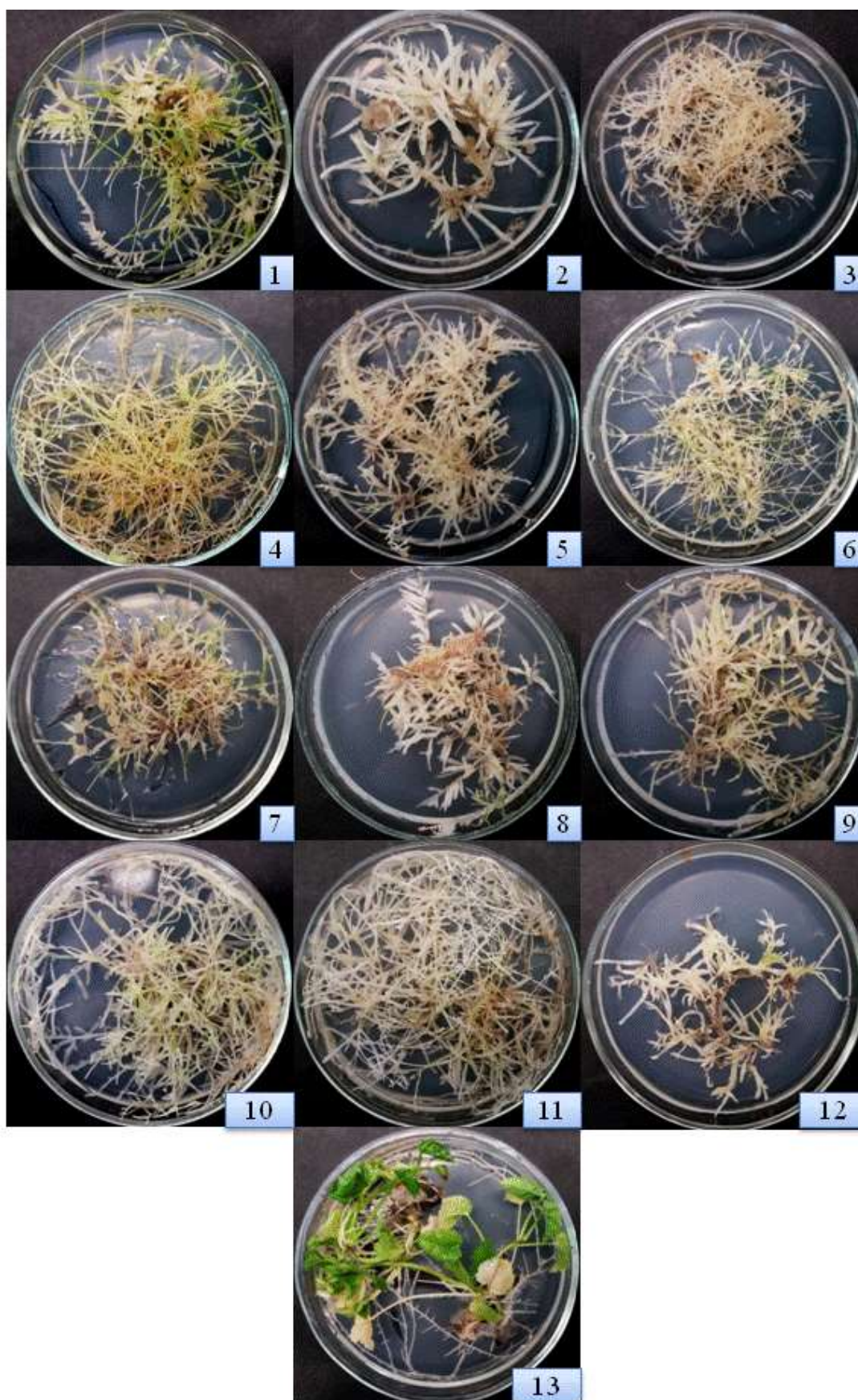
83. Caldwell R. Effects of Air Pollution on Vegetation / R. Caldwell // *Progressive Agriculture in Arizona*. – 1969. – Vol. 21(2). – P. 10–11.

84. Pukacki P. Effects of sulphur, fluoride and heavy metal pollution on the chlorophyll fluorescence of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles / P. Pukacki // *Dendrology*. – 2000. – Vol. 45. – P. 83–88.

85. Gupta G. Nitrogen dioxide effects on photosynthesis / G. Gupta Gian, Ch. Mulchi // *J. environment Quol.* – 1988. – Vol. 17(1). – P. 143–146.

