

Міністерство освіти і науки України
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

Кваліфікаційна наукова праця
На правах рукопису

ГАЛИЧ ТАРАС ВАДИМОВИЧ

УДК [57+61]::539.1.04:614.875:575.224.23

ДИСЕРТАЦІЯ

Зв'язок ураження геному за різних типів опромінення із
стимуляцією утворення фармацевтичних сполук *Matricaria chamomilla* L.

091 «Біологія»

09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання
ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне
джерело _____ Тарас Галич

Науковий керівник: доктор біологічних наук, Кравець Олександра
Петрівна

Київ 2023

ЗМІСТ

АННОТАЦІЯ.....	5
SUMMARY.....	14
ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ...	20
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	23
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН РОЗВИТКУ РАДІАЦІЙНИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ: ЗДОБУТКИ І ВИКЛИКИ.....	34
1.1 Історія біотехнологічного використання різних видів опромінення.....	34
1.2. Досвід застосування опромінення для стимуляції напрацювання рослиною лікарських речовин.....	38
1.3. Системність відгуку рослини на радіаційний стрес та теоретичні проблеми створення радіаційних технологій.....	39
1.4. Механізми і фактори стійкості первинної структури ДНК.	43
1.5 Функціональні механізми забезпечення стабільності ДНК. Антиоксидантний захист.....	49
1.6 Функціональні механізми забезпечення стабільності ДНК. Репаративні процеси.....	50
1.7 Види найпоширеніших уражень ДНК під дією внутрішніх та зовнішніх факторів.....	54

1.8. Особливості впливу іонізуючого опромінення на ДНК.....	56
1.9 Особливості впливу УФ-випромінювання на ДНК.....	57
1.10Методи виявлення та оцінки ураження ДНК.	64
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	67
2.1 Одержання фармацевтичної сировини ромашки лікарської.....	67
2.2 Виділення та оцінка питомого вмісту у фармацевтичній сировині низькомолекулярних антиоксидантів	69
2.3 Виділення та оцінка питомого вмісту хамазулена у ефірній олії.....	70
2.4 Виявлення ознак радіаційно-індукованої нестабільності геному	70
2.5 Статистичні оцінки. Проведення «паспортизації» генотипів ромашки лікарської та визначення ефектів геномної нестабільності.....	73
РОЗДІЛ- 3. ОЦІНКА ЗВ'ЯЗКУ ЕФЕКТИВНОСТІ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ТА УФ- С ОПРОМІНЕННЯ З МІНІСАТЕЛІТНИМ ПОЛІМОРФІЗМОМ ДНК РІЗНИХ СОРТІВ РОМАШКИ ЛІКАРСЬКОЇ.....	76
РОЗДІЛ 4. ВЗАЄМОДІЯ ВІДДАЛЕНИХ ЕФЕКТІВ УРАЖЕННЯ ГЕНОМУ ПРИ ПЕРЕДПОСІВНОМУ РЕНТГЕНІВСЬКОМУ ОПРОМІНЕННІ ІЗ СТИМУЛЯЦІЄЮ НАПРАЦЮВАННЯ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ АНТИОКСИДАНТІВ.....	86
РОЗДІЛ 5. . ВЗАЄМОДІЯ ВІДДАЛЕНИХ ЕФЕКТІВ УРАЖЕННЯ ГЕНОМУ ПРИ ПЕРЕДПОСІВНОМУ УФ-С ОПРОМІНЕННІ ІЗ	

СТИМУЛЯЦІЄЮ НАПРАЦЮВАННЯ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ АНТИОКСИДАНТІВ.....	104
РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ РЕНТГЕНІВСЬКОГО І УФ-С ОПРОМІНЕННЯ НА ВМІСТ ХАМАЗУЛЕНУ У СУЦВІТТЯХ РОМАШКИ ЛІКАРСЬКОЇ.....	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	134
Додаток до РОЗДІЛУ 3. Оцінка мінісателітного поліморфізму 8 генотипів ромашки лікарської.....	153

АННОТАЦІЯ

Галич Т.В. Зв'язок ураження геному за різних типів опромінення із стимуляцією утворення фармацевтичних сполук *Matricaria chamomilla* L. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» (09 – Біологія) – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії – Київ, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню зв'язку ураження геному за різних типів опромінення із стимуляцією накопичення фармацевтичних сполук ромашки лікарської з лікарської сировини(суцвіть).

У зв'язку із зростанням використання рослин в офіційній медицині, збільшується і різноманітність підходів до отримання більшої кількості лікарських речовин з цієї природної сировини. Поряд з пошуком нових видів, які мають лікувальні властивості, виведенням більш продуктивних сортів, використовується переорієнтація метаболізму організмів в бік збільшення необхідних для практики речовин. У той час як для вирішення цього питання генетична і метаболічна інженерія фокусуються на генетичній трансформації організмів, досвід вивчення захисних реакцій на дію стресових факторів вказує на можливість використання епігенетичних механізмів для переорієнтації метаболізму.

Одним з ефективних підходів є використання іонізуючого та УФ-С опромінення. При гострому та хронічному опроміненні спостерігається зсув метаболічних процесів у бік утворення речовин вторинного

метаболізму, до складу яких входить більшість радіопротекторів, що мають антиоксидантну, антиканцерогенну, імуномодулюючу і протизапальну дію та знаходять все ширше застосування в фармакології.

Однією з основних складових розробки біотехнології підвищення виходу з рослинної сировини лікувальних речовин, зокрема, антиоксидантів, шляхом використання різних типів опромінення, є відбір генотипів з високою чутливістю до дії стресових факторів та з'ясування взаємодії молекулярно – генетичних механізмів, що визначають ці ефекти. Дослідження цих питань проведено на шести сортах Ромашки лікарської (*Matricaria chamomilla* L.) європейської селекції з колекції Центральної станції лікарських рослин НААН України (Лубни) та ендемічних екотипах насіння, які одержано з насінневих станцій України. Увагу було спрямовано на молекулярно-генетичне підґрунтя стимуляції у різних генотипів двох технологічно важливих характеристик – врожайності фармацевтичної сировини (суцвіть) та нагромадження антиоксидантів у ній. Проведено вегетаційні, польові та лабораторні дослідження. Використано методи молекулярно–генетичного аналізу (ISSR–ПЛР і RAPD–ПЛР), біохімічні методи виділення антиоксидантів, методи лінійної статистики та кластерного аналізу.

Виконання теми включало в себе ряд завдань, які були виконані в декілька етапів.

Завданням першого етапу дослідження було встановлення з використанням методу генетичних маркерів зв'язку чутливості генотипів ромашки лікарської до різних типів опромінення з особливостями організації їхнього геному. Була проведена оцінка поліморфізму первинної структури ДНК генотипів ромашки з використанням ISSR і RAPD маркерів з подальшим кластерним аналізом генетичної відстані між

генотипами, що різняться стимуляцією продуктивності фармацевтичної сировини (суцвіть) та нагромадження низькомолекулярних антиоксидантів - флавоноїдів та фенолів.

Проведений аналіз зв'язку ефективності двох типів опромінення по двом показникам підвищення продуктивності різних генотипів з мікросателітним поліморфізмом їхньої ДНК показав неоднозначні результати. Не виявлено суттєвого зв'язку між розмаїттям двох видів реакції восьми генотипів ромашки лікарської з їхнім ДНК-поліморфізмом по ISSR маркерам. Не виключно, що відсутність чіткого взаємозв'язку вихідного (у контролі) поліморфізму по ISSR маркерам і RAPD маркерам з напрацюванням антиоксидантів пов'язано з відносно невеликою вибіркою генотипів *Matricāria chamomīlla* L., з якою проводили роботу.

Між тим виявлено чіткий зв'язок між поліморфізмом ДНК по RAPD- послідовностям з продуктивністю фармацевтичної сировини ромашки лікарської.

Досліджені вісім генотипів ромашки лікарської розділяються на три підкластери, два з яких реагують значимо на УФ-С опромінення, а один – на рентгенівське опромінення.

Проведене дослідження виявило відсутність взаємозв'язку між стимуляцією певним типом опромінення продукції фармацевтичної сировини та нагромадженням антиоксидантів. Так, тільки при рентгенівському опроміненні сортів Азулена та Горал одночасно відбувалася стимуляція і врожайності суцвіть, і вмісту антиоксидантів. У сорту Перлина лісостепу спостерігалася стимуляція фармацевтичної сировини УФ-С опроміненням, в той час як підвищення вмісту флавоноїдів у сировині відбувалася при рентгенівському опроміненні. У сорту

Кведлінбург стимуляція врожайності фармацевтичної сировини відбувалася при рентгенівському опроміненні, а стимуляція накопичення антиоксидантів спостерігалася при УФ-С опроміненні.

Наступний етап дослідження пов'язаний з виявленням механізмів трансформації разового первинного ураження ДНК при передпосівному опроміненні насіння з віддаленим збереженням цього ураження та стимуляцією синтезу антиоксидантів на останніх стадіях онтогенезу у структурах, які не були безпосередньо опромінені. Дослідження було сфокусовано на виявленні зв'язку між ознаками геномної нестабільності у мікросателітних послідовностях ДНК та накопиченням антиоксидантів у двох генотипах ромашки лікарської – сорту Перлина лісостепу та її мутанту при рентгенівському та УФ-С опроміненні. Обрані генотипи відносяться до різних кластерів та по-різному реагують на рентгенівське та УФ-С опромінення. Дослідження ефектів збереження геномної нестабільності проведене з використанням ISSR – ПЛР і RAPD – ПЛР з подальшим аналізом дозової залежності змін в спектрах ампліконів з застосування кластерного аналізу.

Показано збереження ефектів пошкодження ДНК у фазі цвітіння рослин за умов передпосівного рентгенівського опромінення сухого насіння. Виявлено зв'язок між поліморфізмом первинної структури ДНК у різних генотипів та характером її перебудови при цьому виді опромінення. Встановлено, що найбільше ураження ДНК генотипів Перлина лісостепу та її мутанту спостерігається при дозах опромінення 5 і 10 Грей та тенденцію до відновлення нативної структури ДНК при дозі опромінення 15 Гр.

Зміни вмісту фенолів та флавоноїдів показують відмінності у дозових залежностях цих характеристик у сорту Перлини лісостепу та його мутанту. Дозова залежність питомого вмісту флавоноїдів у першому випадку має максимум, що відповідає дозі 10 Грей, у другому – 5 Грей. Значиме підвищення питомого вмісту фенолів спостерігається тільки у мутанту Перлини Лісостепу при дозі 5 Гр. Спостерігається зниження вмісту обох антиоксидантів при дозі 15 Гр. Таким чином, максимальний вміст флавоноїдів і фенолів (5 та 10 Гр для різних генотипів) відповідає найбільшій втраті спорідненості із контрольним варіантом спектрів ампліконів при RAPD – ПЛР (обидва генотипи) та ISSR-ПЛР (для Перлини лісостепу) та підвищення цих показників при дозі опромінення 15 Гр.

Одержані показники свідчать про нелінійну і немонотонну залежність ефектів опромінення від дози, що є характерною для області малих доз. Застосування кластерного аналізу дозових залежностей змін спектрів ампліконів при проведенні ПЛР аналізу з 10 RAPD та 8 ISSR маркерами допомогло виявити структуру взаємодії в залежності від дози опромінення трьох головних реакції клітини на опромінення: розвитку ураження ДНК, стимуляції репаративних і антиоксидантних процесів.

На основі одержаних даних і аналізу існуючих радіобіологічних даних про існування зв'язку між ураженням ДНК і захисною реакцією організму (репарація ДНК і антиоксидантний захист) була запропонована схема, що відображає гіпотетичну картину радіаційно-індукованих процесів.

Таким чином, головним результатом поєднання молекулярно-генетичних досліджень з кластерним аналізом даних є встановлення того, що за явищем стимуляції синтезу та накопичення антиоксидантів стоїть

складна система взаємодій між розвитком ураження ДНК і репаративними процесами, розпізнаванням пошкодженої первинної структури ДНК та відповідної конформації хроматину.

Встановлено, що існує вузький діапазон (5-15 Гр) доз, за яких не відбувається активація ундуцибельної репарації ДНК, однак при якій спостерігається стимуляція напрацювання фармацевтичної продукції. Ці дані є початком переходу від суто емпіричного підбору ефективних доз для стимуляції напрацювання тих чи інших метаболітів до виявлення механізмів, що обумовлюють довгострокові метаболічні перебудови.

Дослідження ефектів УФ-С опромінення було проведено за тотожною з дослідженням ефектів рентгенівського опромінення схемою. Було використано опромінення у діапазоні 5- 20 кДж/м², ефективність якого у стимуляції продуктивності фармацевтичної сировини досліджено попередньо і закріплено патентом. Було встановлено збереження ознак геномної нестабільності на стадії цвітіння рослин при передпосівному опроміненні насіння у зазначеному діапазоні доз.

Як і у випадку з дією рентгенівського опромінення, було встановлено, що картина ураження ДНК залежить від вихідної первинної структури ДНК, що як встановлено на першому етапі досліджень, різниться за мінісателітними послідовностями.

В результаті поєднання ISSR- ПЛР і RAPD- ПЛР з кластерним аналізом дозових залежностей встановлено, що явище стимуляції синтезу та накопичення антиоксидантів, як у випадку іонізуючого, так і УФ-С опромінення, ймовірно, пов'язано із взаємодією між розвитком ураження ДНК і репаративними процесами, розпізнаванням помилкової первинної

структури ДНК та відповідної конформації хроматину. Важливо, що дія іонізуючого і неіонізуючого, в даному випадку УФ-С опромінення, індукує антиоксидантний відгук через ушкодження ДНК, але має і значні відмінності, а саме: УФ-С опромінення не викликає зменшення синтезу антиоксидантів при підвищенні дози опромінення. З практичної точки зору УФ опромінення виявляється більш зручним інструментом у стимуляції вторинного метаболізму за рахунок специфічного впливу на ДНК і уповільнення включення репаративних процесів.

Одержані результати підтверджують сформульовану попередньо гіпотезу про існування зв'язку між стимуляцією активних форм кисню як захисту від фрагментів власної ДНК, що можуть сприйматися клітиною як чужорідна ДНК, та напрацюванням антиоксидантних сполук. Ці дані, одержані як для рентгенівського так і УФ-С опромінення, дають певний внесок для переходу від суто емпіричного підбору ефективних доз для стимуляції синтезу та накопичення тих чи інших метаболітів до виявлення механізмів, що обумовлюють метаболічні перебудови, і наближають теоретично обґрунтоване біотехнологічне використання різних видів опромінення.

Відомо, що однією із головних сполук, що визначає широкий спектр лікувальних властивостей ромашки лікарської є хамазулен. Вирощування рослин для одержання фармацевтичної сировини для оцінки впливу рентгенівського опромінення на стимуляцію нагромадження в суцвіттях ромашки лікарської хамазулену проводили в польових умовах з урахуванням того, що вихід ефірної олії не перевищує 0.1% від маси рослинної сировини. При виконанні роботи вперше було відпрацьовано метод виділення ефірної олії ромашки з малих об'ємів фармацевтичної

сировини. Встановлено, що максимальна стимуляція врожаю фармацевтичної сировини, як і у інших польових дослідженнях з цією рослиною спостерігалась при дозі передпосівного опромінення 15 Гр. При цій же дозі виявлена найбільша стимуляція виходу ефірного масла і вмісту в ньому цільової речовини.

В результаті виконання дисертаційної роботи встановлено ряд важливих для практичного застосування зв'язків між специфікою дії іонізуючого і УФ-С опромінення на геном ромашки лікарської та стимуляцією продукції фармацевтичної сировини, важливих для медичної практики сполук у ній.. На основі молекулярно –генетичних, біохімічних методів з використанням кластерного аналізу отриманих результатів виявлено вплив мікросателітного поліморфізму ДНК ряду генотипів ромашки лікарської на чутливість до певного виду опромінення. Встановлено ключовий механізм трансформації первинного ураження ДНК при разовому передпосівному опроміненні у довготривалі метаболічні перебудови у рослинних структурах, що не були безпосередньо опромінені. Показано, що ознаки геномної нестабільності, які пов'язують первинні ураження з віддаленими метаболічними наслідками, залежать від мінісателітного поліморфізму досліджених генотипів. Одержані результати, окрім суто практичних результатів, забезпечують внесок у створення теоретичного підґрунтя впровадження радіаційних радіаційного фактору в діапазоні малих доз у біотехнологію.

Ключові слова: лікарські рослини, геномна нестабільність, антиоксиданти, генетичний поліморфізм, опромінення, піримідинові димери, конформація ДНК, феноли, флаваноїди, стабільність геному, рослинні екстракти, радіопротектори, рослинна сировина, біохімічний

склад, радіаційно-індукована стимуляція, RAPD та ISSR маркери, делеція, генетична відстань, генетична різноманітність.

SUMMARY

Halych T.V. The connection of damage to the genome under different types of irradiation with the stimulation of the formation of pharmaceutical compounds of *matricaria chamomilla* l. -Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree 091 "Biology" (09 - Biology) - Institute of Cell Biology and Genetic Engineering - Kyiv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of the relationship between damage to the genome under different types of irradiation and the stimulation of the release of pharmaceutical compounds of chamomile.

Due to the growing use of plants in official medicine, the variety of approaches to obtaining more medicinal substances from this natural raw material is also increasing. Along with the search for new species that have medicinal properties, the breeding of more productive varieties, the reorientation of the metabolism of organisms in the direction of increasing the substances necessary for practice is used. While genetic and metabolic engineering focuses on the genetic transformation of organisms to solve this issue, the experience of studying protective reactions to stressors indicates the possibility of using epigenetic mechanisms to reorient metabolism.

One of the effective approaches is the use of ionizing and UV-C irradiation. With acute and chronic exposure, there is a shift in metabolic processes towards the formation of substances of secondary metabolism, which include the majority of radioprotectors that have antioxidant, anticarcinogenic, immunomodulatory and anti-inflammatory effects and are used in pharmacology.

One of the main components of the development of biotechnology to increase the yield of medicinal substances from plant raw materials, in particular antioxidants, by using different types of irradiation, is the selection of genotypes with high sensitivity to the action of stress factors and the clarification of the interaction of molecular-genetic mechanisms that determine these effects. The study of these issues was carried out on six varieties of *Matricaria chamomilla* of European selection from the collection of the Central Station of Medicinal

Plants of the National Academy of Sciences of Ukraine (Lubny) and endemic ecotypes of seeds obtained from seed stations of Ukraine. Attention was directed to the molecular and genetic basis of stimulation in different genotypes of two technologically important characteristics - the yield of pharmaceutical raw materials (inflorescence) and the accumulation of antioxidants in it. Vegetation, field and laboratory studies were conducted. The methods of molecular-genetic analysis (ISSR-PCR and RAPD-PCR), biochemical methods of extracting antioxidants, methods of linear statistics and cluster analysis were used.

The implementation of the topic included a number of tasks that were performed in several stages.

The purpose of the first stage of the research was to establish, using the method of genetic markers, the connection between the sensitivity of genotypes to different types of radiation and the peculiarities of the organization of their genome. An assessment of polymorphism of the primary DNA structure of chamomile genotypes was carried out using ISSR-RAPD markers followed by a cluster analysis of the genetic distance between genotypes differing in stimulation of the productivity of pharmaceutical raw materials (inflorescence) and the accumulation of low molecular weight antioxidants flavonoids and phenols.

The analysis of the relationship between the efficiency of different types of irradiation on two indicators of increasing the productivity of different genotypes with the minisatellite polymorphism of their DNA showed ambiguous results. A very weak connection between the diversity of the two types of reaction of eight genotypes of chamomile with their DNA polymorphism according to ISSR markers was revealed. Not exclusively, no clear relationship between the initial (in control) polymorphism was found.

Meanwhile, a clear connection between DNA polymorphism by RAPD sequences and the productivity of pharmaceutical raw materials was revealed.

The studied eight genotypes are divided into three subclusters, two of which react significantly to UV-C irradiation, and one to X-ray irradiation.

The conducted study revealed the absence of a relationship between the stimulation of a certain type of irradiation of the productivity of pharmaceutical

raw materials and the accumulation of antioxidants. Thus, only with X-ray irradiation of the Azulena and Goral varieties, both the yield of inflorescences and the content of antioxidants are stimulated at the same time. In the Perlina lisostepu variety, the stimulation of pharmaceutical raw materials by UV-C irradiation is observed, while the increase in the content of flavonoids occurs with X-ray irradiation. In the Quedlinburg variety, stimulation of the yield of pharmaceutical raw materials occurs with X-ray irradiation, and stimulation of the productivity of antioxidants is observed with UV-C irradiation.

The next stage of research is related to the identification of the mechanisms of transformation of a single primary DNA damage during pre-sowing seed irradiation with its remote preservation and stimulation of antioxidant synthesis at the last stages of ontogenesis in structures that were not directly irradiated. The study was focused on identifying the relationship between the signs of genomic instability in minisatellite DNA sequences and the accumulation of antioxidants in two genotypes of medicinal chamomile - the Perlina lisostepu variety and its mutant under X-ray and UV-C irradiation. The selected genotypes belong to different subclusters and react differently to X-ray and UV-C irradiation. The study of the effects of preservation of genomic instability was carried out using ISSR - PCR and RAPD -PCR with further analysis of the dose dependence of changes in amplicon spectra using cluster analysis.

The preservation of the effects of DNA damage in the flowering phase of plants under the conditions of pre-sowing X-ray irradiation of dry seeds is shown. The connection between the polymorphism of the primary DNA structure in different genotypes and the nature of its rearrangement during this type of irradiation was revealed. It was established that the greatest DNA damage of both genotypes is observed at radiation doses of 5-10 Gray and a tendency to recovery at a radiation dose of 15 Gray.

Changes in the content of phenols and flavonoids show differences in the dose dependence of these characteristics in the Perlina lisostepu variety and its mutant. The dose dependence of the specific content of flavonoids in the first case has a maximum corresponding to a dose of 10 Gray, in the second - 5 Gray. A significant increase in the specific content of phenols is observed only in the

mutant Pearl of the Forest Steppe at a dose of 5 Gy. A decrease in the content of both antioxidants was observed at a dose of 15 Gy. Thus, the maximum content of flavonoids and phenols (5 and 10 Gy for different genotypes) corresponds to the greatest loss of affinity with the control variant of the amplicon spectra at RAPD – PCR (both genotypes) and ISSR-PCR (for the Pearl of the lisostepu) and the increase of these indicators at an irradiation dose of 15 Gr.

The obtained indicators testify to the non-linear and non-monotonic dependence of the effects of irradiation on the dose, which is characteristic of the area of small doses. The use of a cluster analysis of the dose dependence of amplicon spectrum changes during PCR analysis with 10 RAPD and 8 ISSR markers helped to reveal the structure of the interaction depending on the radiation dose of the three main cell responses to radiation: development of DNA damage, stimulation of reparative and antioxidant processes.

Based on the obtained data and the analysis of existing radiobiological data on the existence of a connection between DNA damage and the body's protective reaction (DNA repair and antioxidant protection), a scheme was proposed that reflects a hypothetical interactive picture of radiation-induced processes.

Thus, the main result of the combination of molecular genetic studies with cluster analysis of data is the establishment that behind the phenomenon of stimulation of the production of antioxidants is a complex system of interactions between the development of DNA damage and reparative processes, the recognition of the erroneous primary structure of DNA and the corresponding conformation of chromatin.

It has been established that there is a narrow range of subthreshold doses of initiation of DNA repair, in which stimulation of the productivity of pharmaceutical products occurs. These data are the beginning of the transition from a purely empirical selection of effective doses to stimulate the development of certain metabolites to the identification of mechanisms causing long-term metabolic changes.

The study of the effects of UV-C irradiation was carried out according to the same scheme as the study of the effects of X-ray irradiation. Irradiation in

the range of 5-20 kJ/m² was used, the effectiveness of which in stimulating the productivity of pharmaceutical raw materials was previously studied and secured by a patent. It was established that signs of genomic instability were preserved at the flowering stage of plants with pre-sowing seed irradiation in the specified range of doses.

As in the case of X-ray exposure, it was established that the pattern of DNA damage depends on the original primary structure of DNA, which, as established at the first stage of research, differs by minisatellite sequences.

As a result of the combination of ISSR-PCR and RAPD-PCR with cluster analysis of dose dependence, it was established that the phenomenon of stimulation of antioxidant activity, both in the case of ionizing and UV-C irradiation, is associated with the interaction between the development of DNA damage and reparative processes, the recognition of false primary structure of DNA and corresponding conformation of chromatin. It is important that the action of ionizing and non-ionizing, in this case UV-C irradiation, induce an antioxidant response due to DNA damage, but have significant differences. From a practical point of view, UV irradiation turns out to be a more convenient tool for stimulating secondary metabolism due to a specific effect on DNA and slowing down the inclusion of reparative processes.

The obtained results confirm the previously formulated hypothesis about the existence of a connection between the stimulation of reactive oxygen species as protection against fragments of one's own DNA, which can be perceived by the cell as foreign DNA, and the development of antioxidant compounds. These data, obtained for both X-ray and UV-C irradiation, provide a certain contribution to the transition from a purely empirical selection of effective doses to stimulate the development of certain metabolites to the identification of mechanisms that cause metabolic rearrangements, and bring closer the theoretically justified biotechnological use of various types of irradiation.

It is known that the main compound that determines a wide range of medicinal properties of chamomile is hamazulene. Cultivation of plants to obtain pharmaceutical raw materials to evaluate the effect of X-ray irradiation on stimulating the accumulation of chamazulene in chamomile inflorescences was carried out in field conditions, taking into account the fact that the yield of

essential oil does not exceed 0.1% of the plant mass. During the work, the method of extracting chamomile essential oil from small volumes of pharmaceutical raw materials was developed for the first time. It was established that the maximum stimulation of the yield of pharmaceutical raw materials, as in other field studies with this plant, was observed at an irradiation dose of 15 Gy. At the same dose, the greatest stimulation of the output of the essential oil and the content of the target substance in it was found.

As a result of the dissertation work, a number of connections important for practical application were established between the specificity of the action of ionizing and UV radiation on the cell genome and the stimulation of pharmaceutical raw materials and compounds important for medical practice. On the basis of molecular-genetic and biochemical methods using cluster analysis, the influence of minisatellite DNA polymorphism of a number of chamomile genotypes on sensitivity to a certain type of radiation was revealed. The key mechanism of transformation of primary DNA damage during a single pre-sowing irradiation into long-term metabolic rearrangements in plant structures that were not directly irradiated was established. It was shown that the signs of genomic instability, which connect primary lesions with distant metabolic consequences, depend on the minisatellite polymorphism of the studied genotypes. The obtained results, in addition to purely practical results, contribute to the creation of a theoretical basis for the introduction of radiation factors in the field of small doses in biotechnology.

