

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК НА ПРОТОПЛАСТИ ТЮТЮНУ ДЛЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ ПІДХОДІВ У БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН

На сьогодні у рослинній біотехнології одним із найбільш актуальних напрямків є розробка вдосконалених методів доставки сполук інтересу (ДНК, візуалізувальні мітки тощо) у клітини рослин з використанням вуглецевих нанотрубок (ВНТ). Значний потенціал ВНТ у даній сфері обумовлений їх нанорозміром у поєднанні із рядом структурних особливостей [1]. Водночас, прогрес у даному напрямі значною мірою лімітується відсутністю вичерпної інформації з приводу механізмів взаємодії та впливу ВНТ на рослинні клітини. Різні дослідження відзначають як позитивний, так і негативний ефект ВНТ на ріст та розвиток рослин [2–4]. Механізми дії ВНТ пов'язують зі змінами у функціонуванні судинної системи рослин, внаслідок фізичного проникнення у неї нанотрубок, та варіюванням експресії генів у відповідь на спровокований нанотрубками стрес. Результати вивчення взаємодій ВНТ із рослинами на клітинному рівні свідчать про здатність нанотрубок проникати через клітинну стінку та накопичуватися у різних субклітинних структурах, таких як лізосоми, мітохондрії, хлоропласти, вакуолі, ядро тощо [5]. Характер впливу ВНТ на рослинні клітини може варіювати від позитивного у нижчих концентраціях до негативного у високих. До механізмів, що спричиняють негативний вплив ВНТ на клітини рослин відносять фізичне ушкодження клітинних структур нанотрубками, порушення енергетичного метаболізму, накопичення реактивних форм кисню та генерування оксидативного стресу [6]. При цьому, біологічно-сумісна функціоналізація першопочатково гідрофобних ВНТ з подальшим диспергуванням їх у водному середовищі, зазвичай, розглядається як фактор суттєвого зниження токсичності ВНТ для рослин. Остання ж, у свою чергу, здебільшого демонструє дозо- та часозалежний характер, а також визначається рядом характеристик ВНТ, таких як кількість їх шарів, довжина, тип поверхневої модифікації тощо.

У роботі було досліджено вплив нековалентно функціоналізованих з використанням біологічних молекул різної природи одношарових та ба-

гатошарових ВНТ (ОШВНТ та БШВНТ, відповідно) на протопласти мезофілу листків тютюну *Nicotiana tabacum* L. Отримані результати мають значення для розробки методів використання функціоналізованих ВНТ у біотехнології рослин, зокрема для створення підходів доставки ДНК у рослинні клітини у генетичній інженерії.

Матеріали і методи

У дослідженні використовували комерційні ОШВНТ (ARS002 “Argy”, Німеччина) та БШВНТ (698849 “Aldrich”, США), синтезовані методом хімічного паро-фазного осадження. Функціоналізацію ВНТ, з метою диспергування у воді, проводили за раніше розробленою методикою [7] з використанням таких молекул біологічного походження як дволанцюгова плазмідна ДНК (0,5 мг/мл), ізольована за методом [8] із попередньо трансформованих компетентних клітин *Escherichia coli* штаму DH5б; бичачий сироватковий альбумін (БСА) (10 мг/мл) (“Sigma”, США); водний екстракт скловидного тіла (ЕСТ) (“Біофарма”, Україна), що містить білки та гіалуронову кислоту. Розчини готували з використанням бідистильованої води, отриманої на приладі Barnstead Easypure II (“Thermo Scientific”, США). Усі зразки обробляли ультразвуком частотою 22 кГц (Unitra UM-4, “Unima Olsztyn”, Польща) за температури 25 °С протягом 60 хв. Концентрація ВНТ у всіх зразках становила 1 мг/мл. Асептичні рослини тютюну *N. tabacum*, отримані шляхом пророщування стерилізованого у 5 %-му розчині гіпохлориту натрію (NaOCl) протягом 15 хв насіння, вирощували у закритих скляних ємкостях на агаризованому середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [9], що містило 8 г/л агару, за температури 24 °С та 16-годинному фотоперіоді.