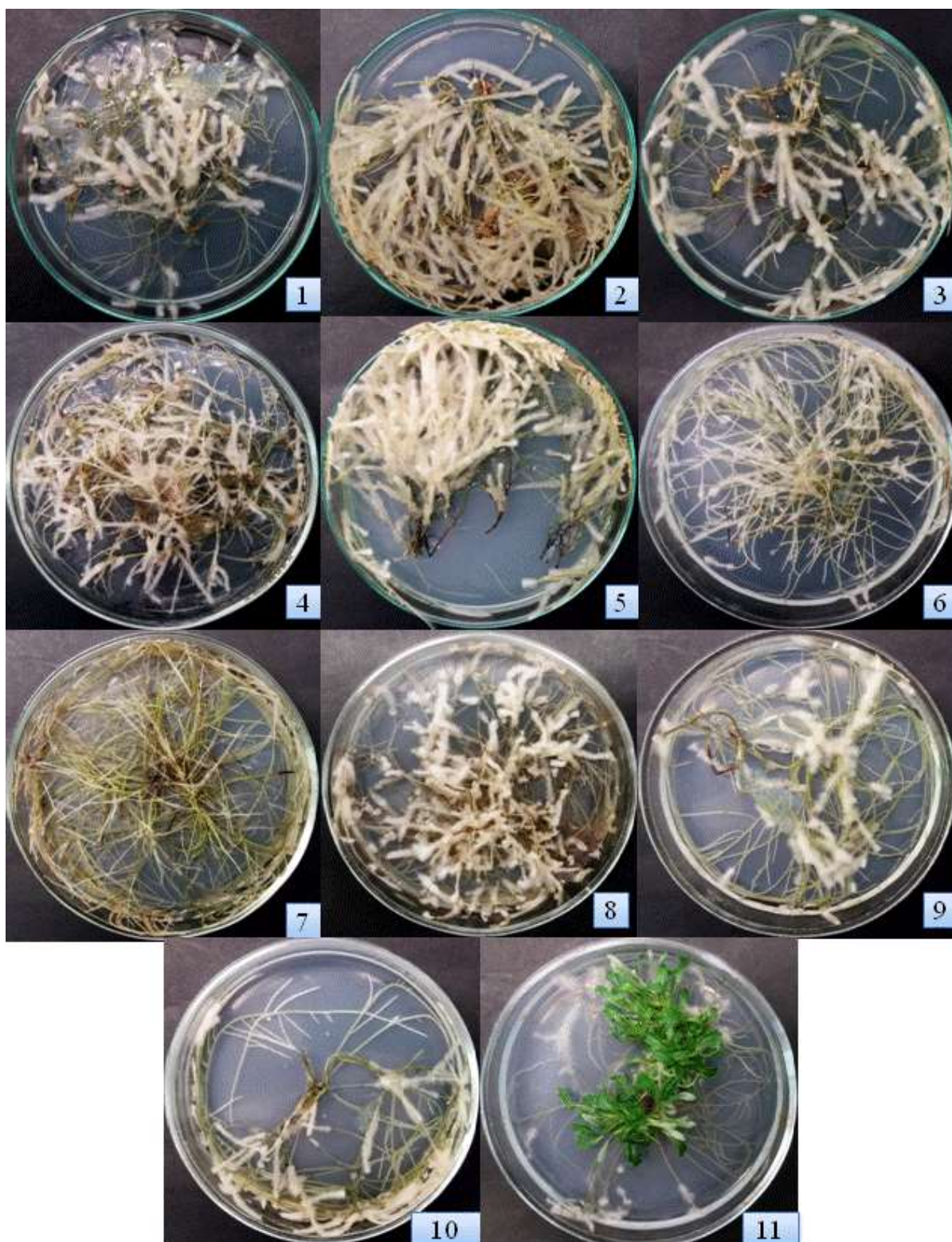
86. Caplin N. Ionizing Radiation, Higher Plants, and Radioprotection: From Acute High Doses to Chronic Low Doses / N. Caplin, N. Willey // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 847–866.

Зовнішній вигляд «бородатих» та контрольних (13) коренів *Althaea officinalis*





Зовнішній вигляд «бородатих» та контрольних (11) коренів *Artemisia tilesii*





Зовнішній вигляд «бородатих» та контрольних коренів *Artemisia vulgaris*