Key words: medicinal plants, genomic instability, antioxidants, genetic polymorphism, irradiation, pyrimidine dimers, DNA conformation, phenols, flavonoids, genome stability, plant extracts, radioprotectors, plant raw materials, biochemical composition, radiation-induced stimulation RAPD and ISSR markers, deletion, genetic diversity, genetic distance.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці в яких опубліковані наукові результати дисертації:

Видання, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Sokolova DA, Halych TV, Zhuk VV, Kravets AP. Relationship of radiation-induced genomic instability and antioxidant production in the chamomile plant. *Int J Radiat Biol.* 2023;99(10):1631-1638. doi: 10.1080/09553002.2023.2188934. Epub 2023 Mar 31. PMID: 36881557 **Q1/2**

2. D. O. Sokolova, T. V. Halych, V. V. Zhuk, O. P. Kravets & M. V. Kuchuk. Association of the Stimulation of Plant Antioxidant Protection with Traits of Genome Instability, *Cytol Genet.*, 2022, vol. 56, no. 5, pp. 431–440 DOI: 10.3103/S0095452722050103 **Q3**

Наукові фахові видання:

1. Соколова Д.О., Жук В.В., Галич Т.В. Індукована ультрафіолетом нестабільність геному у пшениці. International Science Group. Development of modern science, experience and trends. 2022 p., С. 37-42. ISBN 979-8-88796-812-4 DOI 10.46299/ISG.2022.2.3

2. Sokolova D., Halych T., Zhuk V., Kravets O. Increasing the productivity of matricaria chamomilla by pre-sowing ultraviolet irradiation. International Science Group. Multidisciplinary academic notes. Science research and practice. 2022 p. С. 477-485. ISBN 979-8-88526-751-9 DOI 10.46299/ISG.2022.1.15

3. Соколова Д.О., Жук В.В., Галич Т.В. Вплив посухи на виникнення геномної нестабільності у пшениці. . International Science Group. Current

trends in the development of modern scientific thought. 2022 p. С. 46-53. ISBN 979-8-88796-810-0 DOI 10.46299/ISG.202.2.1

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Кравець О.П., Соколова Д.О., Галич Т.В. Геномна нестабільність як потенційний механізм зв'язку між прямими і віддаленими радіобіологічними ефектами. . Актуальні питання радіобіології – 2023. Житомир · 2023. С.-53.

2. Соколова Д.О., Галич Т.В., Жук В.В., Кравець О.П. Зв'язок радіаційно індукованої нестабільності геному та стимуляції антиоксидантного захисту рослин. Актуальні питання радіобіології – 2023. Житомир · 2023. С.-130.

3. Sokolova D., Halych T., Zhuk V., Kravets O. The role of radiation-induced genome instability in increasing pharmaceutical productivity of plants., 2022 p., С. 530-533. ISBN 979-8-88526-749-6 DOI 10.46299/ISG.2022.1.13

4. Sokolova D., Halych T., Zhuk V., Kravets O. The relationship of uv-c induced genomic instability with the content of antioxidants in pharmaceutical raw materials of plants. . International Science Group. Multidisciplinary academic notes. Theory, methodology and practice. 2022 p. с. 54-57. ISBN 979-8-88722-622-4 DOI 10.46299/ISG.2022.1.27.

5. Т.В. Галич. Зв'язок поліморфізму генотипів ромашки лікарської по issr- rapd- послідовностям днк та стійкості до іонізуючого та уф-с опромінення. Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики: матеріали

Міжнародної наукової конференції, присвяченої 75-річчю Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. – 2021. – С. 54.

6. Галич.Т.В. Вплив рентгенівського та уф-с передпосівного опромінення на формування фармацевтичної сировини двох генотипів ромашки лікарської. Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики: матеріали Міжнародної наукової конференції, присвяченої 75-річчю Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. – 2021. – С. 57.

7. Галич Т.В. Аналіз радіочутливості і генетичної відстані різних генотипів ромашки лікарської як складової біотехнологічних досліджень. Матеріали XV-ї Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського.-2021.-С.31.

8. Галич Т.В. Вплив рентгенівського та УФ-С передпосівного опромінення на формування фармацевтичної сировини двох генотипів ромашки лікарської. Матеріали XV-ї Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського.-2021.-С.32.

9. Sokolova D., Halych T., Zhuk V., Kravets O. Connection between genetic polymorphism of *matricaria chamomilla* and sensitivity to various stressors. The 5th Symposium on EuroAsian Biodiversity.-2021-P.213

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

РІНГ – радіаційно-індукована геномна нестабільність

П.Л. – Перлина лісостепу

Мут. – мутант Перлини Лісостепу

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ІПЖ – індекс подібності Жаккарда

ККП – коефіцієнт кореляції Пірсона

ISSR – internal simple sequence repeats

RAPD – random amplification of polymorphic DNA

ВСТУП

Актуальність теми. Вивчення захисних реакцій рослин показало можливості стимуляції синтезу продуктів вторинного метаболізму, до яких належать речовини з антиоксидантними, імуномодуляторними, антиканцерогенними та протизапальними ефектами. Найбільш ефективний підхід пов'язаний з використанням іонізуючого та УФ опромінення.

Дослідження останніх років значно змінили наше уявлення про формування метаболічного відгуку організмів на опромінення. Встановлено перемикання активності десятків і навіть сотень генів у перші хвилини після дії опромінення [1]. З використанням «омік» технологій у радіобіологічному експерименті стало відомо про значні перебудови метилому при різних режимах опромінення [2-4], широкомасштабні зміни протеому, стимуляцію не тільки репаративних та захисних механізмів, а й перебудову всього метаболону, включаючи різні блоки первинного і вторинного метаболізму [4-6]. Ці факти не тільки роблять значний внесок в трансформацію радіобіологічної парадигми, але й мають значення з практичної точки зору.

На сьогодні накопичено багатий феноменологічний матеріал відносно визначення інтервалів ефективних доз опромінення для різних видів і сортів лікарських рослин. Виявлено, що ефективним у відношенні одержання фармацевтичних сировини і речовин є передпосівне опромінення лікарських рослин з подальшим одержанням цільових метаболітів у біологічних структурах, які безпосередньо не піддавались опроміненню. Цей ефект відображає системну природу довготривалої відповіді організму на разову дію стресового фактора. Передпосівне опромінення призводить до віддалених ефектів, тобто стимуляції

продукції цільових речовин через тижні або місяці в сформованих неопромінених органах рослини, наприклад, у суцвіттях. Важливо й те, що встановлена можливість використання опромінення у «малих» дозах, які індукують продукцію цільових речовин, але не знижують, а для деяких видів та сортів рослин стимулюють урожай фармакологічної сировини. Ці експериментальні знахідки спонукають до пошуку відповіді на ряд питань, що стосуються механізмів цих радіобіологічних та загально біологічних явищ.

Радіобіологічними і генетичними дослідженнями доведено, що ДНК клітини, як біофізична структура і носій генетичної інформації, є ключовою мішенню для радіаційного ураження і в той же час визначає розгалужену систему захисту, відновлення і довгострокових метаболічних змін.

На момент початку дисертаційних досліджень було надійно встановлено, що передпосівне опромінення насіння ромашки лікарської в діапазоні доз, що відноситься до «малих», приводить до віддалених наслідків – підвищення рівня низькомолекулярних антиоксидантів у фармацевтичній сировині цієї рослини (суцвіттях), які формуються через 3-4 місяці після посіву[7,8]. Було встановлено, що частина генотипів реагує стимуляцією врожайності фармацевтичної сировини та низькомолекулярних антиоксидантів на рентгенівське, а інші – на УФ-С опромінення. Відзначено існування генотипів у яких спостерігається пригнічення обох реакцій.

Низька цих фактів, які потребують пояснення і потрібні для формування теоретичного підґрунтя застосування радіаційного фактору в біотехнології, обумовила тему дисертаційної роботи, метою якої було:

З'ясувати взаємодію віддалених ефектів ураження геному при різних типах і дозах опромінення із стимуляцією напрацювання фармацевтичних сполук ромашки лікарської.

Однією з основних складових розробки біотехнології підвищення виходу з рослинної сировини лікувальних речовин, зокрема антиоксидантів, шляхом використання різних типів опромінення, є відбір генотипів з високою чутливістю на дію стресових факторів та з'ясування взаємодії молекулярно – генетичних механізмів, що визначають ці ефекти. Дослідження цих питань проведено на шести сортах *Matricāria chamomīlla* L. європейської селекції з колекції Центральної станції лікарських рослин НААН України (Лубни) та ендемічних екотипах насіння, які одержано з насінневих станцій України. Необхідно було розробити молекулярно-генетичне підґрунтя встановлено феномену стимуляції або пригнічення у різних генотипів двох технологічно важливих характеристик – врожайності фармацевтичної сировини (суцвіть) та нагромадження антиоксидантів у ній різними видами опромінення [9,10].

Для цього було необхідно визначитись з використанням певних маркерів ДНК, які б відображали глобальні перебудови геному під дією різних видів опромінення. Сучасні відомості про роль різних послідовностей ДНК у її конформації, прямому, або опосередкованому впливі на доступність ДНК ураженню, або доступності факторам експресії [11,12] дозволили нам скористатись дослідженням поліморфізму по мінісателітним послідовностями.

Оцінка молекулярно - генетичних механізмів специфіки ураження геному різними видами опромінення вимагає дослідження механізмів трансформації разового первинного ураження ДНК при передпосівним

опроміненням насіння з віддаленим його збереженням та стимуляцією синтезу антиоксидантів на останніх стадіях онтогенезу у структурах, які не були опромінені безпосередньо. Аналіз сучасних даних про вплив «малих» доз на геном дозволили висунути гіпотезу, що вагомим механізмом трансформації прямих, безпосередніх реакцій на разове опромінення є геномна нестабільність. Її перевірка, дослідження специфіки ефектів геномної нестабільності при рентгенівському і УФ-С опроміненні фокусувалось на виявленні збереження ураження геному в минисателітних послідовностях. При цьому оцінювали зв'язок реакції геному при різних видах і дозах опромінення з поведінкою антиоксидантної системи, тобто власне із стимуляцією цільових продуктів.

Дослідження проводилося в рамках фінансування НДР НАН України за темами III-7-19 «Підвищення продуктивності лікарських рослин шляхом передпосівного ультрафіолетового опромінення насіння» та III-6-22 «Стимуляція утворення антиоксидантних, онкопротекторних та протизапальних сполук передпосівним опроміненням насіння салатних овочів та лікарських рослин», «III-2-23 Генетичні і епігенетичні механізми та фактори захисних і адаптивних реакцій рослин»

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота була виконана в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під час навчання на аспірантурі у 2019-2023рр, у відділі біофізики та радіобіології у рамках бюджетної наукової роботи: III-7-19 «Підвищення продуктивності лікарських рослин шляхом передпосівного ультрафіолетового опромінення насіння»; III-6-22 «Стимуляція утворення антиоксидантних, онкопротекторних та протизапальних сполук передпосівним опроміненням насіння салатних овочів та лікарських

рослин»; III-2-23 Генетичні і епігенетичні механізми та фактори захисних і адаптивних реакцій рослин.

Мета і Завдання дослідження.

Мета роботи - З'ясувати взаємодію віддалених ефектів ураження геному при різних типах і дозах опромінення із стимуляцією напрацювання фармацевтичних сполук ромашки лікарської.

Досягнення мети відбулось через виконання завдань:

1. З'ясувати вплив генетичного (мінісателітного) поліморфізму на ефективність стимуляції формування фармацевтичної сировини та накопичення в ній низькомолекулярних антиоксидантів фенолів та флавоноїдів різними видами опромінення восьми генотипів *Matricia chamtomila* L.

2. Провести експериментальну перевірку сформульованої на основі сучасних відомостей про дію малих доз гіпотези, що в основі формування віддалених наслідків передпосівного рентгенівського та УФ-С опромінення насіння лежить явище геномної нестабільності;

3. З використанням ISSR-ПЛР і RAPD-ПЛР дослідити особливості ознак геномної нестабільності при різних видах опромінення;

4. Провести кластерний аналіз дозової залежності спектрів ампліконів одержаних при ISSR-ПЛР і RAPD-ПЛР при різних видах опромінення та виявити зв'язок між основними групами процесів, індукованих опроміненням: нестабільністю генетичного матеріалу ДНК, включенням репаративних процесів та механізмами антиоксидантного захисту;

5. Налагодити одержання фармацевтичної сировини та екстракцію з неї рослинного антибіотика хамазулена за умов передпосівного УФ-С та рентгенівського опромінення;

6. Провести статистичний аналіз та з'ясувати роль різних нуклеотидних послідовностей на виникнення ламків сайтів первинної структури днк та встановити міру специфічності цих сайтів;

Об'єкт дослідження: Механізми впливу разової дії стресових факторів на появу віддалених ефектів ураження геному і метаболічних перебудов рослинного організму.

Предмет дослідження: Взаємодія віддалених ефектів ураження геному при різних типах і дозах опромінення із стимуляцією напрацювання фармацевтичних сполук ромашки лікарської .

Методи дослідження. Дослідження проведено на 8 генотипах *Matricaria chamomilla*. Було використано 6 генотипів : 1. Мутант сорту Перлини лісостепу 2. сорт Кведлінбург; 3.сорт Горал; 4.сорт Азулена; 5.сорт Злати Лан; 6.сорт Перлина лісостепу. До дослідження було долучено і несортний матеріал, що фактично є едафічними екотипами: 7- Gold Garden; 8 – Seed Era.

Опромінення насіння іонізуючим випромінюванням здійснювали на рентгенівській установці РУМ-17 при дозі 5,10,15 Гр. УФ - С опромінення при дозах 5, 10, 15 кДж/м² проводили на установці ОБМ-150 М (Україна) з двома лампами Philips Special TUV 30 W (виробник - Нідерланди), довжина хвилі – 250нм.

Рослини вирощували в умовах вегетаційного досліду , в горщиках, що містять 1,5 кг ґрунту, з розрахунку 10 рослин на горщик. Польові

дослідження проводили на ділянках площею 3м² на варіант. У досліді з вирощуванням ромашки у відкритому густині посіву становила 0,6 г насіння на 1м².

Використані фізіологічні методи - дослідження проростання, швидкості росту, напрацювання біомаси, часу цвітіння;

Біохімічні – виділення ефірної олії, екстракція антиоксидантів;

Молекулярно-генетичні методи – виділення ДНК, проведення RAPD ПЛР і ISSR- ПЛР з метою виявлення віддалених ефектів ураження ДНК;

При проведенні кількісних оцінок результатів дослідження було використано методи лінійного та кластерного статистичного аналізів – параметричні і непараметричні показники статистичного аналізу, оцінка лінійної кореляції за Пірсоном, кластерний аналіз при побудові дендрограм та визначення спорідненості первинної структури ДНК опромінених варіантів з контролем;

Наукова новизна. На основі молекулярно – генетичних, біохімічних методів з використанням кластерного аналізу виявлено вплив мінісателітного поліморфізму ДНК ряду генотипів ромашки лікарської на чутливість до певного виду опромінення при стимуляції двох важливих для практики показників – продукції фармацевтичних сировини і хімічних сполук, що мають радіопротекторну, антиоксидантну та протизапальну дію.

Важливим досягненням роботи є встановлення ключового механізму трансформації первинного ураження ДНК при разовому передпосівному опроміненні у довготривалі метаболічні перебудови у рослинних

структурах, що не були безпосередньо опромінені. Показано, що ознаки геномної нестабільності, що пов'язують первинні ураження з віддаленими метаболічними наслідками, залежать від мінісателітного поліморфізму досліджених генотипів.

Практичне значення отриманих результатів. Дисертаційна робота має практичну спрямованість і присвячена дослідженню зв'язку ураження геному за різних типів опромінення із стимуляцією виходу фармацевтичних сполук *Matricāria chamomīlla L.*

Головним практичним надбанням роботи є встановлення зв'язку між специфікою дії іонізуючого і УФ-С опромінення на геном клітини і стимуляцією продуктивності фармацевтичної сировини і важливих для медичної практики сполук.

Не менш важливим для практичного застосування різних видів опромінення є виявлення стимуляції рентгенівським опроміненням вмісту головного рослинного антибіотика – хамазулену і розробка методики його виділення з малих порцій фармацевтичної сировини.

Одержані результати, окрім суто практичних результатів, дають внесок у створення теоретичного підґрунтя впровадження радіаційних факторів у діапазоні малих доз у біотехнологію.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою науковою роботою здобувача, яка виконувалась упродовж 2019-2023 років. За тематикою роботи виконано інформаційний пошук та аналіз наукової літератури, опрацьовано методики дослідження, проведено вегетаційні та польові досліді, молекулярно-генетичні, біохімічні дослідження, проведений статистичний аналіз отриманих даних. Разом з науковим

керівником проаналізовано й узагальнено отримані дані, проведено їх статистичну обробку, сформульовано висновки. Програму дослідження й основну гіпотезу розроблено з науковим керівником – зав. відділу біофізики і радіобіології докт. біол. наук О.П. Кравець.

Апробація результатів дисертації. Матеріали досліджень доповідались на міжнародних і всеукраїнських конференціях: Актуальні питання радіобіології – 2023. Житомир · 2023.; Міжнародна науково-практична конференція «Multidisciplinary academic research, innovation and results», 05-08 квітня 2022 г., Прага, Чехія.; XXVII Міжнародна науково-практична конференція «Multidisciplinary academic notes. Theory, methodology and practice», 12-15 липня 2022 р., Прага, Чехія.; Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики: матеріали Міжнародної наукової конференції, присвяченої 75-річчю Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. – 2021.; XV-ї Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського.; The 5th Symposium on EuroAsian Biodiversity.-2021.

Публікації. Основний зміст роботи відображено у 5 наукових публікаціях, із них 2 статті у виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, 3 – у міжнародних наукових фахових виданнях, 9 публікації у матеріалах наукових конференцій.

Структура і обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 157 сторінках і складається із вступу, 6 розділів, висновків, списку

використаних джерел, що включає 189 статей та монографій. Робота містить 20 таблиць, 31 рисуноків, 1 додаток.

РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН РОЗВИТКУ РАДІАЦІЙНИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ: ЗДОБУТКИ І ВИКЛИКИ

1.1 Історія біотехнологічного використання різних видів опромінення

Іонізуюче та ультрафіолетове випромінювання відіграють значну роль у біотехнологіях, що застосовуються у сільському господарстві, сприяючи покращенню характеристик рослин та підвищенню врожайності. Дослідження у цій галузі дозволили виявити розмаїття застосувань цих видів випромінювання, важливих сучасної агрономії.

Підвищення та синхронізація проростання насіння рослин (праймування). Праймування – це процес передпосівної обробки насіння з метою стимулювання певних фізіологічних чи метаболічних процесів, що сприяє підвищенню (синхронізації) проростання та стійкості до стресових умов.

Праймування може бути виконане різними методами, такими як обробка насіння хімічними речовинами, фізичними факторами (наприклад, тепловий або холодний шок), іонізуючим та ультрафіолетовим опромінюванням, та фракціонованим замочуванням.

Метою праймування є активація сповільнених фізіологічних процесів рослин, що дозволяє їм успішніше проростати і почати зростання в більш несприятливих умовах. Цей процес може підвищити схожість насіння, скоротити час проростання та сприяти більш рівномірному та швидкому розвитку коренів та пагонів.

Праймування рослин є однією із стратегій у сільському господарстві та біотехнології, спрямованих на збільшення врожайності та покращення

стійкості рослин до стресових факторів, таких як посуха, захворювання, низькі температури та інші несприятливі умови навколишнього середовища.

Іонізуюче випромінювання, таке як гамма-опромінення та рентгенівське випромінювання, успішно застосовується для підвищення та синхронізації проростання насіння рослин. Воно здатне стимулювати поділ клітин зародку, що призводить до активізації процесів проростання. Завдяки цьому час проростання скорочується, а ймовірність успішного сходу збільшується. Це дозволяє скоротити час, необхідний для вирощування рослин та прискорює початок сезону плодоношення.

Підвищення врожайності рослин. Ультрафіолетове випромінювання (УФ-випромінювання) має позитивний вплив на зростання та розвиток рослин, що сприяє збільшенню врожайності. Воно активує фотосинтез і підвищує активність ферментів, що у процесах обміну речовин. Вплив ультрафіолетового випромінювання також може сприяти збільшенню кількості квіток та плодів, що позитивно позначається на загальному врожаї.

Посилення стійкості рослин до стресових факторів. Опромінення рослин іонізуючим та ультрафіолетовим випромінюванням стимулює їх захисну систему та адаптацію до стресових умов. Це підвищує стійкість рослин до агресивних погодних умов, шкідників, хвороб та інших стресових факторів довкілля. В результаті рослини виявляють більш високу життєздатність та здатність виживати у несприятливих умовах.

Індукція змін у співвідношенні процесів первинного і вторинного метаболізму Показано, що при гострому та хронічному опроміненні спостерігається зсув метаболічних процесів у бік утворення речовин вторинного метаболізму, до складу яких входить більшість

радіопротекторів, що мають антиоксидантну, антиканцерогенну, імуномодулюючу і протизапальну дію та мають застосування в фармакології[13-17].

Придушення несумісності при щепленні рослин. Відомо, що на поверхні клітин є білки, які беруть участь у міжклітинному розпізнаванні, вони можуть впізнавати свою тканину, і відкидати чужу, в цьому полягає механізм несумісності щепи та підщепи. Радіація здатна придушувати цей механізм, пригнічуючи активність білків, що беруть участь у розпізнаванні "чужої" тканини. Ці білки, що кодуються генами розпізнавання, відіграють важливу роль у тому, щоб рослина могла відрізнати свої клітини від чужих. Однак радіація, включаючи іонізуюче випромінювання, може впливати на функцію цих білків та механізми розпізнавання, призводячи до змін у клітинах рослин та, у деяких випадках, пригнічуючи механізми несумісності.

Механізми, якими радіація може впливати на склад білків, включають такі:

1. Мутації генів: Іонізуюче випромінювання може викликати мутації в генах, які контролюють синтез або функцію білків, які беруть участь у міжклітинному розпізнаванні. Це може призвести до зміни структури чи активності цих білків.

2. Зміна експресії генів. Радіація може змінювати активність генів, включаючи ті, що кодують білки міжклітинного розпізнавання. Це може призвести до зменшення або збільшення виробництва цих білків.

3. Вплив на білки безпосередньо: Іонізуюче випромінювання може впливати безпосередньо на білки, змінюючи їхню структуру або функцію.

Це може призвести до втрати або зміни здатності білків розпізнавати чужорідні клітини.

Таким чином, радіація може пригнічувати механізми несумісності між прищепою та підщепою, змінюючи генетичну та білкову основу міжклітинного розпізнавання. Механізм подолання несумісності підщепи та щепи за допомогою радіації полягає в наступних етапах:

1.Опромінення рослин: Рослини або їх генетичний матеріал зазнають опромінення іонізуючим випромінюванням. Це випромінювання може викликати різні мутації ДНК рослин, змінюючи їх генетичний склад.

2.Селекція мутантів: Після опромінення рослини вирощуються та досліджуються на предмет мутацій, які могли б усунути несумісність між прищепою та підщепою. Це можуть бути мутації, що змінюють біохімічні або фізіологічні характеристики рослини, роблячи її більш сумісною з підщепою.

3.Вибір сумісних мутантів: З безлічі мутантів вибираються ті, які показують бажані характеристики сумісності з підщепою та прищепою.

4.Підготовка до щеплення: Сумісні мутанти використовуються як щеплення для генетично несумісних підщеп. Цей етап здійснюється так само, як і звичайне щеплення рослин.

5.Оцінка успіху: Після щеплення стежать за розвитком рослин та оцінюють його успіх. Якщо щеплення пройшло успішно, рослини зростатимуть і розвиватимуться нормально, незважаючи на вихідну несумісність між підщепою та прищепом.

Однак слід зазначити, що радіаційний мутагенез спричиняє не лише

позитивні мутації, а й негативні зміни у геномі рослин. Тому цей метод вимагає ретельної селекції та оцінки мутантів, щоб уникати потенційних небажаних ефектів. Крім того, він може бути дорогим і часом витратним процесом.

1.2. Досвід застосування опромінення для стимуляції напрацювання рослиною лікарських речовин

Поширення використання рослин в офіційній медицині, зумовило зростання різноманітності підходів до отримання більшої кількості лікарських речовин з цієї природної сировини. Поряд з пошуком нових видів, які мають лікувальні властивості, виведенням більш продуктивних сортів, використовується перенаправлення метаболізму організмів у бік збільшення необхідних для практики речовин. У той час як для розв'язання цього питання генетична і метаболічна інженерія фокусуються на генетичній трансформації організмів, досвід вивчення захисних реакцій вказує на можливість використання для переорієнтації метаболізму рослин впливу стресових факторів [16-19].

Відомо, що ферментативні і неферментативні антиоксиданти є конститутивними складовими системи підтримки окислювально-відновного гомеостазу тваринних і рослинних організмів. Антиоксидантна система також відіграє активну захисну роль при дії біотичних і абіотичних стресових факторів.

Опромінення є одним з найпотужніших чинників виникнення оксидативного стресу, стимулює утворення радіопротекторів, що мають антиоксидантну, антиканцерогенну, імуномодулювальну і протизапальну дію

Біотехнологічне використання опромінення для переорієнтації

метаболічних процесів рослин в необхідному для практики напрямку ґрунтується на системності захисних реакцій організму. Формування немішених ефектів, включаючи індукцію захисних і адаптивних реакцій у неопромінених органах одного організму і навіть у неопромінених організмів, що знаходяться в одному середовищі з опроміненими, дає можливість отримання продуктів захисних реакцій рослин в неопромінених структурах, що є лікарською сировиною [13-17].

1.3. Системність відгуку рослини на радіаційний стрес та теоретичні проблеми створення радіаційних технологій

Стимуляція напрацювання широкої групи антиоксидантів, що мають значення для фармакології, відображає тільки одну із складових системної відповіді організму на опромінення, яка включає крім підсилення чи індукції різноманітних захисних і відновлювальних процесів розвиток радіаційного ураження. Геном клітини є головною мішенню радіаційного впливу[20]. Дані останніх десятиліть свідчать про вразливість ДНК як під впливом конститутивних внутрішньоклітинних факторів, так і зовнішніх впливів [21, 22], а також про існування різноманіття механізмів захисту і репарації, що обумовлюють успіх в пристосуванні до змін середовища та передачі спадкової інформації.