Протопласти з клітин мезофілу листків тютюну ізолювали у асептичних умовах за методами, що описані у [10, 11]. Молоді листки тютюну, нарізані тонкими смужками від центральної жилки, інкубували протягом 16 год у суміші ферментів, що містила 0,4 % целюлази Onozuka R-10

("Serva", Німеччина), 0,3 % дріцелазу ("Sigma", США), 0,5 М сахарози та 5 мМ CaCl₂ за температури 24 °С. Протопласти у ферментному розчині фільтрували через нейлоновий фільтр із діаметром пор 0,2 мм. Фільтрат збирали у стерильну пробірку і по стінці нашаровували зверху 2 мл розчину W5 (154 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 125 мМ CaCl₂; 5 мМ глюкози; рН 5,7) таким чином, щоб нижній і верхній розчини не змішувалися. Центрифугували при 1000 об/хв протягом 2 хв (ЦЛУ-1 "Орбіта", "Ветінструмент", Україна) і відбирали прошарок живих протопластів, що по градієнту розташовувалися на межі двох розчинів. Ресуспендували протопласти у 10 мл розчину W5, центрифугували протягом 2 хв при 1000 об/хв. Відбирали надосадову рідину та ресуспендували протопласти у середовищі 8p [12]. З метою оцінки пошкоджувального впливу ВНТ на протопласти до ряду аліквот суспензії щойно виділених протопластів, ресуспендованих у живильному середовищі 8p у пластикових чашках Петрі (d = 35 мм), додавали колоїдний розчин функціоналізованих ВНТ з розрахунку досягнення кінцевої концентрації ВНТ 1, 15, 30, 45, 60 та 75 мкг/мл. Після цього, протопласти витримували протягом доби за температури 24 °С на розсіяному світлі. У якості контролю використовували протопласти, що культивували у живильному середовищі 8p. Оцінювали виживання протопластів за допомогою мікроскопа Axioskop 40 ("Carl Zeiss", Німеччина), об'єктиву 40X із вбудованим фотоапаратом. Комп'ютерну обробку мікрофотографій проводили з використанням програмного забезпечення AxioVision LE 4.8.2.0 ("Carl Zeiss MicroImaging GmbH", Німеччина, 2010). У візуальній ідентифікації стану протопластів керувалися тим фактом, що повноцінні життєздатні протопласти, мають сферичну форму та рівний контур [13]. Підрахунок протопластів здійснювався за допомогою камери Горяєва.

Результати та обговорення

У результаті проведеної роботи було досліджено вплив нековалентно функціоналізованих ОШВНТ та БШВНТ на протопласти мезофілу листків рослин тютюну *N. tabacum*. Чисті ВНТ володіють високою гідрофобністю, що часто посилює їх негативний вплив на живі об'єкти та обмежує спектр їх застосувань. Оскільки у біологічних системах основним розчинником і дисперсним середовищем є вода, подолання гідрофобності ВНТ є базовим етапом усіх підходів, що передбачають їх використання у даній сфері. Водночас, використання багатьох існуючих методів

ковалентної функціоналізації ВНТ у біологічних дослідженнях лімітується надлишковою реактивністю та токсичністю продукту, а також технологічною складністю, екологічною небезпечністю та високою енерговитратністю процесу функціоналізації [14]. Тому, з метою створення застосовних у біотехнології рослин підходів на основі використання ВНТ, у проведеній роботі із встановлення впливу модифікованих ВНТ на рослинні клітини, застосовували нековалентну опосередковану ультразвуковою обробкою екологічно сумісну функціоналізацію нанотрубок. Було використано три типи функціоналізованих покриттів, які забезпечували формування стабільних водних дисперсних систем ВНТ, а саме: нуклеїнову кислоту – ДНК, білок – БСА та комплекс сполук водного екстракту скловидного тіла – ЕСТ, основними компонентами якого є білки та гіалуронова кислота. Дані речовини є не токсичними та мають біологічне походження, що дозволяє припустити їх біологічну сумісність та відсутність негативного впливу на клітини рослин у складі покриття ВНТ, порівняно із рядом синтетичних сполук, що використовуються для функціоналізації. Окрім того, подібні функціоналізовані покриття здатні частково знижувати негативний вплив ВНТ на клітини за рахунок ефекту маскування.