Основна частина відомостей про ключову роль ДНК як головної мішені радіаційного впливу були одержані у минулому столітті, коли радіобіологічні дослідження були спрямовані на ефекти середніх та високих доз, рівень яких визначає виживаність організму того чи іншого виду. Чорнобильська катастрофа, що призвела до різноманіття сценаріїв та рівнів доз опромінення, підсилила увагу до ефектів малих доз, які на 1-2 порядки нижчі за дози, що визначають LD₅₀, LD₃₀.

Ряд відкритих ефектів малих доз були названі не мішенними ефектами[23], та включають радіаційно-індукований ефект свідка [24], нестабільність геному [25], адаптивну відповідь [26], низько-дозову гіперчутливість [27], відтерміновану репродуктивну смерть клітини [28], явище геномної нестабільності. Важливою особливістю не-мішенних ефектів є те, що вони можуть виникати внаслідок опромінення в низьких дозах, та не вимагають прямого контакту іонізуючого випромінювання з ДНК.

Радіаційно індукований ефект свідка - це явище виникнення у неопромінених клітинах симптомів радіаційного ураження, при безпосередньому, або через середовище контакті неопромінених клітин з опроміненими [29]. Радіаційно-індукований ефект свідка показує нелінійну залежність доза-ефект, він більше проявляється при низьких дозах опромінення, та може знижуватись при високих дозах опромінення. Як результат, цей ефект може пов'язаний з радіопротекторною відповіддю при низьких дозах опромінення [30]. Було виявлено, що ознаки геномної нестабільності та радіаційно-індукований ефект свідка проявляються у індукції уражень ДНК[31], появі хромосомних аберацій, мікроядер [32-35], обміні сестринськими хроматидами, хромосомній нестабільності[36,37], трансформації[38], апоптозі[39], альтернативній експресії генів[40], диференціації[41], змін в профілі мікро-РНК [42,43].

Вивчення ефектів малих доз на різних біологічних системах, виявило появу множинних генетичних ушкоджень за умов прямої чи непрямой дії опромінення, явища, яке увійшло у наукову термінологію під назвою радіаційно – індукованої нестабільності ДНК [19, 22]. За сучасними уявленнями, радіаційно – індукована нестабільність геному (РІНГ, RIGI) – це виникнення *de novo* множинних генетичних ушкоджень у значній

кількості (до 30%) нащадків опромінених клітин. РІНГ є прикладом відкладеного у часі прямого або непрямого ушкодження ДНК клітини, супроводжується підвищенням рівня активних форм кисню (АФК), активації мобільних елементів, інших епігенетичних перебудов[44,45,6].

Відкриття ряду немішених ефектів стало основою зсуву парадигми в розумінні механізму дії іонізуючої радіації на живу матерію та розширюють наші уявлення про системність відгуку організму на радіаційний вплив. Цілком ймовірно, що у формуванні ефектів малих доз задіяні кілька різних шляхів, і різні типи клітин можуть по-різному реагувати на кожен із них [46-48].

Активні форми кисню (АФК) вносять ключовий внесок у основні ефекти малих доз - явищі геномної нестабільності та в радіаційно-індукованого ефекту свідка [32]. АФК можуть передаватися від неопроміненої клітини опроміненій через пасивну дифузію, міжклітинні втулки, або шляхом активного транспорту. Оскільки АФК мають короткий період життя, то в передачі оксидативного ураження на дальні відстані бере участь перекис водню(H_2O_2), що має набагато довший період існування[49]. Окрім ДНК, перекис водню вражає також білки та ліпіди, таким чином здійснюючи комплексне ураження клітини[50].

Перераховані ефекти малих доз яскраво демонструють системність відгуку організму на опромінення, базуючись на багаторівневій системі міжклітинних комунікацій різної фізичної природи.

Разом з тим, системність відповіді на дію радіації має, щонайменше два аспекта. Перший із них, як зазначено вище, пов'язаний з можливістю формування ефектів дії радіації на ДНК в тканинах, органах і навіть в цілісних організмах, які безпосередньо не піддавалися опроміненню, але

були в контактi з опромiненими бiологiчними структурами.

Не менш важливим у теоретичному i практичному аспектах є питання про виникнення i тривалiсть збереження реакцiї на опромiнення, перетворення первинних реакцiй в довготривалi змiни метаболiчних процесiв. В радиобiологiчнiй термiнологiї це визначають як вiддаленi ефекти.

У першому наближеннi, реакцiї на дiю стресового фактору можна роздiлити на "швидкi", тривалiстю вiд наносекунд до хвилин i навлiть годин, "середнi", що охоплюють частину або весь онтогенез рослини, i "вiддаленi", якi надiленi трансгенерацiйним ефектом.

При цьому розрiзняються по тривалостi формування i пiдтримання, як реакцiї ураження, так i захиснi i репаративнi реакцiї

Найбiльш простим для вивчення часових характеристик стресу-вiдповiдi є варiант одноразової короткострокової дiї з наступним переходом "швидких" реакцiй на дiю в довгостроковi процеси розвитку ураження i прояв захисних механiзмiв. На даний момент надiйно дослiдженi "швидкi" реакцiї як на iонiзуюче, так i на не iонiзуюче опромiнення.

Радиобiологiчними i генетичними дослiдженнями доведено, що ДНК клiтини, як бiофiзична структура i носiй генетичної iнформацiї, є ключовою мiшенню для радiацiйного ураження i в той же час визначає розгалужену систему захисту, вiдновленнi i метаболiчних змiн. При всiй рiзноманiтностi напрямiв дослiдження ключовими є питання про виникнення та тривалiсть збереження реакцiї на стресовий фактор, перетворення первинних реакцiй ураження на стрес-фактор на тривалi

зміни метаболічних процесів. У першому наближенні реакції на дію стресового фактора можна розділити на «швидкі», що займають від наносекунд до хвилин і годин, «середні», що охоплюють частково або весь онтогенез рослини і «тривалі», що мають трансгенераційний ефект[17,45]. При цьому розрізняються за тривалістю формування та підтримки, як реакції ушкодження, так і захисні та відновлювальні реакції.

Дослідження метаболічних ефектів на сформованій рослині за умов передпосівного опромінення насіння є яскравим прикладом формування «швидких» реакцій з подальшим їх перетворенням в довгострокові процеси розвитку ушкодження ДНК, включення відновлювальних і захисних механізмів.

Оскільки об'єктом дослідження є процеси довготривалого формування метаболічних реакцій на опромінення при одноразовому, передпосівному опроміненні насіння, розглянемо сучасний рівень дослідження щодо структурних і функціональних механізмів, що обумовлюють уразливість та стійкість ДНК до ураження .

1.4. Механізми і фактори стійкості первинної структури ДНК

В живій клітині ДНК постійно піддається впливу різних ендогенних (такі як вільні радикали та активні форми кисню) або екзогенних (іонізуюче або УФ випромінювання, алкілюючі хімічні агенти) вражаючих факторів. Крім дії механізмів репарації, які доцільно віднести до функціональних механізмів, що забезпечують високу стабільність передачі спадкової інформації, важливим є механізми організації структурної стабільності ДНК, тобто механізми, які знижують рівень її ушкодження за рахунок певної просторової організації.

Важливим аспектом цієї проблеми виявилось відкриття гетерогенності первинної структури ДНК. Наприкінці 60-х років роботами американських учених Р. Бріттена, Е. Девідсона та інших було відкрито фундаментальну особливість молекулярної структури геному еукаріотів – нуклеотидні послідовності різного ступеня повторюваності. Це відкриття було зроблено за допомогою молекулярно-біологічного методу вивчення кінетики ренатурації денатурованої ДНК. Розрізняють такі фракції у геномі еукаріотів.

1. Унікальні, тобто послідовності, представлені в одному екземплярі або небагатьма копіями. Як правило, це кодуючі білок структурні гени або псевдо гени – нуклеотидні послідовності, що втратили можливість експресувати білки.

2. Низькочастотні повтори – послідовності, що повторюються десятки разів.

3. Проміжні, або середньочастотні, повтори – послідовності, що повторюються сотні та тисячі разів. До них відносяться гени рРНК, тРНК, гени рибосомних білків та білків-гістонів.

4. Високочастотні повтори, кількість яких сягає 10 мільйонів на геном . Це короткі (~ 10 пн) некодуючі послідовності, що входять до складу прицентромерного гетерохроматину та теломер.

Повтори утворюють так звані родини, під якими розуміють сукупність послідовностей, здебільшого гомологічних одне одному. Виділяють два основних типа організації в хромосомній ДНК: тандемні повтори (або сателіти) і дисперговані по всьому геномі послідовності.

До послідовностей, що тандемно повторюються, відносяться три основні групи ДНК: сателіти, мінісателіти та мікросателіти.

Сателітна ДНК утворена великими ділянками послідовностей, що тандемно повторюються, різної складності. Повтори ДНК цього типу не транскрибуються, і знаходяться переважно в гетерохроматинових ділянках геному, таких як центромери та райони вторинних перетяжок.

Мінісателіти складаються із послідовностей, що тандемно повторюються, розміром від 10 до 100 п.н.[51,52] та загальною протяжністю до 20тис. п.н., які дисперговані серед різних ділянок геномної ДНК. До цих повторів відносяться високо поліморфні (гіперваріабельні) мінісателітні ДНК, що застосовуються в ДНК-фінгерпринті. Мінісателіти входять також до складу центромер і теломер. Гіперваріабельні мінісателіти мають корові одиниці довжиною 9-64 п.н. і спостерігаються в центромерних ділянках гетеро хроматину[53].

Мікросателіти являють собою короткі тандемні повтори розміром до 9 п.н, дисперговані по всьому геному [52]. Мікросателіти утворюють поля до 1 тис. п.н. Це найбільш варіабельний тип послідовностей, внаслідок частих мутацій.

Дисперговані повтори - повторювані послідовності нуклеотидів у геномі, які відрізняються від тандемних повторів тим, що розташовані на відстані одне від одного, а не послідовно. Зустрічаються в еукаріотичних та прокаріотичних геномах [54]. До диспергованих повторів відносяться ретротранспозони: довгі дисперговані повтори (LINEs, long interspersed elements) та короткі дисперговані повтори (SINEs, short interspersed elements).

LINEs являють собою групу ретротранспозонів довжиною біля 7тис. п.н. без довгих кінцевих повторів (LTR), що широко поширені в геномах еукаріот [55,56]. LINEs транскрибуються в мРНК і транлюються в білок,

який діє як зворотня транскриптаза, що створює ДНК-копію РНК LINE, яка може бути інтегрована в геном в новому місці.

На основі структурних особливостей і філогенії ключового ферменту, зворотної транскриптази (RT), LINEs згруповані в п'ять основних груп: L1, RTE, R2, I і Jockey, які можна поділити як мінімум на 28 клад [57].

В геномах рослин досі повідомлялося лише про LINE клад L1 і RTE [58-60]. В той час як елементи L1 диверсифікуються в декілька субкладів, LINE RTE-типу надзвичайно консервативні і часто складають єдине сімейство [61,62].

У грибів були ідентифіковані Tad, L1, CRE, Deceiver і Inkcap-подібні елементи,[63] при цьому Tad-подібні елементи з'являються виключно в геномах грибів.[64]

Короткі дисперговані повтори (SINE) — це неавтономні, некодуєчі білок мобільні елементи (TE), що не містять довгих кінцевих повторів (LTR) [65]. Довжина SINE складає від 100 до 700 п.н.[66]. Вони являють собою клас ретротранспозонів, що ампліфікуються в еукаріотичних геномах через проміжні РНК.

Внутрішні області SINE походять від тРНК (а також від 7SL РНК у гризунів і приматів і від 5S рРНК у деяких риб і ссавців[67]) і залишаються високо консервативними, що допускає наявність позитивного еволюційного тиску для збереження структури та функції SINE.

SINEs є по суті генетичними паразитами, здатними викликати серйозні генетичні захворювання. Разом з цим, вони є суттєвими джерелами генетичної мінливості, і відіграють суттєву роль в еволюції, впливаючи на реорганізацію хроматину і регуляцію геномної архітектури, таким чином змінюючи експресію генів.

Відмічено, що хромосомні аберації частіше утворюються в сателітних послідовностях ДНК, що може свідчити як про вищу їх вразливість ушкоджуючим факторам в зв'язку з особливостями компактизації, так і нижчу доступність системам репарації.

Система компактизації ДНК відіграє одну з центральних механізмів забезпечення структурної стійкості ДНК. Першим рівнем упакування, компактизації ДНК еукаріот є нуклеосома. Нуклеосома утворена ділянкою нитки ДНК, що намотана на серцевину із основних білків-гістонів; ця структура є ефективним структурним механізмом захисту ДНК від ушкоджень. Серцевина нуклеосоми складається із восьми білків: по дві копії гістонів H2A, H2B, H3 і H4, N-кінець (хвіст гістону) кожної білкової молекули виступає назовні нуклеосоми і може бути місцем різних ковалентних модифікацій. Довжина ділянки ДНК, що входить до складу нуклеосоми, становить 146 п.н., вона намотана на білкову серцевину у вигляді лівозакрученої суперспіралі у 1,7 рази. Нуклеосоми розміщуються вздовж ДНК досить регулярно, з відстанню від 8 до 80 по. Цей проміжок має назву лінкерної ДНК. Послідовність нуклеосом і лінкерних ділянок формує і переважно підлягає подальшій компактизації.

Подальша компактизація ДНК у складі хроматину пов'язана з утворенням нуклеосомних комплексів (нуклеомерний рівень.). Утворюється компактна хроматинова фібрила побудована або за типом соленоїда (спіральний тип укладання), або по нуклеомерному типу (4-12 нуклеосом утворюють глобулу).

Наступний етап компактизації ДНК пов'язаний з утворенням петлеподібних структур, які називаються хромомерами. При цьому можливі два шляхи упаковки ДНК за допомогою негістонових білків:

Нитка нуклеосом розбита на ділянки по 20 - 80 тисяч пар азотистих основ (в середньому - 50 тисяч). У місцях розбивки знаходяться молекули - глобули негістонових хромосомних білків. ДНК - зв'язуючі білки впізнають глобули негістонових білків і зближують їх. Утворюється петлеподібні структури. Середня довжина петлі (300-400 нм) подібна у різних організмів (дрозофіла і людина) і включає приблизно 50 тисяч основ. Таку петельну структуру називають інтерфазною хромомемою.

Наступним рівнем компактизації генетичного матеріалу є хромонемний рівень. При діленні клітин йде подальша компактизація хромосом - утворення більших петель з хромомерної фібрили. На поверхні упакованої молекули ДНК зв'язані безліч білків, які утворюють подобу чохла. Якщо видалити цей чохол, то під електронним мікроскопом можна чітко побачити, що кожна хроматида побудована з хроматинових петель, що відходять від центральної осі.

Завершуючим рівнем компактизації ДНК є хромосомний рівень. Подальша компактизація хромосом забезпечується петельним укладанням хромонемної нитки. На цьому етапі відбувається об'єднання петель, які мають однакову організацію, утворюються блоки або мінідиски. У створенні одного мінідиска беруть участь приблизно близько 20 петель. Таким чином, за рахунок декількох рівнів компактизації довжина ДНК скорочується на чотири порядки.

1.5 Функціональні механізми забезпечення стабільності ДНК.

Антиоксидантний захист

Антиоксиданти, що представлені низькомолекулярними сполуками (неферментативні) і білковими молекулами (ферментативні) є конститутивними елементами системи підтримки нормального окислювально-відновного гомеостазу в живих організмах [68,69,13]. Антиоксиданти відіграють активну захисну роль від стресу, викликаного біотичними або абіотичними чинниками [69-71,18].

Одним із найбільш ефективних факторів, що викликають стан оксидативного стресу, є опромінення, яке викликає підвищення напрацювання антиоксидантів [69,72,15,16], що активно використовуються в медичних цілях[71-75].

Застосування опромінення для стимуляції зсуву метаболічних процесів в рослинах з метою підвищення напрацювання антиоксидантних сполук ґрунтується на системності захисних реакцій організму. Цікавим явищем є активація реакцій адаптації та захисту не тільки у безпосередньо опромінених рослинах, але і у неопромінених органах одного організму і навіть у неопромінених організмів, що розділяють одне серидовище з опроміненими організмами[76-79].

Серед низькомолекулярних антиоксидантів, функції каротиноїдів, токоферолів, аскорбінової кислоти та глутатіону у відповідях рослин на стрес були широко вивчені[80-83]. Проте порівняно небагато досліджень вивчали роль вторинних метаболічних шляхів у реакції рослин на стрес. Фенілпропаноїдний шлях відповідає за синтез різноманітних фенольних метаболітів, таких як флавоноїди, дубильні речовини, гідроксициннаматні ефіри та структурний полімер лігнін. Ці сполуки часто індукуються

стресом і виконують певну роль у захисті рослин, наприклад, у захисті від патогенів або ультрафіолетового опромінення, як антиоксиданти, або як структурні компоненти клітинної стінки [84,85]. Структурно-функціональні дослідження флавоноїдів показали, що положення їхніх гідроксильних груп, подвійних вуглецевих зв'язків і модифікацій, таких як глікозилювання та метилювання, визначають їхні антиоксидантні властивості [86]. Серед флавоноїдів флаваноли епікатехін галат і епігаллокатехін галлат, а також флавонол кверцетин є чудовими антиоксидантами *in vitro*, виявляючи антиоксидантну активність у 5 разів вищу, ніж α -токоферол і аскорбінова кислота [86]. Флаваноли та флавоноїди привертають до себе значну увагу у харчовій промисловості та біомедицині через їх протизапальну, протиалергічну, антитромбоцитарну, протівірусну та протипухлинну дію, яка спричинена, принаймні частково, їхніми потужними антиоксидантними властивостями[87]. Однак внесок цих сполук у систему антиоксидантного захисту та їх значення у відповіді рослин на посуху не до кінця вивчені.

1.6 Функціональні механізми забезпечення стабільності ДНК. Репаративні процеси

«Пряма» репарація. Відомо, що клітини усувають тільки три типи пошкоджень ДНК, які не передбачають розриву фосфодіефірного остову. Утворення піримідинових димерів під час опромінення ультрафіолетовим світлом призводить до аномального ковалентного зв'язку між сусідніми піримідиновими основами. Процес фотореактивації безпосередньо усуває це пошкодження під дією ферменту фотоліази, чия активація обов'язково залежить від енергії, поглиненої синім/УФ-світлом (довжина хвилі 300–

500 нм) для сприяння каталізу [88]. Фотоліаза - фермент, присутній у бактеріях, грибах і більшості тварин, однак не функціонує в організмі людини [89], замість цього використовуються інші системи репарації уражених нуклеотидів, щоб відновити пошкодження від УФ-опромінення. Інший тип пошкодження, це метилювання основ гуаніну, безпосередньо регулюється ферментом метилгуанінметилтрансферазою (MGMT), бактеріальний еквівалент якого називається *ogt*. Це «дорогий» в енергетичному сенсі процес, оскільки кожна молекула MGMT може бути використана лише один раз; тобто реакція є стехіометричною, а не каталітичною. Третій тип пошкодження ДНК, який усувається клітинами, - це певне метилювання основ цитозину та аденіну.

Репарація одноланцюгових розривів. Якщо лише одна з двох ланцюжків подвійної спіралі має дефект, комплементарний ланцюг використовується як шаблон для відновлення пошкодженого ланцюга. Щоб відновити пошкодження однієї з двох парних молекул ДНК, існує ряд механізмів ексцизії (вирізання), які видаляють пошкоджений і замінюють його непошкодженим нуклеотидом, комплементарним тому, що знаходиться в інтактному ланцюзі ДНК[90].

При цьому можлива ексцизійна репарація основ (BER): пошкоджені одиничні основи або нуклеотиди найчастіше відновлюються шляхом видалення основи або нуклеотиду і в подальшому вставлення правильного нуклеотиду. Під час ексцизійної репарації основи фермент глікозилаза [91] видаляє пошкоджену основу з ДНК, розриваючи зв'язок між основою та дезоксирибозою. Ці ферменти видаляють єдину основу для створення апуринового або апіримідинового сайту (AP-сайт). Ферменти, які називаються AP-ендонуклеазами, розрізають пошкоджену ДНК у місці AP.

Потім ДНК-полімераза видаляє пошкоджену ділянку за допомогою своєї 5'-3' екзонуклеазної активності та правильно синтезує новий ланцюг, використовуючи комплементарний ланцюг як шаблон. Потім розрив зшивається ферментом ДНК-лігазою[92].

Можливий і інший шлях репарації одно ланцюгових розривів - ексцизійна репарація нуклеотидів (NER): об'ємне пошкодження, яке спотворює спіраль, наприклад димеризація піримідину, викликане ультрафіолетовим світлом, зазвичай усувається за допомогою три-етапного процесу. Спочатку розпізнається пошкодження, потім ланцюги ДНК довжиною 12-24 нуклеотиди видаляються як вище, так і нижче за місцем пошкодження за допомогою ендонуклеаз, і потім видалена ділянка ДНК повторно синтезується. NER є еволюційно збереженим механізмом відновлення, який використовується майже у всіх еукаріотичних і прокаріотичних клітинах. У прокаріот NER опосередковується білками Uvr. В еукаріотах задіяно набагато більше білків, хоча загальна стратегія та сама.[93]

Третім механізмом репарації одно ланцюгових розривів є репарація неспарених основ. Цей механізм задіює щонайменше два білка. Один виявляє невідповідність, а інший рекрутує ендонуклеазу, яка розщеплює щойно синтезований ланцюг ДНК поблизу ділянки пошкодження. У більшості еукаріот аналогом MutS є MSH, а аналогом MutL є MLH. MutH присутній тільки в бактеріях.

Репарація дволанцюгових розривів. Дволанцюгові розриви, коли обидва ланцюги подвійної спіралі розриваються, особливо небезпечні для клітини, оскільки можуть призвести до реорганізації геному на рівні хромосом. Існує три механізми відновлення дволанцюгових розривів

(DSB): негомологічне з'єднання кінців (NHEJ), з'єднання кінців, опосередковане мікрогомологією (MMEJ) і гомологічна рекомбінація (HR)[90].

1. Негомологічне з'єднання кінців (NHEJ). ДНК-лігаза IV, спеціалізована ДНК-лігаза, яка утворює комплекс із кофактором XRCC4, безпосередньо з'єднує два кінці[94]. Для точного відновлення NHEJ покладається на короткі гомологічні послідовності, які називаються мікрогомологіями, присутні на одноланцюгових хвостах кінців ДНК, які потрібно з'єднати. Якщо ці виступи сумісні, репарація зазвичай виконується точно. NHEJ також може створювати мутації під час відновлення. Втрата пошкоджених нуклеотидів у місці розриву може призвести до делецій, а з'єднання невідповідних кінців утворює вставки або транслокації. У вищих еукаріотів існують «резервні» шляхи NHEJ. Окрім ролі опікуна геному, NHEJ необхідний для з'єднання дволанцюгових розривів із шпилькою.

2. Мікрогомологічне з'єднання кінців (MMEJ) починається з резекції короткого кінця за допомогою нуклеази MRE11 по обидві сторони дволанцюгового розриву до виявлення ділянок мікрогомології. Це найбільш неточний механізм репарації, що гарантовано призводить до втрати генетичного матеріалу що може спричинити мутації. Цей тип репарації застосовується лише у випадку, коли інші системи репарації недоступні.

3. Репарація шляхом гомологічної рекомбінації (HR) вимагає наявності ідентичної або майже ідентичної послідовності для використання як шаблону для відновлення розриву. Ферментативний механізм, відповідальний за цей процес відновлення, майже ідентичний

механізму, відповідальному за кросинговер хромосом під час мейозу. Цей шлях дозволяє відновити пошкоджену хромосому, використовуючи сестринську хроматиду (доступну в G2 після реплікації ДНК) або гомологічну хромосому як шаблон. DSB, спричинені механізмом реплікації, який намагається синтезувати через одноланцюговий розрив або невідновлене ураження, спричинює колапс реплікаційної вилки та зазвичай репарується шляхом рекомбінації.

1.7 Види найпоширеніших уражень ДНК під дією внутрішніх та зовнішніх факторів

Пошкодження ДНК включають в себе модифіковані основи, АП-сайти, одно- та дволанцюгові розриви, кластерні ураження. Модифіковані основи, АП-сайти та одно ланцюгові розриви можуть ефективно усуватися наявними в клітині системами репарації. З іншого боку, дволанцюгові розриви (ДР) є найбільш серйозними типами пошкоджень ДНК, оскільки складно репаруються і часто приводять до різних хромосомних перебудов.

Хромосомні аберації – це тип мутацій, що змінюють структуру хромосом. Вони виникають в клітині внаслідок дволанцюгових розривів. Окрім екзо- та ендогенних чинників, на ймовірність утворення подвійних розривів на данній ділянці ДНК впливають наступні фактори:

- 1) довжина хромосоми - чим більша, тим більша вірогідність аберації
- 2) приналежність до гетерохроматину/еухроматину - основна маса хромосомних аберацій спостерігається в гетеро хроматині – через більшу щільність ДНК та складність доступу до неї ферментам репарації.
- 3) наявність особливих «ломких сайтів хромосом». Ці сайти зазвичай асоційовані з пізньореплікуючим хроматином [95], та найчастіше

знаходяться в межах дуже довгих генів (біля 1 млн пар основ та більше). Недавні дослідження зв'язують фрагільність хромосом з дефіцитом сайтів ініціації реплікації в цих районах[96].

Хромосомні аберації можна поділити на два типи: стабільні та нестабільні. Стабільні хромосомні аберації – це ті, які можуть передаватися від клітин своїм потомкам в ході мітозу або мейозу. Такі хромосомні аберації включають в себе хромосомні перестановки, які не мають в собі втрати генетичного матеріалу – тому клітини-потомки зберігають свою життєздатність. До них відносять інверсії, дуплікації та реципроктні транслокації. До нестабільних аберацій відносять ті, які не здатні передаватися в потомстві клітин під час мітозу/мейозу. До них відносять аберації, що супроводжуються втратою генетичного матеріалу та/або центромер/теломер, такі як дицентричні або кільцеві хромосоми, фрагменти хромосом без центромери. Клітини, що містять такого роду аберації поступово елімінуються з організму, тому не передаються потомкам.

Іншим серйозним типом пошкоджень ДНК є кластерні ураження - два або більше уражень (окислені основи, АП-сайти, розриви ланцюга) на декількох витках спіралі ДНК на протилежних ланцюгах, що ініціюються іонізуючою радіацією. Такого роду ураження важко репаруються, тому мають велике біологічне значення. Оскільки кількість радіаційно-індукованих кластерних уражень в 3-4 рази більше, ніж подвійних розривів, і вони практично відсутні у неопромінених клітинах, рівень кластерних уражень безпосередньо після опромінення може бути чутливим дозиметром. Оскільки певні кластери не репаруються і можуть

накопичуватися в клітині, то вони можуть слугувати в якості інтегрального дозиметра біологічних ефектів радіаційного ураження[97].

1.8. Особливості впливу іонізуючого опромінення на ДНК

Радіаційне ураження клітин може бути спричинене прямою та непрямою дією радіації на молекули ДНК. У випадку прямої дії, радіація вражає молекули ДНК напряду, розриваючи ковалентні хімічні зв'язки між атомами (Рис 1.1). Такі структурні зміни ведуть до уражень клітини або навіть її смерті. Уражені клітини, що вижили, можуть пережити мутагенні зміни та спричинити канцерогенез. Цей процес є домінуючим у випадку іонізуючого випромінювання з високою лінійною передачею енергії (ЛПЕ), таких як альфа-частинки або нейтрони. У випадку непрямої дії, випромінювання вражає молекули води або інші органічні молекули в клітині, генеруючи вільні радикали, такі як активні форми кисню (АФК) або активні форми азоту (АФА). Було встановлено, що більшу частину уражень ДНК несе саме від непрямої дії радіації, оскільки вода становить 70% маси клітини [98].

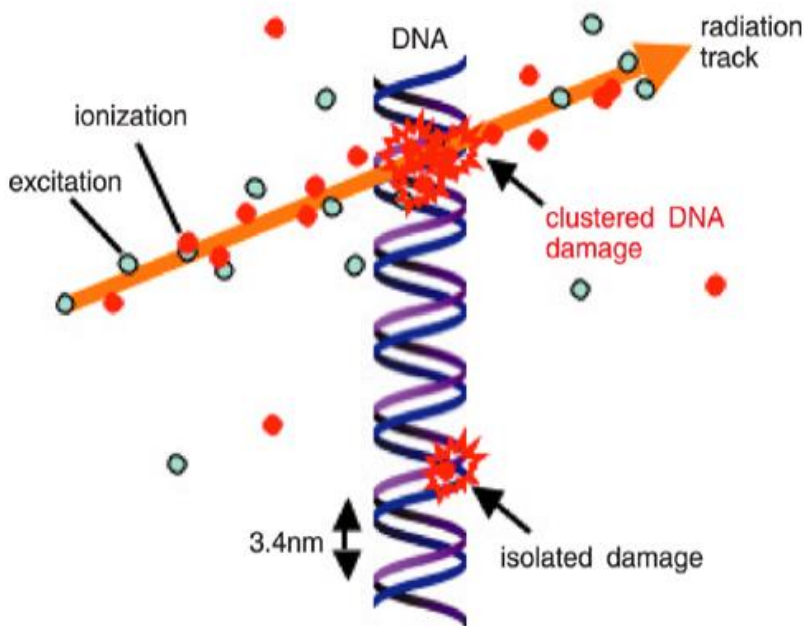


Рис. 1.1. Кластерні ураження, утворені внаслідок дії іонізуючого опромінення

1.9 Особливості впливу УФ-випромінювання на ДНК

Дія ультрафіолетового випромінювання на ДНК, суттєво відрізняється від дії іонізуючого випромінювання. Основна причина – різниця в енергіях, що несуть ці два типи випромінювань. Якщо енергія ультрафіолетового фотону з довжиною хвилі 250 нм (сонячний ультрафіолет спектру С) складає 5 еВ, то енергія гамма- фотону - понад 10^5 еВ. Енергія корпускулярного або хвильового іонізуючого випромінювання перевершує енергію будь-якого хімічного зв'язку, в той час як енергії ультрафіолетового фотону не достатньо для розриву ковалентних зв'язків між атомами. Таким чином, іонізуюча радіація викликає розрив хімічних зв'язків та утворення іонізованих молекул і вільних радикалів, в той час як ультрафіолет переводить атоми або молекули у збуджений стан. Безпосередньо в ДНК ультрафіолет викликає модифікації пуринових та

піримідинових азотистих основ, які згодом, при репарації можуть спричиняти одноланцюгові або дволанцюгові розриви ДНК.

Ультрафіолетові фотопродукти піримідину є основними продуктами дії ультрафіолетового випромінювання на ДНК(рис. 1.2). Існує три класи піримідинових уражень: циклобутанові піримідинові димери (CPD), 6-4 фотопродукти піримідину (6-4PP) та їхні ізомери Дьюара [99-104]. Два суміжні цитозини розглядаються як гарячі точки мутацій при впливі УФ-В та УФ-С випромінювання [103]. Було встановлено, що послідовності Т-Т і Т-С є більш фотореактивними, ніж послідовності С-Т та С-С [105].

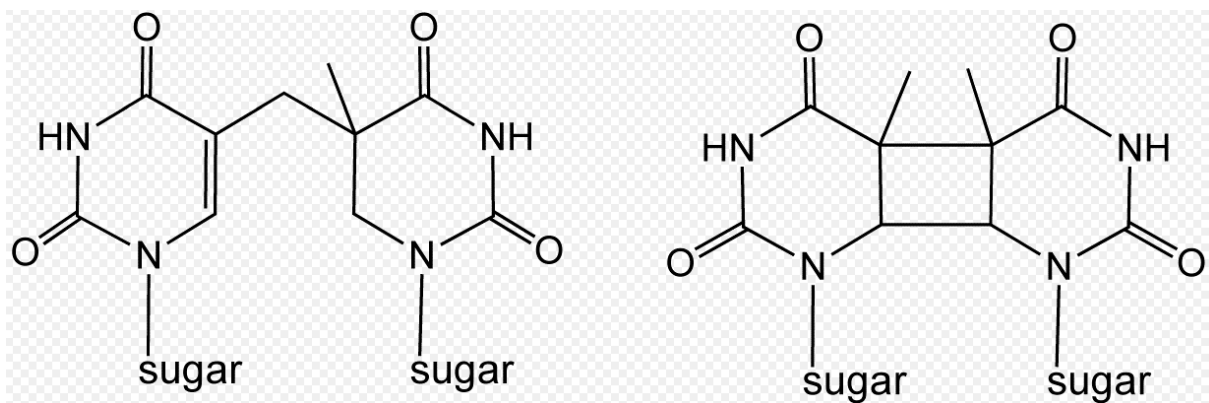


Рис. 1.2. Піримідинові ураження, утворені внаслідок дії ультрафіолетового опромінення

Пошкодження азотистої основи ультрафіолетовим опроміненням визначається гнучкістю ланцюга ДНК, а також характером і положенням основи. CPD утворюються частіше шляхом реакції циклічного замикання між двома основами піримідину [106] в одноланцюговій ДНК (ssDNA) та на гнучких кінцях полі (dA) - (dT) трактів, але не в їх жорсткому центрі [107, 108]. Згинання ДНК у бік малого жолобка зменшує утворення CPD [109]. Один з факторів транскрипції, ТАТА-зв'язуючий білок (ТВР), сприяє селективному утворенню 6-4PPs в ТАТА-боксі, де ДНК згинається, але

CPD формуються переважно на межі боксу ТАТА і зовні, де ДНК не згинається [110]. Кількість CPD та 6-4PPs становить приблизно 75 та 25% від загальної кількості спричиненим УФ-випромінюванням пошкоджень ДНК [100]; однак співвідношення між виходом CPD та 6-4PP в основному залежить від двох сусідніх основ, що беруть участь у формуванні димерів [111]. Таким чином, неоднорідний розподіл УФ-індукованих фотоушкоджень ДНК залежить від нуклеотидних послідовностей, які полегшують згинання ДНК, а також модуляції хроматину через зв'язування з певним білком [112]. Картографування CPD на ділянках корової нуклеосомної ДНК опроміненого хроматину виявило утворення CPD із середньою відстанню в 10,3 основи від поверхні гістонів [113]. Утворення фотопродуктів не обмежується клітинами, що піддаються впливу УФ-В або УФ-В + УФ-А випромінювання; також спостерігалось УФ-А-індуковані CPD як у бактерій, так і в еукаріотичних клітинах [114–116].

Хоча дипіримідинові фотопродукти є переважним результатом дії ультрафіолетового випромінювання, також було визнано біологічне значення модифікованих УФ-випромінюванням пуринових основ ДНК [117]. Сюди входять фотопродукти, які містять, щонайменше, один аденіновий залишок, який піддається реакції фотоциклічного з'єднання з суміжним аденіном або тимін під дією ультрафіолетового випромінювання [118,119]. Рівень фотопродукту, що містить аденін (АТ), дуже низький (1×10^{-5} у нативній ДНК), але ці пошкодження можуть внести вклад в біологічний вплив УФ-випромінювання з огляду на те, що адукти АТ є мутагенними [120,121]. УФ-індуковані реактивні форми кисню(ROS) діють як сильні окислювачі, які можуть спричинити окислювальні пошкодження ДНК. Було виявлено ряд продуктів окислення пуринових основ, таких як 8-оксо7,8-дигідрогуаніл (8-оксоГуа), 8-оксо-аденін, 2,6-

діаміно-4-гідрокси-5-формамідогуанін (FapyGua), FapyAde та оксазолон, утворених після опромінення ДНК ультрафіолетовим випромінюванням [105, 122, 123].

В цілому було зроблено висновок, що ультрафіолетові ураження ДНК, такі як CPD, 6-4PPs, АП-сайти, розриви ланцюга та окиснені продукти основ, є переважаючими та найбільш стійкими ураженнями, і якщо вони не будуть репаровані, можуть спричинити сильні структурні спотворення в молекулі ДНК, тим самим впливаючи на важливі клітинні процеси, такі як реплікація та транскрипція ДНК, погіршуючи життєздатність клітини та функціональну цілісність і, в результаті, призводять до мутагенезу, злоякісного переродження та загибелі клітин [124, 125].

УФ-індуковані ураження ДНК, такі як CPD та 6-4PP, демонструють різний вплив на конформацію ДНК, погіршуючи їх регуляторні функції та інші динамічні процеси [126-129]. Спектроскопія ядерно-магнітного резонансу представила нові уявлення про ураження нуклеїнової кислоти, викликане УФ-опроміненням. Встановлено, що відносна орієнтація пошкоджених залишків відрізняється від тієї, що спостерігається у немодифікованих дуплексах ДНК [128]. Дослідження методом NOE-спектроскопії взаємодії між групами фотоадукту Н6 та метильними групами (СН3) встановило, що цис-син CPD міняє конформацію циклобутану з лівого повороту (спостерігається в ізольованому димері) на правий поворот у модифікованому ДНК-дуплексі [130]. Оцінка даних хімічного зсуву свідчить про те, що спіраль ДНК є більш ламкою зі сторони 3'- цис-сін димеру та 5' –транс-сін відповідно. Встановлено, що наявність транс-син-CPD викликає спотворення в значній мірі, ніж продукт цис-син за допомогою перекручування або дислокації на 5-ти

стороні димеру у дволанцюговій ДНК [131]. Румора та ін. [132] дослідили структурні зміни, спричинені димером тиміну, у дуплексі ДНК за допомогою декількох невеликих, селективних хімічних зондів. Утворення 6-4PPs і їх ізомери Дюара викликають помітну зміну конформації дуплексу ДНК. Спотворення подвійної спіралі, спричинене 6-4PP, набагато більше, ніж у CPD [133].

Основні конформаційні відхилення, спричинені (6-4) аддуктом і продуктом Дюара, пов'язані з їх впливом на глобальну кривизну ДНК. Обидва дуплексні декамери значно зігнуті в місцях ураження. На відміну від 6-4PPs, 5,6-дигідро-5-гідрокситимінові основи є найбільш збуреною частиною 6-4 продукта Дюара. Навіть незважаючи на те, що між 5,6-дигідро-5-гідрокситиміном і його аденіновим партнером немає водневих зв'язків, це пошкодження виробляє незначне спотворення в порівнянні з 6-4PP. Загалом спіральний вигин, індукований (6-4) аддуктами і продуктом Дюара дорівнює відповідно 44° та 21° [129]. Усі додаткові іміно протонні резонанси від флангових пар основ спостерігалися у зоні з водневими зв'язками, що вказує що структура (6-4) адукту всередині дуплексу показує виразну орієнтацію основи через (6-4) ковалентний зв'язок, що робить нормальний водневий зв'язок типу Уотсона-Кріка непереважним на 3-стороні місця ураження з порожнім простором між 3-тиміном (T6) та його протилежною основою (A15) [129]. Всупереч дуплексному (6-4) димеру, який зберігає водневий зв'язок імінопротона на 5-ти стороні (T5) (6-4) ураження, T5-іміно-протон пошкодження Дюара не має водневого зв'язку. Характеристика ЯМР дуплексу, що містить 6-4PP-димер, показав, що 5- залишок ураження залишається непорушеним. Однак 5-піримідиновий залишок втрачає ароматичність і набуває додаткову гідрофільну групу [128,134]. Торсіонний кут глікозильного зв'язку біля

залишку Т5 (6-4) ураження та пошкодження Дьюара переважає в анти- і високо-антиконформації відповідно, і таким чином обидва ураження виявляють значний диференціальний вплив на структуру скелету ДНК. Було виявлено, що великі структурні спотворення, викликані (6-4) ураженням можуть забезпечити краще розпізнавання ферментом репарації, який може виявити кореляцію з вищим рівнем репарації аддукту Т-Т (6-4), ніж у Т-Т продукту Дьюара і димера цис-сін Т-Т [129]

Утворення дволанцюгових розривів(DSB) ДНК в опромінених УФ клітинах, зокрема при реплікації ДНК, було давно встановлено [135]. Розриви ланцюга ДНК часто спостерігаються в клітинах під впливом УФ-В [136,137]. Реактивні форми кисню, індуковані УФ-В [138], а також ураження ДНК (CPDs та 6-4PPs) можуть спричинити первинні, так і вторинні розриви відповідно. Ці ураження зазвичай асоціюються з блокуванням транскрипції / реплікації, що може призвести до утворення дволанцюгових розривів ДНК у місцях згортання вилок реплікації ДНК, що містять CPD [139, 140]. Дюнкерт і Кайна [141] також спостерігали індуковані УФ-С подвійні розриви ДНК, що виникають внаслідок реплікації пошкодженої ДНК. Значно нижча кількість DSB була виявлена в клітині, де гальмувалася реплікація. Було припущено, що початкові фотопродукти перетворюються на подвійні розриви під час реплікації ДНК через не чітко визначений процес, "колапс вилок реплікації" [142]. Після маркування радіоактивними мітками реплікуючої ДНК SV40-трансформованих людських клітин, опромінених ультрафіолетом, спостерігався вищий рівень подвійних розривів у клітинах з нестачою NER порівняно з клітинами з нормальною NER-репарацією. Ці результати надалі підтверджують думку про те, що подвійні розриви виникають під час реплікації нерепарованих УФ-індукованих уражень ДНК [140].

Подвійні розриви можуть утворюватися в результаті одно ланцюгових розривів, пропущених через екзисційну репарацію основ [143, 144]. В цілому, схоже, що УФ-випромінювання напряду не спричинює подвійних розривів ДНК, але продукує піримідинові димери та інші фотопродукти, що призводять до зупинки реплікації та подвійних розривів. Зупинка реплікації, спричинена ультрафіолетом, у варіанті пігментного ксеродерми (XPV) з подальшим накопиченням комплексу Mre11 / Rad50 / Nbs1 та фосфорильованого гістону H2AX (γ -H2AX) у великих ядерних осередках на місцях зупинених вилок реплікації також свідчить, що пошкодження УФ-радіацією призводить до утворення подвійних розривів під час арешту реплікації [139, 144].

Було розглянуто низку шляхів формування подвійних розривів на роздвоєній реплікативній вилці. Було показано, що коли механізм реплікації ДНК стикається із блокуючим реплікацію дефектом, фермент ДНК -полімерази (ДП) зупиняється на блокованому місці, що призводить до утворення структури вилкоподібної Y-форми ДНК, яка може бути розпізнана певною ендонуклеазою, що послідовно робить надріз в шаблонному ланцюзі, що призводить до утворення подвійного розриву біля блокованого реплікаційного ураження [145]. Крім того, реплікативний стрес може захоплювати комплекси розщеплення топоізомерази I (Top1), що призводить до появи подвійного розриву, запобігаючи Top1-опосередкованому воз'єднанню ланцюгів ДНК [146]. Вільні радикали також можуть викликати DSB [147], запобігаючи Top2-опосередкованому воз'єднанню ДНК [145, 148]. Harper et al. [149] показали, що індуковані радіацією одно-ланцюгові розриви та пошкодження ДНК, що не належать до подвійних розривів, сприяють утворенню дволанцюгових розривів під час реплікації.

1.10 Методи виявлення та оцінки ураження ДНК.

Для виявлення і аналізу ураження ДНК існують наступні методи.

Ана-телофазний аналіз. Цей метод являє собою генетичний тест, заснований на візуальному підрахунку на стадії анафази/телофази таких хромосомних аберацій, як: дицентрики, ацентричні фрагменти, відстаючі хромосоми, транслокації, делеції [150]. Цей метод є класичним для оцінки ураження ДНК, що не вимагає знання каріотипу та ідентифікації хромосом. Однак, ана-телофазний аналіз дозволяє виявити не всі типи хромосомних аберацій, і межа його чутливості лежить в межах доз опромінення 2,5-5Гр[150-152].

Мікроядерний тест. Мікроядерний тест - метод визначення генотоксичності (кластогенного) факторів зовнішнього середовища. Суть методу полягає у визначенні числа мікроядер в інтерфазних клітинах (найчастіше в клітинах циркулюючої крові або кісткового мозку).

Метод оцінки окислювально-індукованих кластерних уражень ДНК. В основі методу OCDL (Oxidative induced cluster DNA lesions), тобто окислювально індукованих кластерних пошкоджень ДНК, лежить уявлення про комплексний характер пошкодження ДНК. Тобто розглядаються не окремі окислювальні пошкодження молекули ДНК, а їх комплекс, що утворився в результаті дії генотоксичного агента. Для їх виявлення використовуються ферменти-ендонуклеази - OGG1 і EndoIII (є специфічними для пуринових і піримідинових основ відповідно), APE1 (для виявлення пошкоджень не пов'язаних з основами) [153]. Ідентифікація різних видів пошкоджень ДНК здійснюється за рахунок порівняння оброблених і необроблених ендонуклеазами зразків.

Метод ДНК-комети. Як біомаркери в даному методі використовується розрахунок кількості одно- і двуланцюгових розривів.

Метод гел-електрофорезу ізольованих клітин чи метод «ДНК комет» заснований на реєстрації різної рухливості в постійному електричному полі ДНК і можливих фрагментів ДНК лізисних клітин, втоплених в агарозний гел. При цьому ДНК мігрує до анода, формуючи електрофоретичний слід, що нагадує «хвіст комети», параметри якого залежать від ступеня пошкодження досліджуваної ДНК [154].

Метод FISH. Метод флуоресцентної гібридизації *in situ* являє собою молекулярно-цитогенетичний метод, який використовує флуоресцентні зонди, що зв'язуються лише з певними ділянками послідовності ДНК з високою ступінню комплементарності. Цей метод був розроблений на початку 1980-х років[155] для виявлення та локалізації наявності або відсутності специфічних послідовностей ДНК на хромосомах. Метод FISH застосовується для визначення місця зв'язування флуоресцентного зонду з хромосомами. FISH часто використовується для пошуку специфічних ознак в ДНК для використання в генетичному консультуванні, медицині та ідентифікації видів.[156] FISH також можна використовувати для виявлення та локалізації специфічних РНК-мішеней (мРНК, lncRNA та мікроРНК) у клітинах, циркулюючих пухлинних клітинах та зразках тканин. У цьому контексті це може допомогти визначити просторово-часові моделі експресії генів у клітинах і тканинах.

ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА

Розглянутий матеріал свідчить про високий сучасний рівень знань відносно організації генетичного матеріалу організму, впливу різних форм опромінення на його ушкодження, механізмів захисту і відновлення, типи перебудови метаболізму у відповідь на стрес різної природи.

З використанням омiк-технологiй у радіобіологічному експерименті стало відомо про значні перебудови метилому при різних режимах опромінення, широкомасштабні зміни протеому, стимуляцію не тільки репаративних та захисних механізмів, а й перебудову всього метаболону, включаючи різні блоки первинного і вторинного метаболізму. Ці факти не тільки роблять значний внесок в трансформацію радіобіологічної парадигми, але й мають значення з практичної точки зору.

На сьогодні ключовими в практичному застосуванні опромінення лишаються питання про виникнення довготривалої реакції на дію одноразового опромінення, тобто перетворення первинних реакцій ураження на довготривалі зміни метаболічних процесів та роль видо/сорто специфічної організації ДНК у цих перетвореннях. Інакше кажучи практичне застосування опромінення у біотехнологіях вимагає переходу від суто феноменологічного підходу до створення теоретичного підґрунтя його застосуванні.

Таким чином сучасний стан проблеми цілком органічно вимагає розробку підходів для визначення відбору певних сортів рослинного матеріалу для подальшого практичного використання на основі їх метаболічних та генетичних даних з подальшою оцінкою природи трансформації разового ураження на формування необхідного для практики довгострокового метаболічного відгуку.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Одержання фармацевтичної сировини ромашки лікарської

Ромашка – рослина довгого дня з широким ареалом поширення; мезофіт, використовується у різних країнах в фармакології та косметології при лікуванні запальних процесів різної етіології; лікарською сировиною є суцвіття рослини. Ромашка є однорічною рослиною та зручним експериментальним об'єктом.

Дослідження проведено на 8 генотипах *Matricaria chamomilla*. Було використано 6 сертифікованих сортів різного географічного походження:

1. - генеративне покоління мутанту Перлина лісостепу (отриманий обробкою гербіцидом Раундап МАКС 450 г/л гліфосату у кислотному еквіваленті 551 г/л. Норма внесення - 2 л/га (2 л на 250 л води);

2 -сорт Кведлінбург – від фірми Satimeх, Німеччина;

3. - сорт Горал (Словенія);

4. - сорт Азулена (Росія);

5. - сорт Злати Лан (Польща);

6. – сорт Перлина лісостепу – створений в 1999р в дослідній станції лікарських рослин Української академії аграрних наук, С. Березоточа, Лубенський р-н, Полтавська обл., 37535, Україна.

До дослідження було долучено і несортівний матеріал, що фактично є едафічними екотипами: 7- від постачальника Gold Garden Україна, у подальшому – екотип Gold Garden; 8 – від постачальника Seed Era, Україна, у подальшому - екотип Seed Era. Повторюваність досліду трикратна.

Сухе насіння опромінювали на рентгенівській установці РУМ-17

(Росія) при дозі 10 Гр, потужність дози - 1,42 сГр/с. УФ - С опромінення при дозі 5-20 кДж/м² проводили на установці ОБМ-150 М (Україна) з двома лампами Philips Special TUV 30 W (виробник - Нідерланди).

При визначенні доз рентгенівського передпосівного опромінення сухого насіння в дослідженні ґрунтувалися на відомих ефектах в області малих доз, що надають, паралельно з пошкодженням ДНК, ефекти стимуляції ростових процесів. Доза, використана в даному дослідженні, визначена як оптимальна при передпосівному рентгенівському опроміненні насіння ромашки в діапазоні доз 1 - 15 Гр. Результати дослідження закріплені патентом [8].

Аналогічно, при визначенні доз УФ-С передпосівного опромінення сухого насіння в дослідженні ґрунтувалися на відомих ефектах в області малих доз УФ –С опромінення, що надають, паралельно з пошкодженням ДНК, ефекти стимуляції ростових процесів. Доза, використана в даному дослідженні, визначена як оптимальна при передпосівному рентгенівському опроміненні насіння ромашки в діапазоні доз 5 – 20 кДж/м². Результати дослідження ефективного діапазону доз закріплені також патентом [8].

Рослини вирощували в умовах вегетаційного досліду, в горщиках, що містять 1,5 кг ґрунту, з розрахунку 10 рослин на горщик. З огляду на екологічні характеристики виду *Matricaria chamomilla* L. моделювали дерново-підзолистий суглинний ґрунт, змішуючи 1 частину ґрунту марки «Поліський» із 2 частинами піску.

Таким чином, у ході експерименту проводили вивчення фізіологічних ефектів (проростання, ріст, перехід до цвітіння, динаміку цвітіння, сумарний вихід цільової продукції) у рослин, що розвивались із насіння, яке в сухому стані, безпосередньо перед посівом підпадалося

рентгенівському і УФ- С опроміненню.

Збір суцвіть проводили на стадії їх повного розкриття. Сушку сировини здійснювали в темному приміщенні при температурі 25 - 27 °С.

Полеві дослідження проводили в умовах вирощування ромашки на ділянках площею 3м² на варіант. У досліді з вирощуванням ромашки у відкритому густина посіву становила 0,6 г насіння на 1м².

2.2 Виділення та оцінка питомого вмісту у фармацевтичній сировині низькомолекулярних антиоксидантів

Екстракцію флавоноїдів і фенолів проводили наступним чином. Подрібнену суху рослинну масу квіток (50 мг) мацерували у 5 мл 70 % етанолу при 24°C протягом 72 год, після чого фільтрували, доводили кількість фільтрату 70 % етанолом до початкового об'єму і центрифугували. До 0,5 мл екстракту додавали 0,5 мл 2 % розчину хлориду алюмінію у етанолі та 2 мл 70 % етанолу. Розчин порівняння містив 0,5 мл екстракту, 1 краплю оцтової кислоти та 2,5 мл 70 % етанолу. Визначення вмісту флавоноїдів проводили по утворенню комплексу флавоноїд-алюміній, що має жовте забарвлення. Через 20 хв інкубації вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 410 нм проти розчину порівняння, визначали концентрацію суми флавоноїдів по калібрувальному графіку рутину та виражали в мг рутинового еквіваленту. Вміст суми фенолів визначали з того ж екстракту, що і флавоноїди. До 0,1 мл екстракту додавали 0,5 мл (1/10 розведеного) реактиву Фоліна-Чокальтеу та 1 мл дистильованої води, перемішували та витримували за кімнатної температури 1 хв. Через 1 хв додавали 1,5 мл 20% розчину Na₂CO₃, перемішували та інкубували в темноті протягом 2 годин за

кімнатної температури. Визначали оптичну густину розчину синього кольору за довжини хвилі 760 нм на спектрофотометрі проти проби, що містить 0,1 мл 70% етанолу замість екстракту та виражали у мг галової кислоти еквіваленту (ГКЕ) (по калібрувальному графіку) на г сухої маси.