У проведеному дослідженні протопласти ізолювали із мезофілу листків асептичних рослин тютюну *N. tabacum* методом ензиматичного гідролізу компонентів клітинної стінки. Внаслідок руйнування клітинної стінки, єдиним зовнішнім бар'єром протопластів є плазматична мембрана, що полегшує проникнення екзогенних речовин усередину та значно підвищує чутливість протопластів як тест-системи [13]. Середній вихід протопластів у результаті процедури ізолювання складав $\approx 1,5 \times 10^6$ життєздатних протопластів на 1 г тканини листка. Життєздатні протопласти ідентифікували візуально за морфологічними показниками, такими як сферична форма, рівний контур плазматичної мембрани, відсутність видимих ушкоджень. Через добу культивування виживання протопластів у контролі складало 91 %. У результаті дослідження було виявлено відсутність залежності ступеня пошкоджувального впливу ВНТ від використаного функціоналізовального покриття (рис. 1).

Так, для кожної використаної концентрації ОШВНТ та БШВНТ, відсоток живих протопластів майже не відрізнявся при використанні трьох описаних функціоналізованих агентів. Це підтверджує припущення про застосовність даних ти-

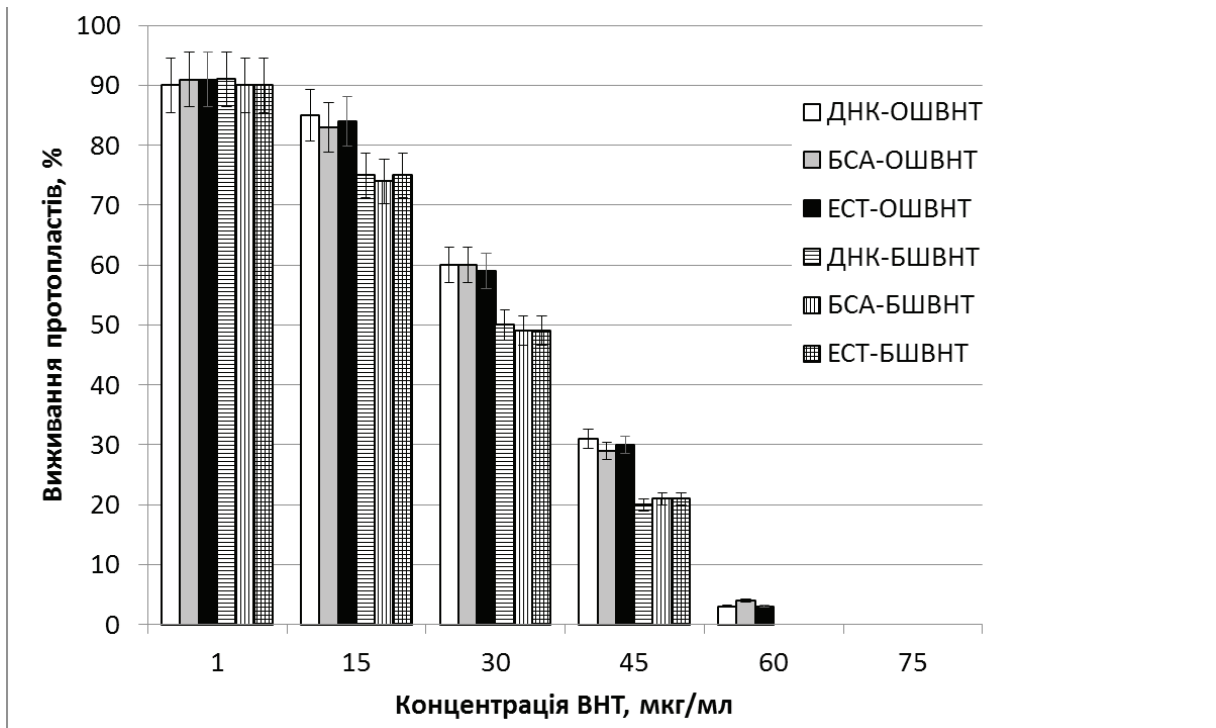


Рис. 1. Залежність виживання протопластів мезофілу листків тютюну від концентрації ОШВНТ і БШВНТ у середовищі та типу їх функціоналізуючого покриття (ДНК, БСА, ЕСТ). 24 год інкубації