2.3 Виділення та оцінка питомого вмісту хамазулена у ефірній олії

Виділення ефірної олії ромашки проводили шляхом дистиляції (перегонки з паром). В колону перегонного апарату завантажували 60 грам сухих суцвіть ромашки лікарської, олію збирали за допомогою тонкої поліетиленової плівки, на яку налипало ефірна олія. Після завершення перегонки плівку діставали з приймача, каплі води видаляли за допомогою шприца і фільтрувального паперу, потім остаточно просушували 10 хвилин для остаточного видалення води. Плівку з олією зважували, після чого масло змивали 96% етанолом. Плівку без олії (просушену від спирту) знову зважували, різниця у вазі оцінювалася як маса ефірної олії.

Аналіз вмісту хамазулену в ефірній олії проводили методом ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії).

2.4 Виявлення ознак радіаційно-індукованої нестабільності геному.

За допомогою описаних в розділі 1.10 методів неможливо проаналізувати конкретні нуклеотидні послідовності, що піддаються ураженню і визначають ефекти геномної нестабільності та взаємодіють з даними генетичного «паспорту» рослини. Однак цю інформацію можна отримати за допомогою молекулярно-генетичних методів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з різними маркерами ДНК.

ДНК виділяли з вегетативної маси рослин у фазі цвітіння за допомогою набору реагентів ZymoResearch (Quick-DNA Plant / Seed Miniprep Kit), згідно з протоколом виробника. Нативність виділеної ДНК перевіряли в 1,7% агарозному гелі з TBE-буфером у присутності броміду етидію та візуалізували на УФ-транслюмінаторі та фотографували. При проведенні електрофорезу в «кишеню» гелю вносили 5 мкл розчину ДНК. Як маркер молекулярної маси використовували GeneRuler 50 bp. Для ПЛР використовували два види праймерів: ISSR(Табл.1) та ОРА(Табл.2) (Metabion, Німеччина) та готову суміш реагентів для ампліфікації ДНК PCR MIX 2x-R (Neogene, Україна). Нуклеотидні послідовності праймерів показані в таблиці 1.

25 мкл реакційної суміші для ПЛР містили: 12,5 мкл PCR MIX 2x-R, 1,75 мкл праймеру, 5,75 мкл деіонізованої води та 5 мкл загальної геномної ДНК. Ампліфікація з праймерами ISSR включала такі етапи: початкова денатурація протягом 4 хв при 94 °С, 40 циклів; денатурація при 94 °С - 45 сек., відпал - 45 сек. (температура різна для кожного праймера, вказана виробником), елонгація при 72 °С - 45 сек.; кінцева елонгація тривала 7 хв при 72 °С. Ампліфікація з праймерами ОРА включала такі етапи: початкова денатурація протягом 5 хв при 94 °С, 40 циклів; денатурація при 94 °С - 40 сек., відпал - 40 сек. (температура різна для кожного праймера, вказана виробником), елонгація при 72 °С - 2 хв.; кінцева елонгація тривала 10 хвилин при 72 °С.

Таблиця 2.1. Назви і нуклеотидні послідовності ISSR -праймерів

Праймер	Послідовність	Праймер	Послідовність
ISSR 5	5'-CAC ACA CAC ACA CAC AAC-3'	ISSR 826	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CC-3'
ISSR 807	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GT-3'	ISSR 24	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GGC-3'
ISSR 810	5'-GAG AGA GAG AGA GAG-3'	ISSR 834	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GCT T-3'
ISSR 825	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CT-3'	ISSR 842	5'-GAG AGA GAG AGA GAG ACT G-3'

Таблиця 2.2. Назви і нуклеотидні послідовності RAPD —праймерів

Праймер	Послідовність	Праймер	Послідовність
OPA-01	5'-CAG GCC CTT C-3'	OPA-06	5'-GGT CCC TGA C-3'
OPA-02	5'-TGC CGA GCT G-3'	OPA-07	5'-GAA ACG GGT G-3'
OPA-03	5'-AGT CAG CCA C-3'	OPA-08	5'-GTG ACG TAG G-3'
OPA-04	5'-AAT CGG GCT G-3'	OPA-09	5'- GGG TAA CGC C-3'
OPA-05	5'-AGG GGT CTT G-3'	OPA-10	5'-GTG ATC GCA G-3'

Отримані продукти ПЛР розділяли в 1,7% агарозному гелі з TBE-буфером у присутності броміду етидію та візуалізували на УФ-трансілюмінаторі. Під час електрофорезу в кишеню гелю наносили однаковий об'єм продуктів (5 мкл). Як маркер молекулярної маси використовували GeneRuler 50 бр.

2.5 Статистичні оцінки. Проведення генетичної паспортизації генотипів ромашки лікарської та визначення ефектів геномної нестабільності.

При проведенні кількісних оцінок результатів дослідження було використано методи лінійного та кластерного статистичного аналізів.

При проведенні аналізу змін питомого вмісту низькомолекулярних антиоксидантів визначали середні арифметичні величини ($\bar{X}$) та їх середньоквадратичні відхилення (S_x). Достовірність відмінностей між варіантами досліду оцінювали за параметричним t-критерієм Стюдента, довірчий інтервал, $P = 0,95$.

Для характеристики змін наборів ампліконів при проведенні ISSR- RAPD-ПЛР контрольних і опромінених варіантів використано два показники. Показник «% атипових ампліконів» розраховували як відношення кількості відмінних від контрольних ампліконів до їх загальної кількості; для оцінки значущості різниці середніх показників для різних варіантів досліду використано непараметричний Х-критерій Ван-дер-Вардена.

Аналіз зв'язку чутливості певних ділянок ДНК до іонізуючого і УФ-С опромінення з нуклеотидною послідовністю ДНК було проведено за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона.

Відомо, що у реакціях організму на опромінення, таких як репарація або антиоксидантний захист задіяна активність великої кількості генів, і точно описати всі можливі взаємодії білків, що кодуються цими генами, практично не можливо. Таким чином, для оцінки відмінностей між опроміненими і неопроміненими варіантами, найбільш доцільним є проведення кластерного аналізу спектру подібності ампліконів, отриманих при проведенні ПЛР.

Кластерний аналіз - це спосіб статистичного аналізу даних, спрямований на виявлення структури в наборі даних і групування об'єктів подібного типу. Кластерний аналіз широко використовують у біології, зокрема визначення генетичного відстані між організмами. Існує кілька методів кластерного аналізу, таких як методи ієрархічної кластеризації та методи неієрархічної кластеризації.

Ієрархічна кластеризація включає покрокове об'єднання або поділ кластерів в залежності від їх схожості. Методи неієрархічної кластеризації, такі як k-середніх (k-means), розбивають дані на заздалегідь задану кількість кластерів, ґрунтуючись на схожості між об'єктами.

Для визначення генетичної відстані можна використовувати різні метрики подібності. Однією з таких метрик є індекс Жаккарда. Давайте розглянемо його докладніше.

Індекс Жаккарда вимірює подібність між двома множинами, використовуючи таку формулу:

$$J(A,B)=|A\cup B|/|A\cap B|$$

Де: A і B – множини об'єктів,

$|A\cup B|$ - кількість елементів, присутніх як в A, так і в B,

$|A\cap B|$ - кількість елементів, унікальних в об'єднанні A і B.

У контексті генетичної відстані множини A і B

В можуть представляти гени чи генетичні профілі двох організмів. Індекс Жаккарда набуває значення від 0 до 1, де 0 означає повну відсутність подібності, а 1 – повний збіг.

Для використання індексу Жаккарда в кластерному аналізі генетичних даних можна застосовувати його для оцінки подібності між генетичними профілями різних організмів. Наприклад, якщо у нас є набір генів для кожного організму, ми можемо використовувати індекс Жаккарда для вимірювання подібності між парами організмів і потім застосовувати методи кластерного аналізу для угруповання близьких генетичних профілів у кластери.

Порівняно з іншими методами визначення генетичної відстані, індекс подібності Жаккарда має наступні переваги:

1. Стійкість до розміру порівнюваних множин: індекс Жаккарда залежить від абсолютного розміру множин, що корисно у разі, якщо зразки різняться за розміром.

2. Підходить для бінарних даних: індекс Жаккарда добре працює з бінарними даними, де кожен елемент може бути присутнім або відсутнім (в нашому випадку – амплікони певної довжини).

3. Простота інтерпретації: легко інтерпретувати результати, оскільки індекс Жаккарда вимірює частку загальних елементів щодо загальної кількості елементів.

Розрахунки індексу подібності Жаккарда нами проведено з використанням програмного забезпечення UPGMA (доступно через Інтернет <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>).

РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА ЗВ'ЯЗКУ ЕФЕКТИВНОСТІ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ТА УФ-С ОПРОМІНЕННЯ З МІНІСАТЕЛІТНИМ ПОЛІМОРФІЗМОМ ДНК РІЗНИХ СОРТІВ РОМАШКИ ЛІКАРСЬКОЇ.

Однією з основних складових розробки біотехнології підвищення виходу з рослинної сировини лікувальних речовин, зокрема антиоксидантів, шляхом використання різних типів опромінення, є відбір генотипів з високою чутливістю на дію цих стресових факторів. Дослідження цього питання проведено на 6 сортах *Matricāria chamomilla* європейської селекції з колекції Центральної станції лікарських рослин НААН України (Лубни) та двох ендемічних екотипах насіння які було одержано на різних насінєвих станціях України.

Попередніми дослідженнями ряду генотипів *Matricāria chamomilla* було показано, що частина генотипів більш чутлива до дії рентгенівського, в той час як друга – більш чутлива до УФ-С опромінення[9,10] При цьому порівняння проводилось за двома показниками, що мають важливе технологічне значення – врожаєм фармацевтичної сировини (суцвіть) та підвищенням нагромадження вторинних метаболітів. Таким чином, фактично, розглядались два показники: реакція з боку первинного метаболізму (врожайність суцвіть) та вторинного метаболізму (рівень нагромадження антиоксидантів).

Як показали оцінки, всі використані генотипи значно різняться вихідною врожайністю. Найвищий рівень врожаю суцвіть контрольного варіанту мають рослини сорту Перлина лісостепу, найнижчий – несортіві рослини, екотип запропонований фірмою Golden Garden. Отримані результати свідчать про різну ефективність впливу рентгенівського та УФ-С опромінення на цей показник для різних генотипів.

Підвищення виходу фармацевтичної сировини (суцвіть) при рентгенівському опроміненні спостерігається у генотипів Кведлінбург, Горал, Азулена. При УФ-С опроміненні цей ефект спостерігається у генеративного

мутанту сорту Перлина лісостепу, сортів Златий лан, Перлина лісостепу, та генотипу Golden Garden.

Досліджені генотипи різняться також за вихідними показниками рівнів фенолів та флавоноїдів у фармацевтичній сировині та стимуляції при різних типах опромінення.

Так, найвищий вихідних рівень вмісту флавоноїдів спостерігається у сортів Горал та Азулена; у різних варіантів дослідів він досягав 300-350 мг\г сух.маси. Друге місце посідають сорти Кведлінбург та Перлина лісостепу: вміст флавоноїдів досягає 200 -250 мг\г сух.маси. При рентгенівському опроміненні найвища стимуляція нагромадження цього антиоксиданту спостерігається у генотипу Перлина лісостепу. При УФ-С опроміненні – у сорту Кведлінбург та мутант сорту Перлина Лісостепу.

Метою даного етапу дослідження є встановлення зв'язку чутливості генотипів до різних типів опромінення з мінісателітним поліморфізмом первинної структури їх ДНК. Цей показник певним чином відображає особливості організації їх геному, утворення тривимірної структури та впливає на доступність факторам ураження, експресії та репарації, тобто має безпосереднє відношення як до первинного, так і вторинного метаболізмів.

У теперішній час при порівнянні генотипів різних особин, сортів, ліній широко використовуються молекулярно-генетичні маркери, зокрема, ДНК-маркери, що дозволяють виявляти поліморфізм ДНК на рівні її нуклеотидної послідовності для певного гена або для будь-якої іншої ділянки хромосоми. За останні роки накопичилося багато даних про ефективність використання молекулярно-генетичних маркерів на вирішення багатьох завдань генетики, селекції, збереження біорізноманіття, вивчення механізмів еволюції, картування хромосом, насінництва [157].

Молекулярно-генетичні маркери, що найбільш використовуються, умовно можна поділити на такі типи - маркери ділянок структурних генів, що кодують амінокислотні послідовності білків (електрофоретичні варіанти

білків), маркери некодуючих ділянок структурних генів і маркери різних послідовностей ДНК, відношення яких до структурних генів, як правило, невідомо. До них відноситься розподіл коротких повторів по геному (RAPD - випадково ампліфікована поліморфна ДНК) та ISSR - інвертовані повтори. Існує цілий набір сучасних технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК серед яких доступним і адекватним для вирішення питання різної експресивності генів вторинного метаболізму є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) та ISSR (від англ. Inter Simple Sequence Repeats) праймерів[158]. Відомо, що метод ISSR – маркерів є більш спеціалізованим варіантом методу RAPD, у якому праймер складається з мінісателітної послідовності. У цьому методі, як і в RAPD, використовується один або кілька праймерів довжиною 15-24 нуклеотидів. Але в даному випадку праймери складаються з коротких тандемних 2-4 нуклеотидних повторів. Маркери, що були використані наведено у таблиці 2.1, 2.2.

Важливим у обґрунтуванні того, що у своєму дослідженні ми зупинились на виявленні мінісателітного поліморфізму первинної структури ДНК є дані про функціональну роль цих послідовностей у визначенні конформації ДНК і, таким чином, непрямой ролі у визначенні експресивності генів первинного та вторинного метаболізму, репарації та відновлювальних процесів.

Проаналізуємо одержані дендрограми з точки зору зв'язку положення генотипу на дендрограмі з впливом певного типу опромінення на врожайність фармацевтичної сировини.

Дендрограма, побудована на основі ISSR- ПЛР аналізу має 2 кластери (Рис.3.1). До кластеру 1 входять генотипи Златий Лан та Азулена. Сорт Азулена реагує підвищенням врожайності фармацевтичної сировини на УФ-С опромінення; сорт Златий Лан реагує зростанням цього ж показника на рентгенівське опромінення. Кластер 2 складається з двох підкластерів; до під кластеру 2.1 відносяться сорт Перлина Лікостепу, ендемічні екотипи Golden

Garden та Seed Era. До під кластеру 2.2 відносяться сорти Горал, Кведлінбург та мутант сорту Перлина лісостепу.

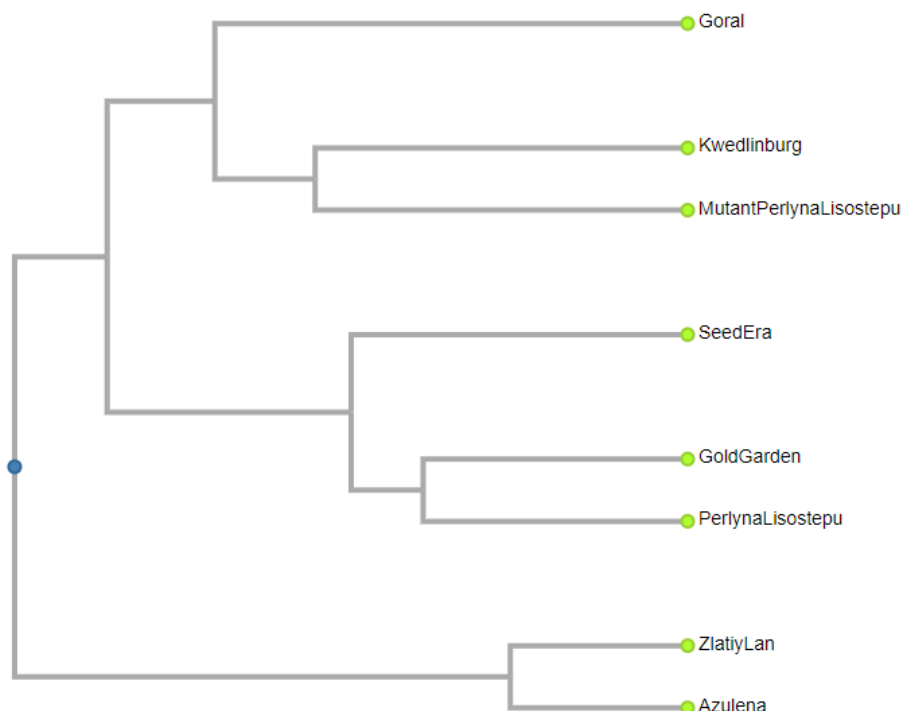


Рис.3. 1: Дендрограма, побудована за поліморфізмом ISSR-послідовностей.

Табл. 3.1. Реакція різних генотипів на іонізуюче та УФ-С опромінення

Генотип	Тип опромінення	Вплив на врожайність	Вплив на вміст антиоксидантів
Перлина Лісостепу	УФ-С	+	-
	Рентгенівське	-	+
Мутант Перлини Лісостепу	УФ-С	+	+
	Рентгенівське	-	-
Горал	УФ-С	-	-
	Рентгенівське	+	+
Златий Лан	УФ-С	+	+
	Рентгенівське	--	-
Кведлінбург	УФ-С	-	+
	Рентгенівське	+	-
Seed Era	УФ-С	--	-
	Рентгенівське	--	-
Golden Garden	УФ-С	+	-
	Рентгенівське	-	-
Азулена	УФ-С	-	-
	Рентгенівське	+	+

Перейдемо до аналізу зв'язку чутливості генотипів ромашки лікарської по показнику підвищення нагромадження антиоксидантів. Зосередимось на стимуляції нагромадження флавоноїдів; саме для цих сполук за одержаними попередньо даними спостерігається висока значуща ($R=0.84$, $p \geq 0.95$) кореляція між вихідним (контрольним) рівнями для певного генотипу і тими, що спостерігаються при стимуляції[10]. При цьому не спостерігається значної стимуляції синтезу фенолів при обох типах опромінення у всіх генотипів, що були досліджені.

Проаналізуємо зв'язок положення певного генотипу на дендрограмі із стимуляцією обсягу його врожайності під впливом різних видів опромінення.

Перший кластер включає сорти Азулена та Златий лан. У сорту Азулена спостерігається підвищення врожайності при рентгенівському опроміненні; у сорту Златий лан – при УФ- С опроміненні.

До під кластеру 2.1 другого кластеру відносяться Перлина Лісостепу, ендефічні екотиби Golden Garden та Seed Era. У сорту Перлина лісостепу та генотипу генотипів Golden Garden спостерігається стимуляція утворення суцвіть при УФ - С опроміненні; у генотипу Seed Era обидва типи опромінення пригнічують утворення суцвіть.

До під кластеру 2.2 другого кластеру відносяться мутант сорту Перлина лісостепу, сорти Кведлінбург та Горал. У мутанту сорту Перлина лісостепу стимуляція утворення суцвіть спостерігається при УФ-С опроміненні; у сортів Горал та Кведлінбург – при рентгенівському опроміненні.

Таким чином, розподіл генотипів на дендрограмі, що базується на урахуванні поліморфізму ДНК по ISSR – маркерам за показником стимуляції врожайності фармацевтичної сировини має досить суперечливий характер і не демонструє чіткого зв'язку між показниками, що досліджуються.

Перейдемо до аналізу можливих зв'язків між продуктивністю фармацевтичної сировини та поліморфізмом ДНК генотипів за RAPD маркерами (Рис.3.2).

Табл. 3.2 Матриці дистанції по Жаккарду, ISSR-ПЛР

	Мутант Перлини лісостепу	Кведлінбург	Горал	Азулена	Златий Лан	Перлина Лісостепу	Golden Garden	SeedEra
Мутант Перлини лісостепу	0	0.29	0.37	0.51	0.43	0.48	0.48	0.43
Кведлінбург		0	0.36	0.39	0.43	0.36	0.34	0.43
Горал			0	0.49	0.56	0.56	0.53	0.55
Азулена				0	0.45	0.50	0.58	0.63
Златий Лан					0	0.46	0.56	0.57
Перлина лісостепу						0	0.24	0.29
Golden Garden							0	0.27
SeedEra								0

Дендрограма, побудована на основі RAPD - ПЛР аналізу має також 2 кластери. До першого кластеру відносяться сорт Перлина лісостепу, екотипи Golden Garden та Seed Era. У двох генотипів – сорту Перлина лісостепу та екотипу Golden Garden спостерігається стимуляція утворення фармацевтичної продукції при УФ-С опроміненні; у екотипу Seed Era обидва типи опромінення пригнічують утворення судків.

Підкластер 2.1 другого кластеру складається з трьох сортів: Кведлінбург, Азулена та Горал. У всіх трьох генотипів спостерігається стимуляція утворення фармацевтичної сировини при рентгенівському опроміненні. Далі, підкластер 2.2 другого кластеру складається з двох генотипів – мутанту сорту Перлина лісостепу та сорту Злати лан. Обидва генотипи відповідають стимуляцією продуктивності фармацевтичної сировини на УФ-С опромінення.

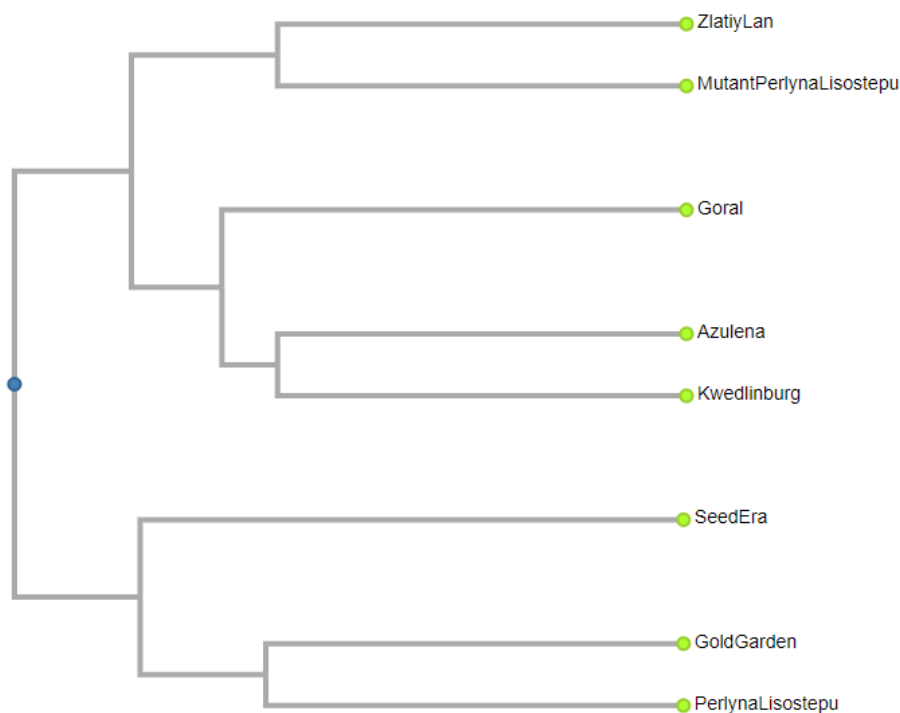


Рис.3. 2. Дендрограма, побудована за поліморфізмом RAPD-послідовностей.

Таким чином, розгляд питання про зв'язок стимуляції продуктивності фармацевтичної сировини різними типами опромінення з мінісателітним поліморфізмом ДНК в межах групи сортів приводить до висновку, що при цьому вагомому роль відіграє поліморфізм по RAPD –послідовностям и менш вагомому – по ISSR –послідовностям.

Перейдемо до аналізу зв'язку чутливості генотипів ромашки лікарської по показнику підвищення нагромадження антиоксидантів. Зосередимось на стимуляції нагромадження флавоноїдів; саме для цих сполук за одержаними попередньо даними спостерігається висока значуща ($R=0.84$, $p \geq 0.95$) кореляція між вихідним (контрольним) рівнями для певного генотипу і тими, що спостерігаються при стимуляції[10]. При цьому не спостерігається значної стимуляції синтезу фенолів при обох типах опромінення у всіх генотипів, що були досліджені (Табл. 3.1).

Табл. 3.3 Матриці дистанції по Жаккарду, RAPD-ПЛР

	Мутант Перлини лісостепу	Кведлінбург	Горал	Азулена	Златий лан	Перлина лісостепу	Golden Garden	Seed Era
Мутант Перлини лісостепу	0	0.30	0.36	0.40	0.28	0.39	0.48	0.49
Кведлінбург		0	0.34	0.28	0.48	0.48	0.56	0.57
Горал			0	0.29	0.39	0.47	0.46	0.53
Азулена				0	0.33	0.40	0.49	0.50
Златий лан					0	0.36	0.45	0.42
Перлина лісостепу						0	0.26	0.35
Golden Garden							0	0.37
SeedEra								0

Таким чином, при рентгенівському опроміненні найвища стимуляція нагромадження цього антиоксиданту спостерігається у генотипу Перлина лісостепу. Разом з тим, як відзначено вище, за показниками стимуляції утворення суцвіть, цей генотип проявляє більш потужну реакції при УФ-С опроміненні.

При УФ-С опроміненні найвищий рівень стимуляції нагромадження флавоноїдів спостерігається у сорту Кведлінбург та мутанту сорту Перлина лісостепу. Сорт Кведлінбург по врожайності фармацевтичної сировини відноситься до рентген - чутливих генотипів. Мутант сорту Перлина лісостепу та сорт Златий лан реагують стимуляцією врожайності фармацевтичної сировини та нагромадженням флавоноїдів на УФ-С опромінення. Сорти Горал та Азулена реагують на рентгенівське опромінення як підвищенням врожаю фармацевтичної продукції, так і підвищенням нагромадження флавоноїдів у суцвіттах. Обидва досліджені екотипи та сорт Златий лан не проявили значимої стимуляції ні при УФ-С, ні при рентгенівському опроміненні.

Проаналізуємо дані відносно значень генетичної відстані між генотипами, що вивчались (Табл 3.2, Табл 3.3), не тільки з точки зору ефективності впливу різних видів опромінення, але й відносно їх походження.

Розрахунок відстані за ISSR-праймерами (Табл 3.2) свідчить про існування найбільшої генетичної відстані між європейським сортовим і українським не сортовим матеріалом. Разом з тим, спостерігається виключення з цього правила: Перлина Лісостепу будучи сортовим матеріалом українського походження, і маючи значні фізіологічні (врожайність, вміст антиоксидантів) і морфологічні відмінності має найнижчі показники відстані з несортовим матеріалом. Навідміну від свого материнського генотипу мутант Перлини Лісостепу має досить високі показники генетичної відстані від несортного матеріалу, і наближається по цьому показнику до сортів європейської селекції.

Перейдемо до аналізу таблиці 3.3, що відображає генетичну відстань за RAPD-поліморфізмом. При цьому спостерігається аналогічна закономірність: існування суттєвої генетичної відстані між несортовим матеріалом і сортовим матеріалом європейського походження, за єдиним виключенням: Перлина Лісостепу має невелику відстань з Golden Garden і Seed Era. На відміну від свого материнського сорту, мутант Перлини Лісостепу має генетичну відстань, що наближає його до європейських сортів.

Пояснення цих неочікуваних результатів може бути пов'язано з використанням різних підходів у створенні нового сортового матеріалу, що використовувались при селекційній роботі в Україні і інших країнах Європи.

ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА.

Проведений аналіз зв'язку ефективності різних типів опромінення по двом показникам підвищення продуктивності різних генотипів з мінісателітним поліморфізмом їхньої ДНК показав неоднозначні результати[159-162]. Виявлено дуже слабкий зв'язок між розмаїттям двох видів реакції восьми генотипів ромашки лікарської з їх ДНК поліморфізмом по ISSR – маркерам.

Між тим виявлено чіткий зв'язок поліморфізму ДНК по RAPD-послідовностях з продуктивністю фармацевтичної сировини.

Досліджені вісім генотипів розділяються на три підкластери, два з яких реагують значимо на УФ-С опромінення, а один – на рентгенівське опромінення.

Проведене дослідження виявило відсутність взаємозв'язку між стимуляцією напрацювання фармацевтичної сировини та нагромадженням антиоксидантів. Так, тільки при рентгенівському опроміненні сортів Азулена та Горал одночасно відбувається стимуляція і врожайності суцвіть, і вмісту антиоксидантів. У сорту Перлина лісостепу спостерігається стимуляція фармацевтичної сировини УФ-С опроміненням, в той час як підвищення вмісту флавоноїдів відбувається при рентгенівському опроміненні. У сорту Кведлінбург стимуляція врожайності фармацевтичної сировини відбувається при рентгенівському опроміненні, а стимуляція напрацювання антиоксидантів спостерігається при УФ-С опроміненні.

В дослідженні, результати якого викладено у даному розділі, проведено перший цикл аналізу зв'язку певних характеристик вихідної (контроль) організації ДНК з подальшим збереженням ураження, що спостерігається через 3, 5 місяців у зрілої рослини з виходом цільового продукту. Наступний крок дослідження пов'язано з виявленням механізмів зв'язку разового первинного ураження ДНК при передпосівному опроміненні насіння з віддаленим його збереженням та стимуляцією синтезу антиоксидантів на останніх стадіях онтогенезу. Для проведення цього дослідження ми сфокусувались на виявленні зв'язку між ознаками геномної нестабільності та накопиченням антиоксидантів у двох генотипах ромашки лікарської – сорту Перлина лісостепу та її мутанту. У відповідності до одержаних у даному розділі даних ці два генотипи відносяться до різних підкласів та по різному реагують на рентгенівське та УФ-С опромінення.

РОЗДІЛ 4. ВЗАЄМОДІЯ ВІДДАЛЕНИХ ЕФЕКТІВ УРАЖЕННЯ ГЕНОМУ ПРИ ПЕРЕДПОСІВНОМУ РЕНТГЕНІВСЬКОМУ ОПРОМІНЕННІ ІЗ СТИМУЛЯЦІЄЮ НАПРАЦЮВАННЯ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ АНТИОКСИДАНТІВ

Результати, що викладені у попередньому розділі, свідчать про значну роль певних послідовностей первинної структури ДНК у формуванні віддаленого у часі і неопромінених безпосередньо біологічних структурах метаболічних перебудов. Ці результати відповідають сучасним уявленням про роль конформації хроматину у транскрипційних і репаративних процесах.

Існування поліморфізму за ISSR та RAPD послідовностями обумовлює і певні відмінності у компактизації хроматину, що впливає на доступність ДНК транскрипційним та репараційним факторам, утворенню так званих радіаційно – індукованих фокусів (radiation induced foci)[163], що забезпечують ефективність відновлення ДНК[164,165].

Наступний крок дослідження пов'язано з перевіркою гіпотези, що зв'язок між первинними, безпосередніми ефектами опромінення та довготривалими перебудовами метаболізму пов'язані з феноменом геномної нестабільності.

В огляді літератури (Розділ 1) відзначено, що вивчення ефектів малих доз на різних біологічних системах, виявило появу множинних генетичних ушкоджень за умов прямої чи непрямої дії опромінення, явища, яке увійшло у наукову термінологію під назвою радіаційно – індукованої нестабільності ДНК[19,22]. За сучасними уявленнями, радіаційно – індукована нестабільність геному (RING, RIGI) – це виникнення *de novo* множинних генетичних ушкоджень у значній кількості (до 30%) нащадків опромінених клітин, що супроводжується підвищенням рівня активних форм кисню (АФК), активації мобільних елементів, інших епігенетичних перебудов[44, 45, 6].

Незважаючи на нагромадження значного експериментального матеріалу

по цьому питанню, залишаються маловідомими можливість і тривалість збереження геномної нестабільності у цілісному організмі після гострого опромінення, і його зв'язок з формуванням захисних реакцій, зокрема антиоксидантного захисту, у неопроміненіх безпосередньо структурах рослини.

Метою дослідження було виявлення ознак геномної нестабільності на стадії цвітіння рослини за умов передпосівного рентгенівського опромінення сухого насіння, та зв'язку цього явища із стимуляцією нагромадження низькомолекулярних антиоксидантів у фармацевтичній сировині рослини (суцвіттях) двох генотипів ромашки лікарської - Перлині лісостепу, української селекції та її мутанту.

Рослини вирощували в умовах відкритого ґрунту, з урахуванням екологічних характеристик ромашки лікарської; тип ґрунту дерново-підзолистий, без додавання мінеральних добрив.

На Рис. 4.1 наведені дані збору врожаю фармацевтичної сировини.

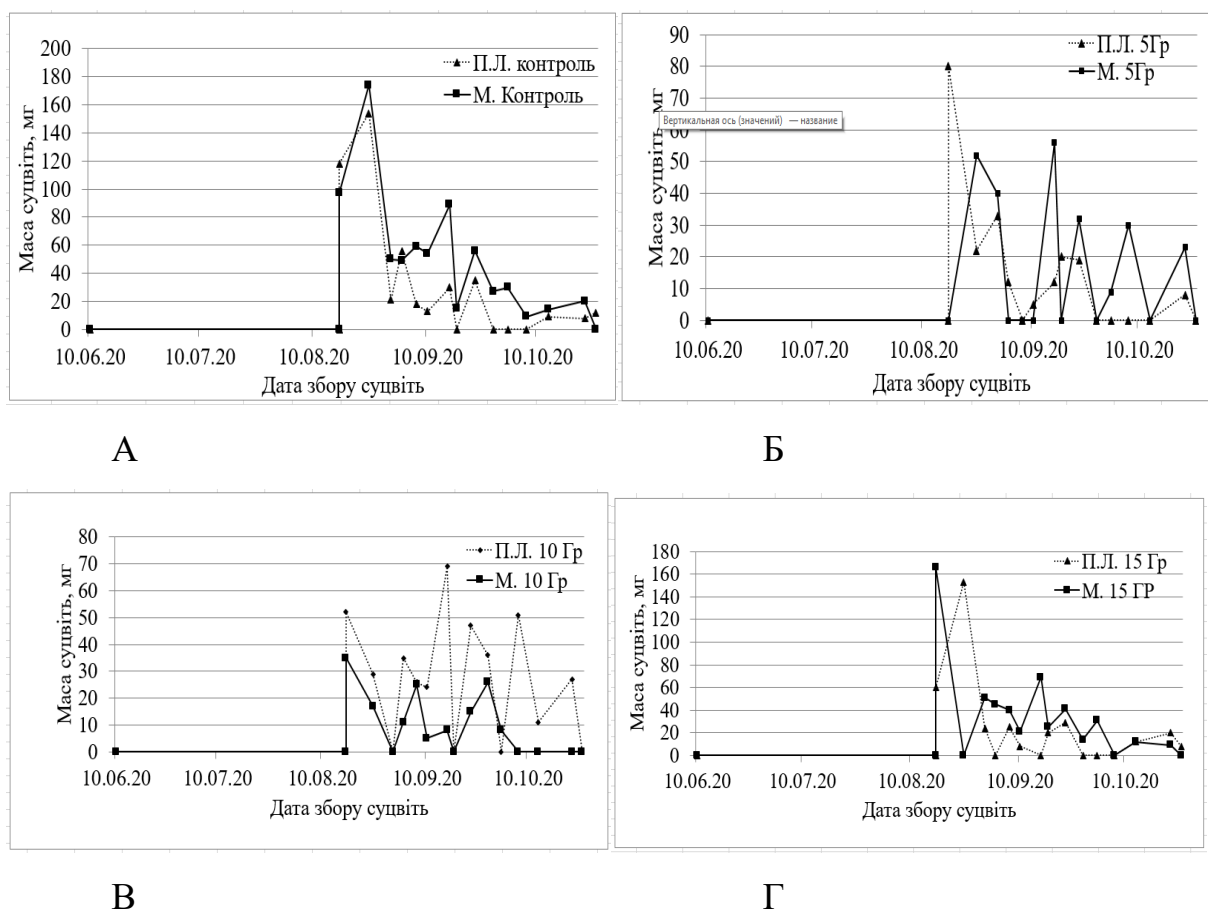


Рис 4.1. Динаміка врожайності фармацевтичної сировини (суцвіть), 2020 рік. А- контроль; Б- 5 Гр ; В- 10 Гр ;Г -15 Гр .

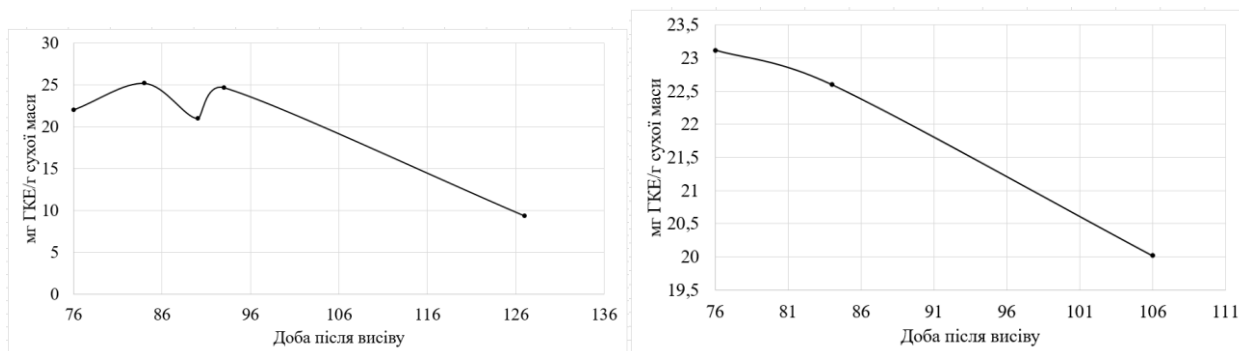
Одержані дані свідчать про складну динаміку врожайності суцвіть як в контрольному варіанті, так і при опроміненні у різних дозах.

У контрольному варіанті мутант показав в цілому вищу врожайність, ніж його материнський генотип – Перлина Лісостепу. Перлина Лісостепу показала вищу врожайність при дозі опромінення 10Гр.

В той час як мутант продемонстрував вищу врожайність при дозі передпосівного опромінення 15Гр, а також вищу врожайність при дозі 5Гр. У всіх варіантах опромінення, окрім варіанту з дозою опромінення в 10Гр, Перлина Лісостепу показала найвищу врожайність на початку цвітіння, в той час як для її мутанта подібна картина спостерігалася лише у варіанті з дозою іонізуючого опромінення 10Гр, а також в контролі. В інших варіантах опромінення, для мутанта спостерігався більш рівномірний розподіл врожайності по даті збору.

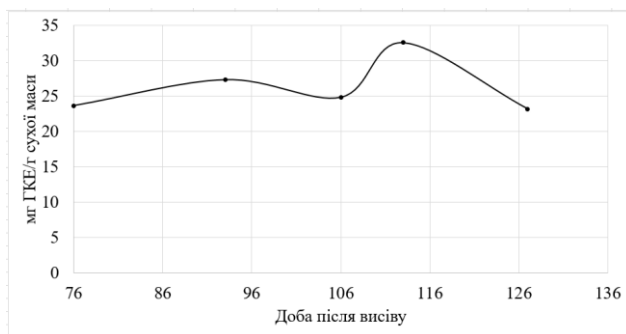
З нашої точки зору, ці дані (контроль) відображають взаємодії активності первинного і вторинного метаболізму протягом онтогенезу рослини і зміни цього співвідношення при передпосівному опроміненні.

Наступним кроком у проведенні даного етапу дослідження була оцінка динаміки накопичення фенолів і флавоноїдів у масі зібраних суцвіть.

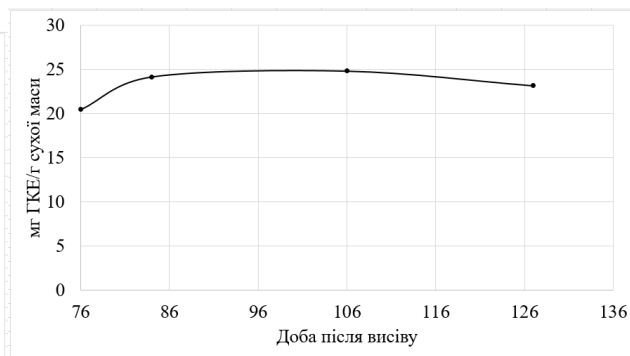


А

Б

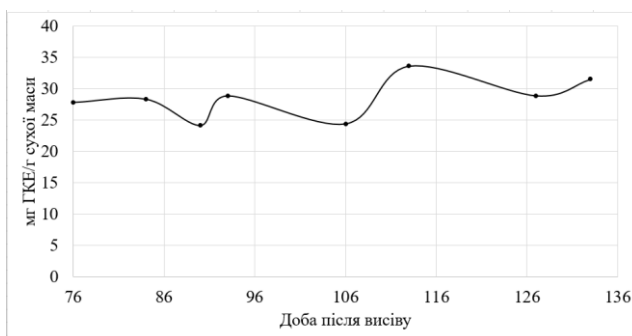


В

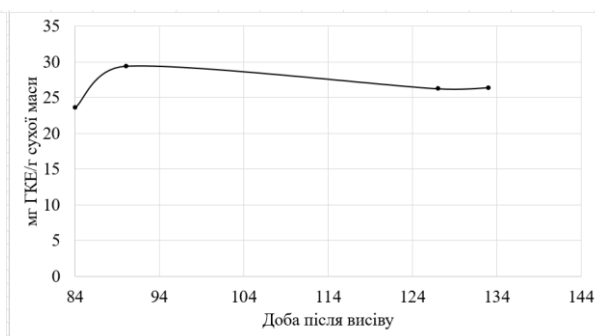


Г

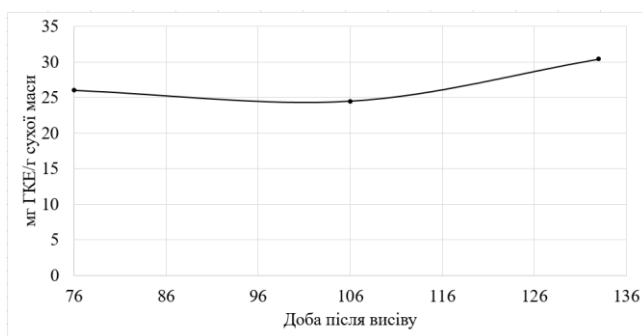
Рис. 4.2. Рис. 5.8. Вміст фенолів (мг ГКЕ/г сухої маси суцвіть) у контрольного (А), опроміненого в дозі 5 Гр(Б), 10 Гр (В), 15 Гр (Г) зразках Перлини лісостепу



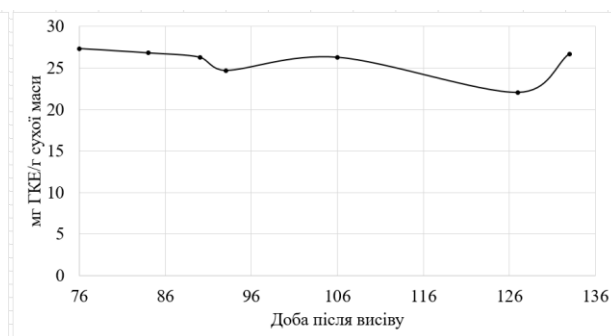
А



Б

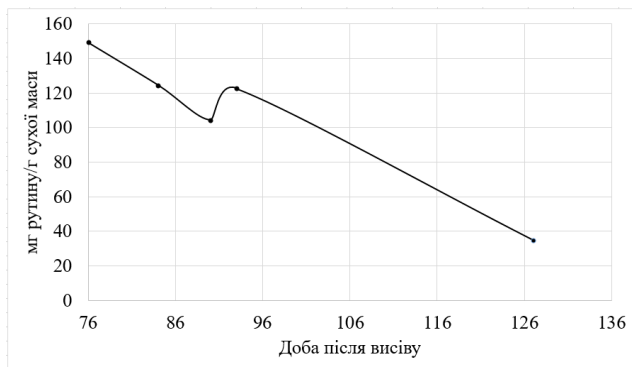


В

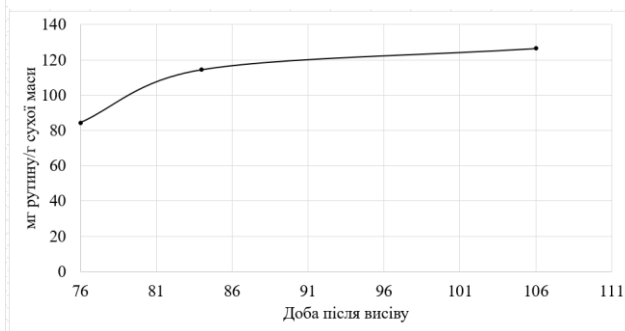


Г

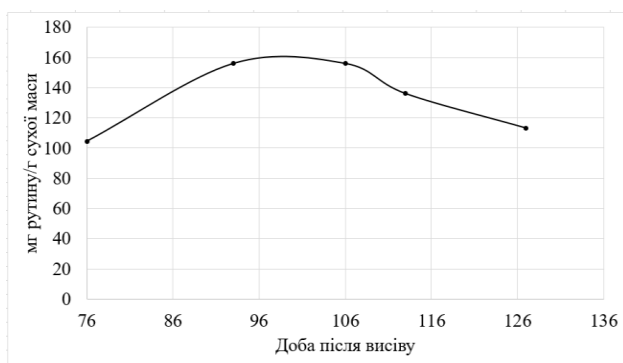
Рис. 4.3. Динаміка вмісту фенолів (мг ГКЕ/г сухої маси суцвіть) у контрольного (А), опроміненого при дозі 5 Гр(Б), 10 Гр (В), 15 Гр (Г) зразках мутанту Перлини лісостепу



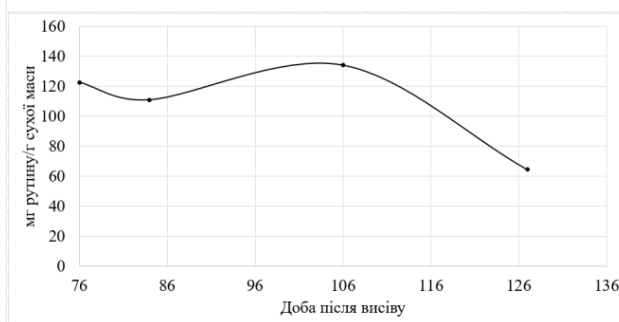
А



Б

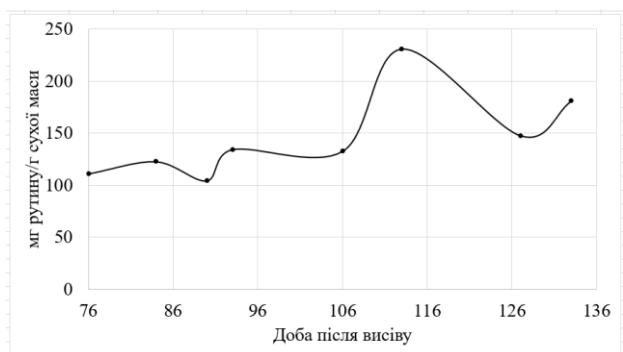


В

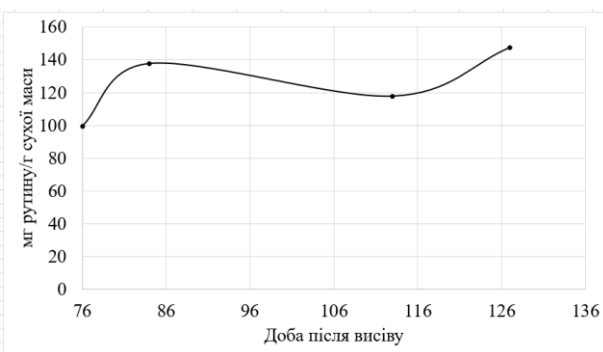


Г

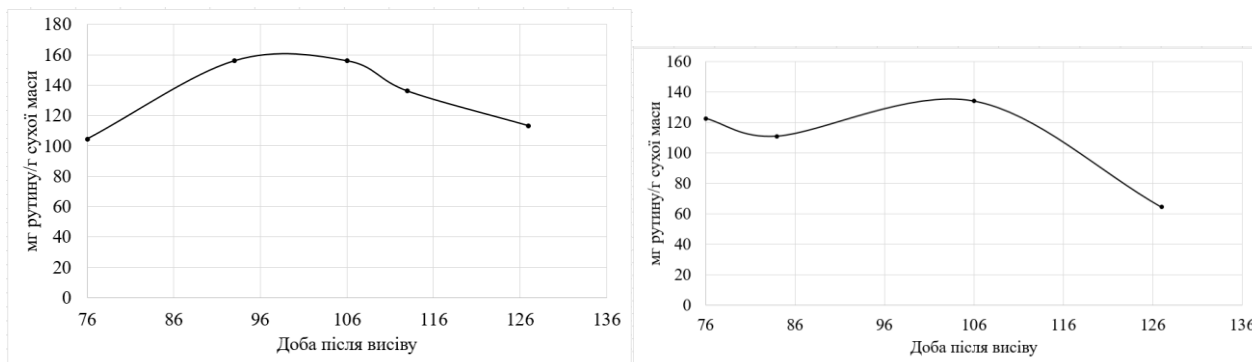
Рис. 4.4. Динаміка вмісту флаванолігнів (мг рутину/г сухої маси) у контрольного (А), опроміненого в дозі 5 Гр(Б), 10 Гр (В), 15 Гр (Г) зразках Перлини лісостепу



А



Б



В

Г

Рис. 4.5. Динаміка вмісту флаваноїдів (мг рутину/г сухої маси) у контрольного (А), опроміненого в дозі 5 Гр(Б), 10 Гр (В), 15 Гр (Г) зразках мутанту Перлини лісостепу. Врожай 2020 р.

Оцінки динаміки вмісту флаваноїдів і фенолів у фармацевтичній сировині свідчить про нелінійний і немонотонний її характер. Важливо, що спостерігається зсув у часі максимумів питомого вмісту антиоксидантів відносно контролю при всіх дозах опромінення і для обох генотипів. Як і у випадку з формуванням біомаси суцвіть, це відображає складний характер взаємодії між процесами первинного і вторинного метаболізму у змінних погодних умовах.

Така складна динамічна картина ускладнює статистичну обробку результатів. Статистичні оцінки були проведені за непараметричним Х-критерієм Ван-дер-Вардена і вказують на достовірну при 95% довірчому інтервалі різницю між максимальними значеннями у контрольних і опромінених варіантів обох генотипів. Зазначимо, що складна динаміка формування фармацевтичної сировини та питомого вмісту антиоксидантів в ній повторювалась щороку і відмічена у всіх восьми генотипах, що вивчено у Відділі попередньо [9, 10].

Це дозволяє розглядати обрані для молекулярно-генетичних досліджень двох генотипів - сорту Перлина лісостепу та її мутанту цілком репрезентативною моделлю також за фізіологічними показниками.

Переходимо до розгляду характеристик стабільності ДНК при різних дозах передпосівного рентгенівського опромінення.

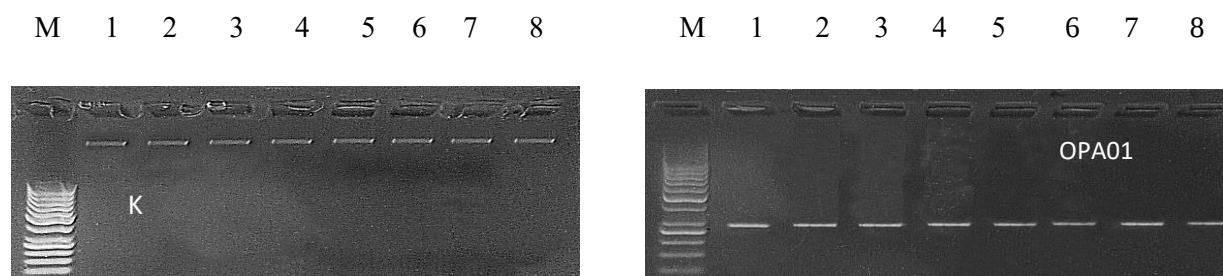
В розділі 2, було відзначено, що на сьогодні існує декілька підходів до виявлення нестабільності геному за умов різних видів і доз опромінення. Найбільш поширеним є метод оцінки стабільних і нестабільних хромосомних аберацій, які розглядаються як одні з основних маркерів радіаційного ураження людини, тварин і рослин[166]. На сьогодні набули широкого розповсюдження молекулярно-генетичні підходи[167], одним з яких і дуже перспективним з огляду оцінки вразливості певних послідовностей ДНК є проведення ПЛР з різними родинками праймерів. Цей підхід було застосовано при дослідженні міри ураженості різних послідовностей ДНК за умов різних доз передпосівного рентгенівського опромінення з використанням 8 ISSR та 10 RAPD - праймерів. Фокусування на дослідженні RAPD та ISSR мікросателітних послідовностей базувалось на попередніх даних, що виявили появу атипичних ампліконів саме у цих послідовностях, що непрямым чином вказує на елімінацію клітин з більш вагомими порушеннями ДНК в ділянках структурних генів під час проходження точок перевірки у мітозі [2].