пів функціоналізації для розробки біотехнологічних підходів на основі використання ВНТ. Водночас, було показано підвищений негативний вплив БШВНТ на виживання протопластів, порівняно із ОШВНТ. Як видно з рис. 1, виживання протопластів через 24 год у зразках з концентрацією ОШВНТ та БШВНТ 1 мкг/мл не відрізнялося від виживання у контролі. При збільшенні концентрації ВНТ, спостерігалось пропорційне підвищення частки загинуваних протопластів. При цьому, у зразках, що містили БШВНТ, не залежно від типу функціоналізуючого покриття, гинуло більше протопластів, ніж у зразках із ОШВНТ. Загалом, для трьох типів функціоналізуючого покриття, середні значення виживання протопластів при інкубуванні із функціоналізованими ОШВНТ і БШВНТ склали: при концентрації 1 мкг/мл – 91 % та 90 %, відповідно, при концентрації 15 мкг/мл – 84 % та 75 %, 30 мкг/мл – 60 % та 49 %, 45 мкг/мл – 30 % та 21 %, 60 мкг/мл – 3 % та 0 %, 75 мкг/мл – усі протопласти гинули. Підвищення кількості загинуваних протопластів, розрив їх мембран та утворення агломератів при зростанні концентрації ВНТ спостерігалось і у зразках, що містили ОШВНТ (рис. 2). Проте для останніх можна стверджувати наявність більш широкого діапазону застосовних концентрацій, ніж для БШВНТ. Виявлена відмін-

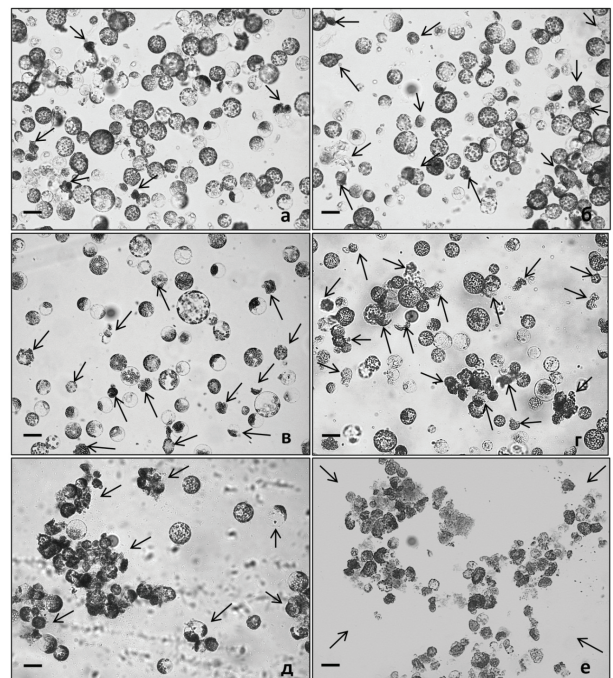


Рис. 2. Результати дії різних концентрацій функціоналізованих бичачим сироватковим альбуміном ОШВНТ на протопласти мезофілу листків тютюну: а – 1 мкг/мл; б – 15 мкг/мл; в – 30 мкг/мл; г – 45 мкг/мл; д – 60 мкг/мл; е – 75 мкг/мл. 24 год інкубування. Стрілками вказано загинувлі протопласти та їх агломерати. Масштабна поділка 20 мкм