Аналіз одержаних електрофореграм (Рис. 4.2, 4.3) свідчить про наявність значних відмінностей у кількості та довжині ампліконів при RAPD – ПЛР і ISSR - ПЛР аналізі у контрольних варіантах двох досліджених генотипів ромашки лікарської та появі різноманітних ампліконів при опроміненні. В результаті опромінення спостерігається поява відмінних від контролю, атипичних ампліконів як більшої, так і меншої довжини. Інтерпретація цих результатів має враховувати результати досліджень геному, що базуються як на використанні біохімічних, молекулярно-генетичних, так і цитогенетичних методів, що надали багату інформацію про можливості спонтанних та індукованих змін генетичного апарату. Головною причиною утворення хромосомних аберацій є виникнення подвійного розриву ДНК та його помилкової репарації. При цьому можлива втрата частини хромосоми (інтеркалярні і термінальні ділеції), зміна порядку в послідовностях ДНК

хромосоми на зворотній (інверсія), повторення частини хромосоми (дуплікація), переніс частини однієї хромосоми на іншу (транслокація). Цей далеко не повний перелік досліджених типів хромосомних аберацій вказує на можливість різноманітних змін довжини та первинної структури молекули ДНК, що входить до складу аберрантних хромосом. Також відомо про існування стану гіперзмінюваності, утворення нових мікросателітів, що різняться за довжиною, а не за нуклеотидною послідовністю як помилок реплікації і репарації саме в цих послідовностях ДНК [11]. Ці зміни і проявляються при ПЛР появою відмінних від контрольних, як збільшених, так і зменшених за довжиною ампліконів. Одержані результати пояснюються і біохімічними дослідженнями розмаїття форм ураження ДНК при опроміненні і різноманітності [168,169] ендогенних хімічних перетворень, пов'язаних з дією активних форм кисню, що обумовлюють руйнацію різних послідовностей ДНК.

Для аналізу одержаних результатів та їх співставлення із змінами напрацювання антиоксидантів у лікарській сировині при опроміненні проведемо їх кількісний аналіз з врахуванням поліморфізму ДНК за ISSR - RAPD-послідовностями обох генотипів у контролі та змін цих показників при опроміненні.

Першим етапом є оцінка змін під впливом опромінення кількості ампліконів при ISSR – RAPD – ПЛР для різних варіантів досліду з використанням показника частоти атипових ампліконів.



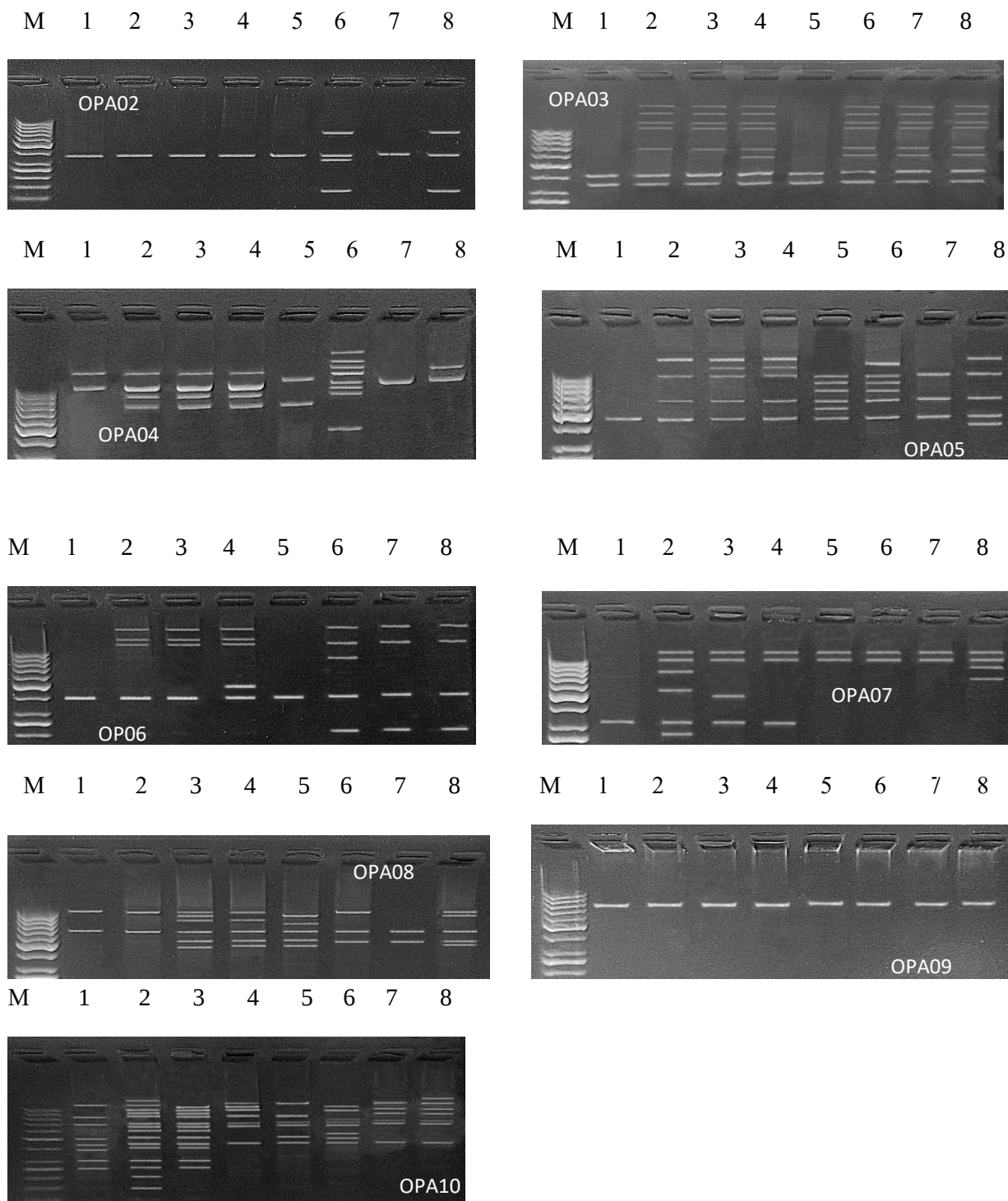


Рис.4.6 Електрофореграма розділення продуктів RAPD –ПЛР.
Позначення: К- контроль нативності ДНК; М – маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bp; 1 – Перлина лісостепу, контроль; 2 – Перлина лісостепу 5 Гр; 3 – Перлина лісостепу, 10 Гр; 4 – Перлина лісостепу, 15 Гр; 5 – мутант, контроль; 6 – мутант, 5 Гр; 7 – мутант, 10 Гр; 8 – мутант, 15Гр.

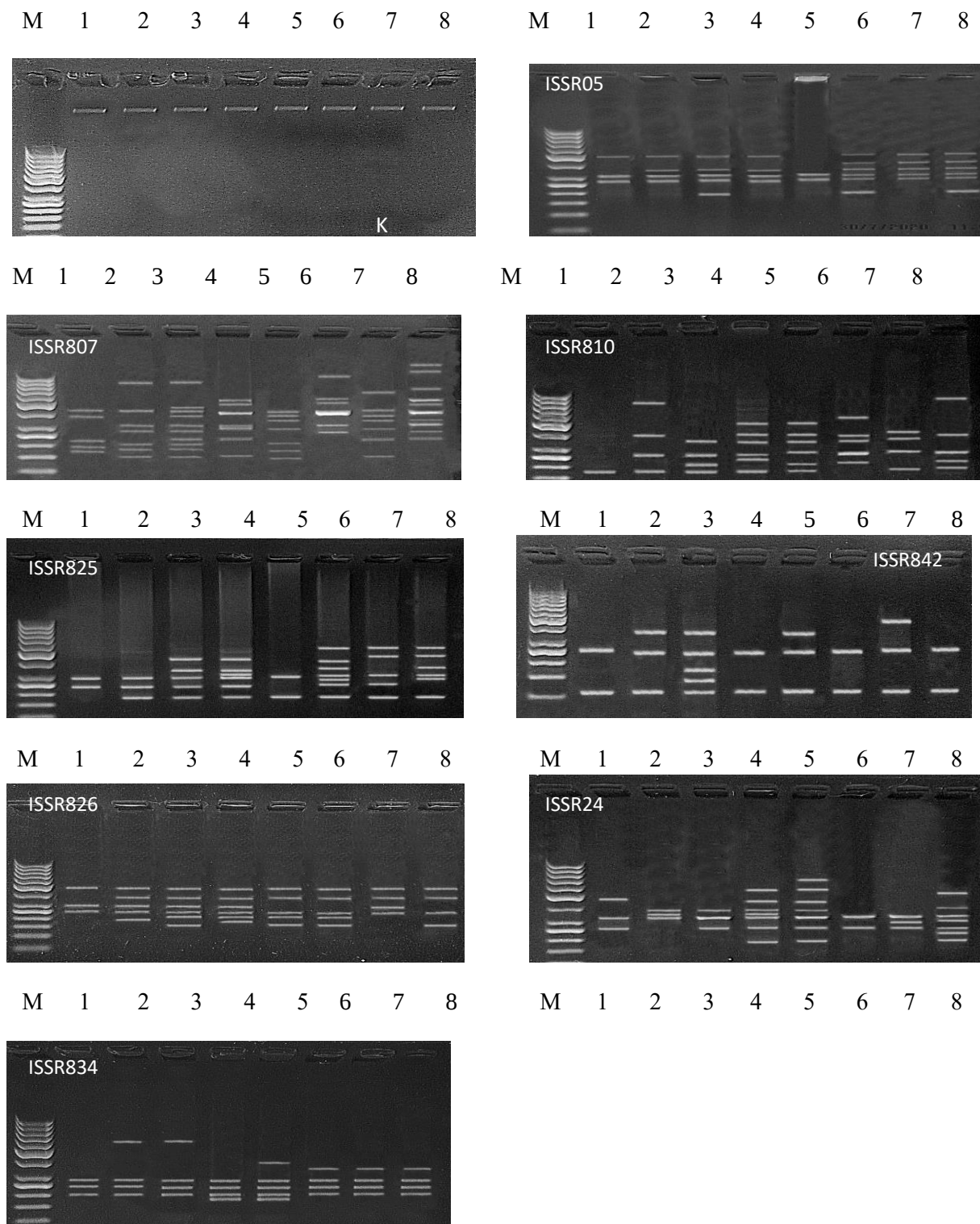


Рис 4.7. Електрофореграма розділення продуктів ISSR –ПЛР.
Позначення: К- контроль нативності ДНК.М – маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bp; 1 – Перлина лісостепу, контроль; 2 – Перлина лісостепу 6, 5 Гр; 3 – Перлина лісостепу, 10 Гр; 4 – Перлина лісостепу, 15 Гр; 5 – мутант, контроль; 6 – мутант, 5 Гр; 7 – мутант, 10 Гр; 8 – мутант, 15 Гр.

На Рис 4.8 (А,Б). наведено тренд усередненої частоти появи атипових ампліконів в залежності від дози передпосівного рентгенівського опромінення при проведенні ISSR- RAPD - ПЛР аналізу .

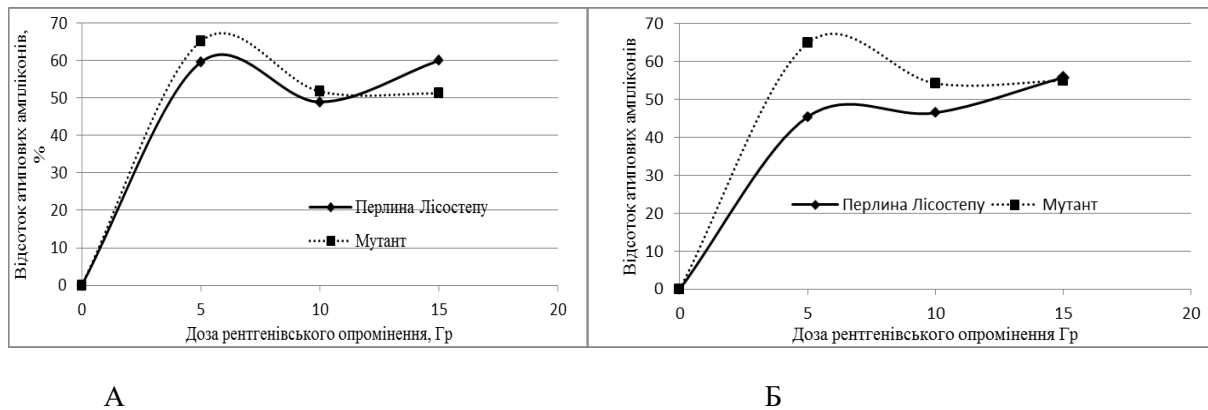


Рис.4.8 Тренд змін середньої частоти атипових ампліконів в залежності від дози при проведенні RAPD (А) та ISSR(Б) ПЛР аналізу .

Спостерігається помітна різниця середньої частоти появи атипових ампліконів залежно від дози передпосівного опромінення насіння при ISSR-ПЛР і RAPD - ПЛР аналізі. Разом з тим, оцінки за непараметричним Х-критерієм Ван-дер-Вардена лише вказують на близьку до достовірної при 95% довірчому інтервалі різницю тільки між відсотком атипових ампліконів ISSR – ПЛР генетичного матеріалу Перлини Лісостепу та її мутанту при дозі опромінення 5 Гр та між варіантами опромінення при дозах опромінення 10-15 Грей у мутанта.

Дійсно, цей показник залишає поза зоною уваги зміни довжин ампліконів, тобто зміни самої структури їх спектрів як багатовимірного об'єкту. Це дозволяє розглядати показник «% атипових ампліконів» недостатньо інформативним для характеристики впливу опромінення на стабільність ДНК, принаймні для обраного набору праймерів та діапазону доз.

Розглянемо наведені на Рис. 4.6, 4.7 дані з точки зору одержаних під впливом опромінення розмаїття змін у спектрах ампліконів із залученням

елементів кластерного аналізу, зокрема, індексу подібності Жаккарда. Розглянемо дві групи необхідних для аналізу показників: спорідненість між спектрами ампліконів різних генотипів при однакових дозах опромінення (Табл. 4.1) та спорідненості спектрів ампліконів при різних дозах опромінення одного генотипу, Перлини лісостепу та її мутанту (Табл. 4.2, 4.3).

Табл. 4.1 Значення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів, що відповідають одній дозі різних генотипів одержаних при ISSR-ПЛР і RAPD – ПЛР

RAPD-ПЛР, Варіанти	М**,К	М., 5Гр	М.,10 Гр	М.,15 Гр	ISSR-ПЛР Варіанти,	.,К	М., 5Гр	М., 10 Гр	М., 15 Гр
Пл.Л*,К	0.67	-	-	-	Пл.Л.,К	0.75	-	-	-
Пл.Л.,5 Гр	-	0.65	-	-	Пл.Л.,5 Гр	-	0.63	-	-
Пл.Л.,10 Гр	-	-	0.73	-	Пл.Л.,10 Гр	-	-	0.68	-
Пл.Л.,15 Гр	-	-	-	0.81	Пл.Л.,15 Гр	-	-	-	0.71

Умовні позначення:

Пл.Л*- Перлина Лісостепу

М**- Мутант Перлини Лісостепу

Спостерігаються відмінності як у спорідненості спектрів ампліконів контрольних варіантів генотипів, так і при опроміненні (Табл. 4.1). Загальним в поведінці цього показника є найбільш значне зниження спорідненості спектрів ампліконів у Перлини лісостепу та її мутанту при дозі опромінення 5 Гр та підвищення спорідненості при 10 та 15 Гр як при ISSR-ПЛР, так і RAPD – ПЛР аналізі.

В табл. 4.2 наведено значення індексу подібності Жаккарда для спектру ампліконів, що одержані при ISSR-ПЛР контрольних і опромінених варіантів окремо для кожного з генотипів.

Помітна відмінність в поведінці показника подібності у обраних генотипів. Так, при опроміненні Перлини лісостепу при дозі 5 та 10 Гр спостерігається зниження подібності з контрольним варіантом та підвищення цього показника при опроміненні 15 Гр. При опроміненні мутанту спостерігається поступове зниження подібності спектрів ампліконів опромінених варіантів з контрольним варіантом. По - різному також проявляються ефекти нестабільності геному при двох послідовних дозах у різних генотипів. У сорту Перлина лісостепу спорідненість спектрів ампліконів при 5 та 10 Гр змінюється зниженням спорідненості між спектрами ампліконів при опроміненні в 10 та 15 Гр. В той час як спорідненість між спектрами ампліконів між послідовними дозами у мутанта поступово знижується.

Табл. 4.2 Залежність від дози передпосівного опромінення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів кожного з генотипів при ISSR- ПЛР аналізі ДНК

ISSR, ПЛР, Варіанти	Пл.Л. ,К	Пл.Л., 5 Гр	Пл.Л. 10 Гр	Пл.Л., 15 Гр	ISSR, ПЛР, Варіанти	М.,К	М., 5Гр	М., 10 Гр	М., 15 Гр
Пл.Л.,К	1	0.69	0.65	0.80	М.,К	1	0.78	0.72	0.67
Пл.Л.,5 Гр		1	0.82	0.77	М.,5 Гр		1	0.72	0.67
Пл.Л.,10 Гр			1	0.72	М.,10 Гр			1	0.62
Пл.Л.,15 Гр				1	М., 15 Гр				1

Подібним чином ведуть себе індекси спорідненості між контрольними та опроміненими варіантами при проведенні RAPD-ПЛР з ДНК обох генотипів (Табл. 4.3). Найбільше зниження спорідненості з контрольним варіантом спостерігається при дозі опромінення 5 Гр з незначним збільшенням цього показника при дозі опромінення 10 та 15 Гр. Для обох генотипів

спостерігається також зростання спорідненості між спектрами ампліконів варіантів з опроміненням між двома послідовними дозами.

Табл. 4.3 Залежність від дози передпосівного опромінення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів кожного з генотипів при RAPD- ПЛР аналізі ДНК

RAPD-ПЛР Варіанти	Пл.Л., К	Пл.Л., 5 Гр	Пл.Л.1 10 Гр	Пл.Л., 15 Гр	RAPD-ПЛР Варіанти	М., К	М., 5 Гр	М., 10 Гр	М., 15 Гр
Пл.Л., К	1	0.62	0,68	0.67	М.,К	1	0.70	0.71	0.77
Пл.Л.,5 Гр		1	0,82	0.73	М., 5 Гр		1	0,71	0.83
Пл.Л.,10 Гр			1	0.89	М., 10Гр			1	0.78
Пл.Л.15 Гр				1	М.,15 Гр.				1

Умовні позначення як у табл. 3,4

Таким чином, основними результатами цього етапу дослідження є, по-перше, виявлення ефектів ушкодження ДНК у фазі цвітіння рослин за умов передпосівного рентгенівського опромінення сухого насіння. По-друге, виявлення зв'язку між поліморфізмом первинної структури ДНК у різних генотипів та характером її перебудови при опроміненні; по-третє, встановлення того, що найбільше ураження ДНК обох генотипів спостерігається при дозах опромінення 5-10 Грей та тенденцію до відновлення при дозі опромінення 15 Грей.

Проаналізуємо результати передпосівного опромінення насіння за змінами у нагромадженні флавоноїдів та фенолів у суцвіттях двох досліджуваних генотипів.

Зміни вмісту фенолів та флавоноїдів показують відмінності у дозових залежностях цих характеристик у сорту Перлини лісостепу та його мутанту. Дозова залежність питомого вмісту флавоноїдів у першому випадку (Рис. 4.4 А)

має максимум, що відповідає дозі 10 Грей, у другому – 5 Грей. Значиме підвищення питомого вмісту фенолів спостерігається тільки у мутанту Перлини Лісостепу при дозі 5 Гр (Рис. 4.9, Б). Спостерігається зниження вмісту обох антиоксидантів при дозі 15 Грей.

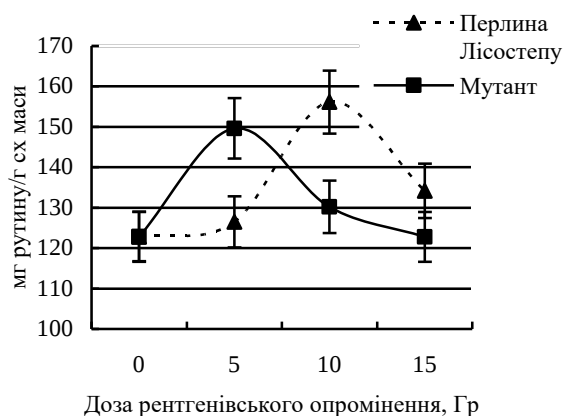
Відзначимо, що максимальний вміст флавоноїдів і фенолів (5 та 10 Грей для різних генотипів) відповідає найбільшій втраті спорідненості із контрольним варіантом спектрів ампліконів при RAPD - (обидва генотипи) та ISSR-ПЛР (для Перлини лісостепу) та зниження цих показників при дозі опромінення 15 Гр.

Таким чином, всі три використані показники свідчать про нелінійну і немонотонну залежність ефектів опромінення від дози, що є характерною для царини малих доз. Найбільш поширена точка зору пов'язує це із суперпозицією дозових залежностей декількох індукованих опроміненням процесів [170-172]. По-перше, це безпосередньо ураження структур клітини і його розвиток, продовження утворення продуктів взаємодії ДНК з АФК. По-друге, індукцією/стимуляцією різноманітних репаративних процесів, кожний з яких має свій поріг активації і дозову залежність. По-третє, стимуляцією антиоксидантного захисту за рахунок ферментативних і не ферментативних антиоксидантів. Четвертий механізм, що потенційно може призводити до зниження появи атипових ампліконів, полягає в стимуляції процесів у фазах «перевірки» (“check point”), які блокують перехід до поділу клітин із значними порушеннями ДНК.

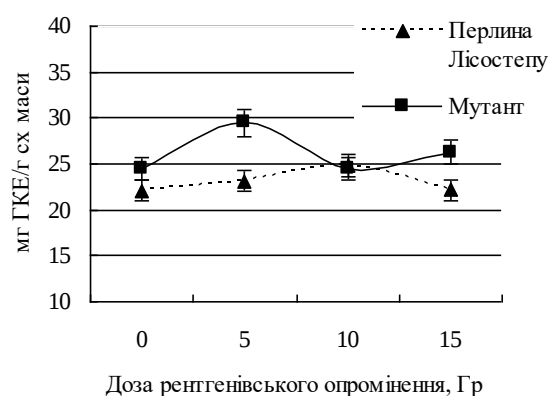
Разом з тим виявлення окремих компонент відгуку на радіаційний стрес залишає відкритим питання про структуру їх взаємодії, в данному випадку - взаємодію залежних від дози змін рівня ушкодження ДНК та стимуляцію синтезу антиоксидантів.

Розглянемо гіпотетичну інтерактивну картину радіаційно-індукованих процесів, виходячи з одержаних даних. Найнижчі значення коефіцієнтів спорідненості між контрольними та опроміненими варіантами при дозах 5-10

Грей свідчать про найвищий рівень ушкодження ДНК та про низьку ефективність відновлювальних процесів для царини малих доз, що вже доведено рядом досліджень [163]. Саме за дії цих «малих» для досліджених гетотипів та нижчих за порогові для включення репаративних процесів доз і спостерігається найвищий питомий вміст антиоксидантів. Це узгоджується з даними інших авторів [44,45] щодо зростання рівня АФК за умов геномної нестабільності. Відомо про поліфункціональність активних форм кисню, включаючи боротьбу з чужорідною ДНК[173,174], що за принципом зворотнього зв'язку має стимулювати підвищення рівня антиоксидантів. В цю загальну схему вкладається зниження питомого вмісту антиоксидантів одночасно з підвищенням спорідненості спектрів ампліконів опромінених і контрольних варіантів при дозі опромінення 15 Гр, що свідчить про початок відновлення нормальної структури ДНК за рахунок індукції/стимуляції репаративних процесів.



А



Б

Рис. 4.9 Дозова залежність вмісту флавоноїдів (А) фенолів (Б) у суцвіттях ромашки лікарської сорту Перлина лісостепу та мутанту сорту Перлина лісостепу. Довірчий інтервал, $P=0.95$.