ність, очевидно, зумовлена структурними особливостями БШВНТ, порівняно із ОШВНТ, зокрема – меншою вираженістю у них ефекту одновимірності, властивого нанотрубкам. Загалом, нанорозмір ВНТ, очевидно, виступав критичним фактором встановленого їх негативного впливу на виживання протопластів *N. tabacum*. Так, макророзмірний вуглецевий матеріал – активоване вугілля, широко використовується у культурі рослин *in vitro* для покращення процесів ембріогенезу, калусоутворення, укорінення, росту пагонів тощо [15], а також регенерації протопластів [16] і не виявляє негативного впливу на рослинні клітини.

У подібному дослідженні описано загибель значної частини протопластів *Arabidopsis thaliana* L. після доби інкубування із нефункціоналізованими ОШВНТ у концентрації 25 мкг/мл [17]. Інші автори відмічають загибель більше 80 % протопластів *A. thaliana* протягом 48 год культивування у середовищі із нефункціоналізованими ОШВНТ у концентрації 50 мкг/мл [5]. Водночас, нижчі концентрації нанотрубок були асоційовані із виживанням протопластів та незначною вираженістю негативних ефектів. Такі дані, загалом, узгоджуються із отриманими у нашому дослідженні та дозволяють говорити про відсутність надлишкової токсичності ВНТ, спричиненої функціоналізуючим покриттям. Варто, також, зазначити, що ряд досліджень впливу нефункціоналізованих ВНТ на рослинні клітини, вкриті клітинною стінкою, демонструють значний негативний ефект таких ВНТ на клітини. Так, у дослідженні дії нефункціоналізованих БШВНТ на клітини суспензійної культури рису *Oryza sativa* L. показано, що при концентрації БШВНТ 20 мкг/мл через 48 год культивування більшість клітин мали змінену морфологію та ознаки вступу на шлях загибелі, тоді як при концентрації 80 мкг/л у всіх клітин через 48 годин спо-

стерігали некроз [18]. При дослідженні впливу чистих БШВНТ на клітини суспензійної культури *A. thaliana* було показано суттєве зниження показників виживання клітин вже через добу при концентрації 10 мкг/мл [19]. У проведеному ж нами дослідженні, при концентраціях ВНТ описаних у роботах [18, 19] виживання протопластів, що є більш чутливими об'єктами, порівняно із рослинними клітинами, вкритими клітинними стінками, знижувалося лише на 10–20 %, порівняно з контролем. У даному випадку можна припустити зниження негативного впливу ВНТ на виживання протопластів, у зв'язку із маскувальним ефектом використаного функціоналізуючого покриття.

Висновки

У результаті проведеного дослідження було встановлено дозозалежний негативний вплив ВНТ на виживання протопластів мезофілу листків тютюну. Виживання протопластів більш стрімко знижувалося при збільшенні концентрації БШВНТ, тоді як зростання концентрації ОШВНТ спричиняло менш інтенсивний приріст частки загиблих протопластів. Не було відмічено змін показників виживання протопластів при дії однакових концентрацій ВНТ, функціоналізованих різними молекулами, що свідчить про однакову біологічну сумісність усіх трьох типів використаних функціоналізуючих покриттів. Загалом, було показано, що як для ОШВНТ, так і для БШВНТ, нековалентно функціоналізованих ДНК, БСА та ЕСТ, наявний діапазон концентрацій, асоційованих із мінімальним проявом негативного впливу на виживання протопластів. Отримані результати показують можливість створення нових підходів у біотехнології з використанням функціоналізованих ВНТ для доставки цільових молекул у рослинні клітини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ramos-Perez V., Cifuentes A., Coronas N., Pablo A., de Borrrys S. Modification of carbon nanotubes for gene delivery vectors // In: Nanomaterial Interfaces in Biology: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Bergese P., Hamad-Schifferli K. (eds.). – New York: Springer Science, 2013. – 1025. – P. 261–269.
2. Lin S., Reppert J., Hu Q., Hudson J.S., Reid M.L., Ratnikova T.A., Rao A.M., Luo H., Ke P.C. Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants // Small. – 2009. – 5. – P. 1128–1132.
3. Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M., Xu Y., Li Z., Watanabe F., Biris A.S. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth // ACS Nano. – 2009. – 3, N 10. – P. 3221–3227.
4. Tripathi S., Sonkar S.K., Sarkar S. Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes // Nanoscale. – 2011. – 3. – P. 1176–1181.
5. Yuan H., Hu S., Huang P., Song H., Wang K., Ruan J., He R., Cui D.X. Single walled carbon nanotubes exhibit dual-phase regulation to exposed *Arabidopsis* mesophyll cells // Nanoscale Res. Lett. – 2011. – 6. – P. 44–53.
6. Karousis N., Tagmatarchis N., Tasis D. Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes // Chem. Rev. – 2010. – 110, N 9. – P. 5366–5397.

7. Бурлака О.М., Пірко Я.В., Смертенко П.С., Коломис О.Ф., Глазунова В.О., Константинова Т.С., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Функціоналізація вуглецевих нанотрубок за допомогою молекул біологічного походження різної природи // Доповіді НАН України. – 2015. – № 2. – С. 137–144.
8. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene. – 1990. – 96. – P. 23–28.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
10. Potrykus I., Shillito R.D. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration // Methods Enzymol. – 1986. – 118. – P. 549–578.
11. Gamborg O.L., Shyluk J.P., Shahin E.A. Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture, ed. T.A. Thorpe. – New York: Academic Press, 1981. – P. 115–153.
12. Kao K.N., Michayluk M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. – 1975. – 126. – P. 105–110.
13. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
14. Virkutyte J., Varma R.S. Green synthesis of metal nanoparticles: Biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization // Chem. Sci. – 2011. – 2. – P. 837–846.
15. Pan M.J., van Staden J. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review // Plant Growth Regulation. – 1998. – 26 (3). – P. 155–163.
16. Kunitake H., Nakashima T., Mori K., Tanaka M., Mii M. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) by adding activated charcoal into protoplast culture medium // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1995. – 43. – P. 59–65.
17. Shen C.-X., Zhang Q.-F., Li J., Bi F.C., Yao N. Induction of programmed cell death in *Arabidopsis* and rice by single-walled carbon nanotubes // Am. J. Bot. – 2010. – 97, N 10. – P. 1602–1609.
18. Tan X.M., Lin C., Fugetsu B. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells // Carbon. – 2009. – 47, N 15. – P. 3479–3487.
19. Lin C., Fugetsu B., Su Y., Watari F. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* T87 suspension cells // J. Hazard. Mater. – 2009. – 170, N 2–3. – P. 578–583.

BURLAKA O.M., PIRKO YA.V., YEMETS A.I., BLUME YA.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. of Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net*

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CARBON NANOTUBES ON TOBACCO PROTOPLASTS FOR THE DEVELOPMENT OF NOVEL APPROACHES IN PLANT BIOTECHNOLOGY

Aims. In order to develop the background for the creation of novel carbon nanotubes (CNTs) based approaches in plant biotechnology the effect of non-covalently functionalized single-walled and multi-walled CNTs (SWCNTs and MWCNTs, respectively) on tobacco *Nicotiana tabacum* L. mesophyll protoplasts was investigated. Factors influencing the viability of protoplasts exposed to CNTs, namely dose, CNTs type, functionalization type, were determined. **Methods.** Physical and chemical CNTs surface modification methods, *in vitro* plant culture approaches and microscope studies were combined to evaluate the effect of CNTs on protoplasts. **Results.** The dose-dependent adverse impact of CNTs on viability of protoplasts was observed. However protoplasts demonstrated higher viability when exposed to SWCNTs in compare to MWCNTs. Absence of change in protoplasts viability was observed when protoplasts were exposed to identical concentrations of CNTs functionalized using different molecules, indicating equal biological compatibility of all three types of used functionalization coatings.

Keywords: carbon nanotubes – CNTs, functionalization, protoplasts, plant biotechnology.