Додаткову інформацію про взаємодію ураження ДНК, репарації ушкоджень та антиоксидантного захисту надає порівняння відгуку на передпосівне опромінення обох генотипів, що крім виявлення загальних тенденцій, проявляє певні відмінності. Так, на відміну від сорту Перлини

лісостепу, у його мутанту не спостерігається підвищення з дозою опромінення спорідненості спектрів ампліконів при ISSR-ПЛР аналізі (Табл. 4.1), а максимум у нагромадженні обох антиоксидантів відповідає дозі опромінення не 10, а 5 Грей. Співставлення цих двох фактів дозволяє припустити існування певних

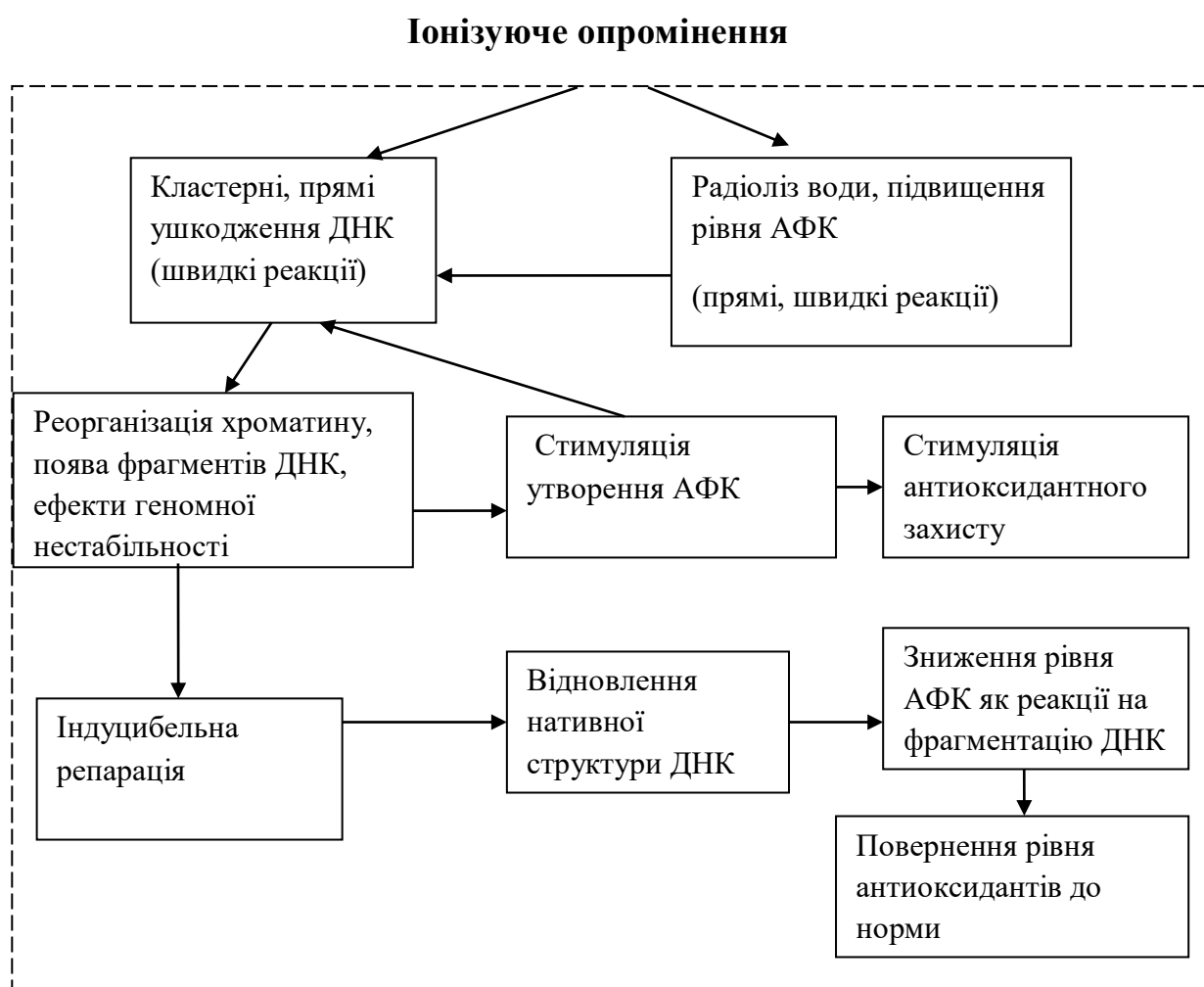


Рис. 4.10 Гіпотетична схема, що відображає залежну від дози опромінення інтерактивну картину взаємодій основних складових пострадіаційного періоду за умов іонізуючого опромінення

відмінностей у проходженні репаративних процесів у цих двох генотипах. Існування поліморфізму за ISSR та RAPD послідовностями обумовлює і певні відмінності у компактизації хроматину, що, за сучасними

уявленнями [164,165], впливає на доступність ДНК транскрипційним та репараційним факторам, утворенню так званих радіаційно – індукованих фокусів (radiation induced foci) [163], що забезпечують ефективність відновлення ДНК.

ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА

Таким чином, головним результатом проведеного дослідження є встановлення того, що за явищем стимуляції напрацювання антиоксидантів стоїть складна система взаємодій між розвитком ураження ДНК і репаративними процесами, розпізнаванням помилкової первинної структури ДНК та відповідної конформації хроматину.

Встановлено, що існує вузька область підпорогових доз ініціації репарації ДНК, при якій відбувається стимуляція напрацювання фармацевтично значимої продукції[175,176]. Ці дані є початком переходу від суто емпіричного підбору ефективних доз для стимуляції напрацювання тих чи інших метаболітів до виявлення механізмів, що обумовлюють метаболічні перебудови.

РОЗДІЛ 5. ВЗАЄМОДІЯ ВІДДАЛЕНИХ ЕФЕКТІВ УРАЖЕННЯ ГЕНОМУ ПРИ ПЕРЕДПОСІВНОМУ УФ-С ОПРОМІНЕННІ ІЗ СТИМУЛЯЦІЄЮ НАПРАЦЮВАННЯ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ АНТИОКСИДАНТІВ

На сьогодні встановлено значний вплив УФ-С опромінення на перебудови метаболону рослин, включаючи і блок вторинного метаболізму безпосередньо пов'язаний з напрацюванням радіопротекторних речовин [10].

Результати досліджень, викладені у попередньому розділі, вказують на ряд характерних рис разового передпосівного впливу іонізуючого опромінення на довготривалі перебудови метаболізму сформованих рослин та на існування інтерактивної картини цього впливу на ключові процеси пострадіаційного періоду.

Метою наступного етапу дослідження було виявлення специфіки взаємозв'язку стимуляції нагромадження низькомолекулярних антиоксидантів та ураження геному на стадії цвітіння рослин *Matricaria chamomilla* L за умов передпосівного УФ - С опромінення насіння при дозах 5, 10, 15 кДж/м².

Як відзначено у Розділі 2, використання опромінення рослин у обраному діапазоні малих доз стимулює напрацювання необхідних метаболітів без зменшення врожаю фармацевтичної сировини[9,10]. Це робить біотехнологічне застосування опромінення цілком ефективним, що, в свою чергу, вимагає оцінку факторів, що впливають на відтворюваність результатів для конкретного виду, сорту лікарських рослин.

Не менш важливим, суто теоретичним питанням, лишається виявлення механізмів та факторів, що обумовлюють трансформацію разового передпосівного УФ-С опромінення у насінні у довготривалі перебудови метаболізму.

Біотехнологічне застосування УФ-опромінення має певні переваги порівняно з іонізуючим опроміненням, оскільки не вимагає складної апаратури,

високих вимог до організації приміщень та техніки безпеки і відповідності низки державних регуляцій.

Схема проведення дослідження ефектів УФ-С опроміненням загалом повторює послідовність етапів дослідження ефектів рентгенівського опромінення. Проведено передпосівне опромінення насіння двох генотипів ромашки лікарської, посів цього насіння, на стадії основного цвітіння проведено відбір вегетативної маси для молекулярно – генетичних досліджень та суцвіть для визначення вмісту антиоксидантів.

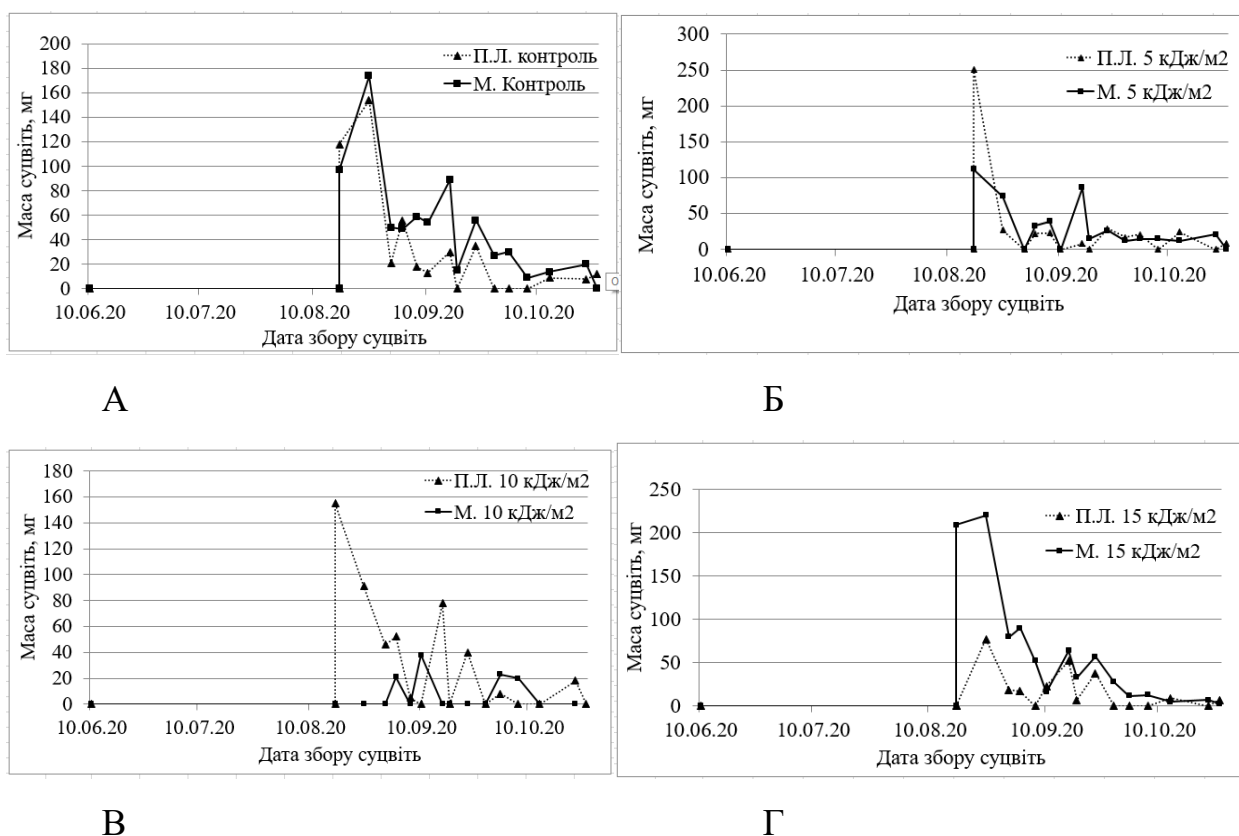
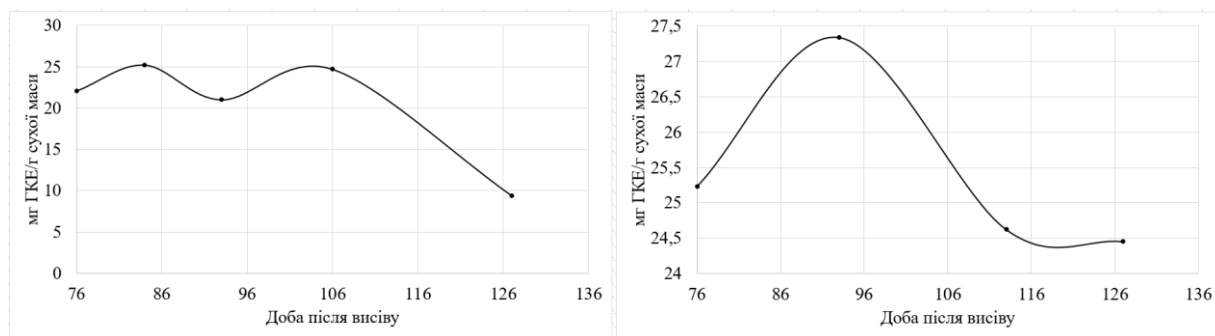


Рис 5. 1. Динаміка врожайності фармацевтичної сировини (суцвіть), 2020 рік. А- контроль; А- контроль; Б- 5 кДж/м² ; В- 10кДж/м² ;Г -15 кДж/м² .

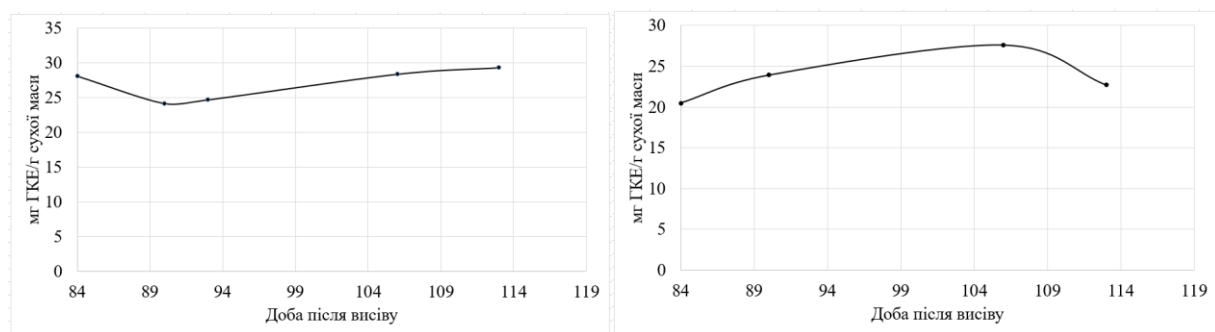
Таким чином, отримані результати свідчать, що Перлина Лісостепу має вищу врожайність при опроміненні 10 кДж/м², ніж її мутант. Разом з тим, мутант продемонстрував вищу врожайність при 15кДж/м². У всіх варіантах УФ-С опромінення, Перлина Лісостепу показала найвищу врожайність на початку

цвітіння, в той час як для її мутанта подібна картина спостерігалася лише в контролі. В інших варіантах опромінення, для мутанта спостерігається більш вирівняна динаміка формування маси фармацевтичної сировини.



А

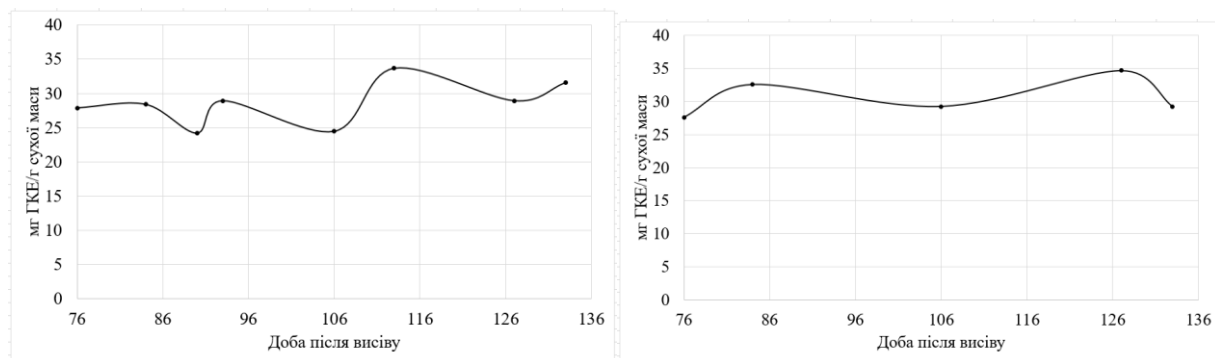
Б



В

Г

Рис. 5.2 Вміст фенолів (мг ГКЕ/г сухої маси суцвіть) у контрольного (А), опроміненого в дозі 5кДж/м²(Б), 10кДж/м² (В), 15кДж/м² (Г) зразках Перлини лісостепу



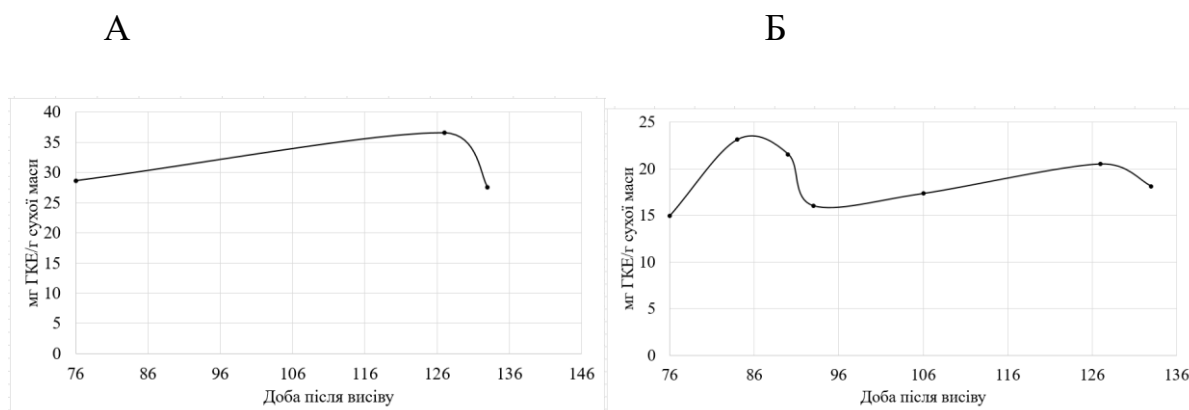


Рис. 5.3. Вміст фенолів (мг ГКЕ/г сухої маси суцвіть) у контрольного (А), опроміненого в дозі 5кДж/м²(Б), 10кДж/м² (В), 15кДж/м² (Г) зразках мутанту Перлини лісостепу

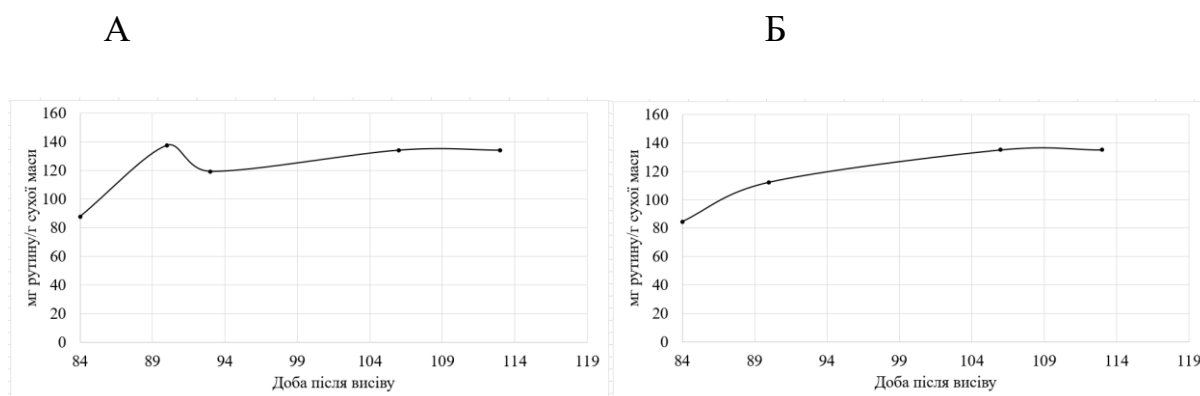
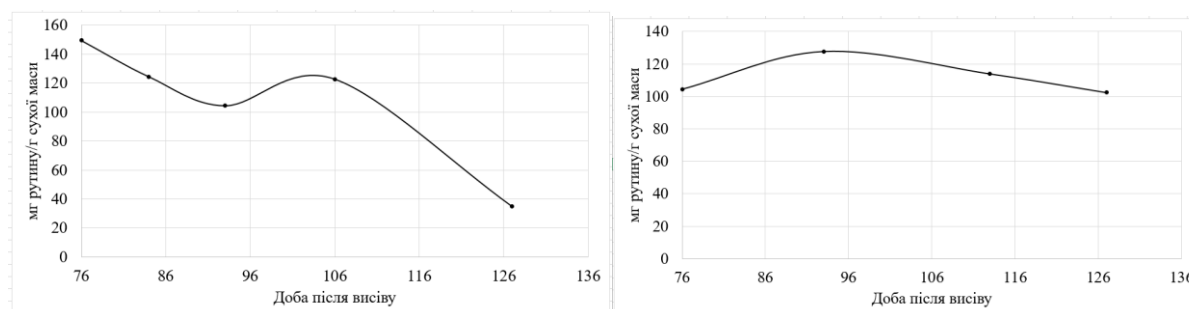


Рис. 5.4. Вміст флаваноїдів (мг рутину/г сухої маси) у контрольного (А), опроміненого в дозі 5кДж/м²(Б), 10кДж/м² (В), 15кДж/м² (Г) зразках Перлини лісостепу

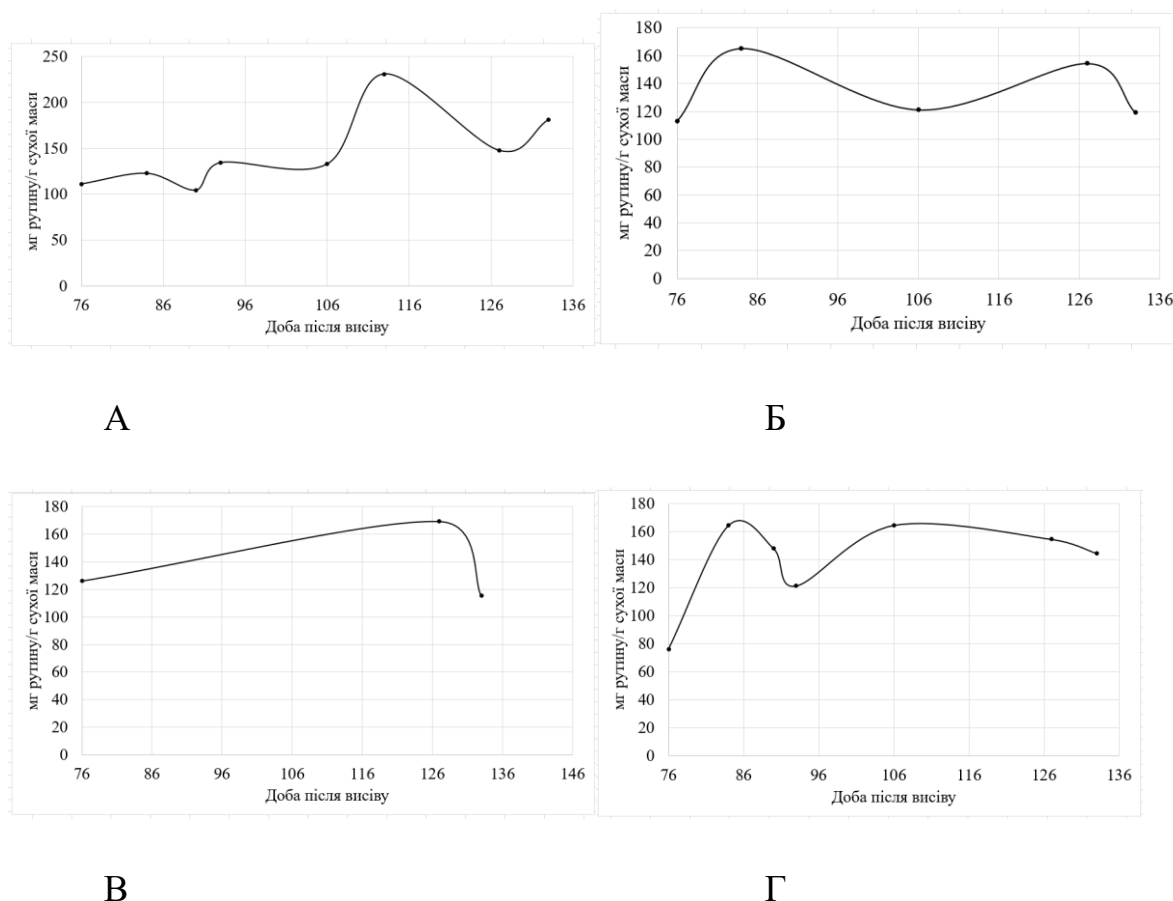


Рис. 5.6 Вміст флаваноїдів (мг рутину/г сухої маси) у контрольного (А), опроміненого в дозі 5кДж/м²(Б), 10кДж/м² (В), 15кДж/м² (Г) зразках мутанту Перлини лісостепу.

Оцінки динаміки вмісту флаваноїдів і фенолів у фармацевтичній сировині свідчить, як і у випадку з рентгенівським опроміненням, про нелінійний і немонотонних її характер. Як при рентгенівському опроміненні постерігається зсув у часі максимумів питомого вмісту антиоксидантів відносно контролю при всіх дозах опромінення для обох генотипів. Як і у випадку з формуванням біомаси суцвіть, це відображає складний характер взаємодії між процесами первинного і вторинного метаболізму у змінних погодних умовах, тобто знаходиться под. епігенетичним контролем.

Така складна динамічна картина робить неможливою загальноприйняту статистичну обробку результатів. Статистичні оцінки були проведені за непараметричним Х-критерієм Ван-дер-Вардена тільки для максимумів питомого вмісту без врахування часу його спостереження. Оцінки за

непараметричним критерієм вказують на достовірну при 95% довірчому інтервалі різницю між максимальними значеннями у контрольних і опромінених варіантів обох генотипів. Зазначимо, що складна динаміка формування фармацевтичної сировини та питомого вмісту антиоксидантів в ній повторювалась щороку і відмічена у всіх восьми генотипах, що вивчено у Відділі попередньо [9, 10].

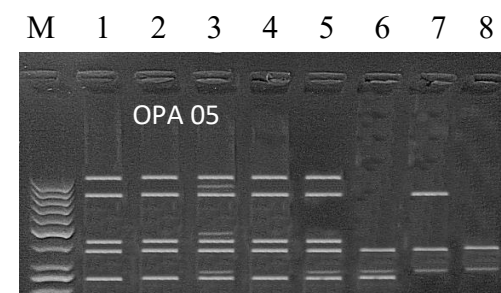
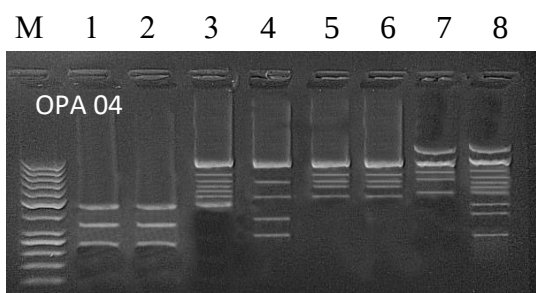
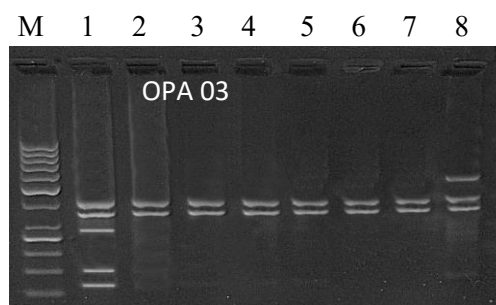
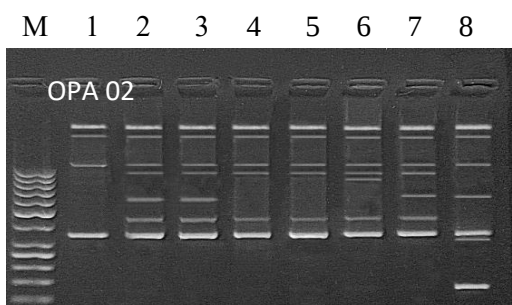
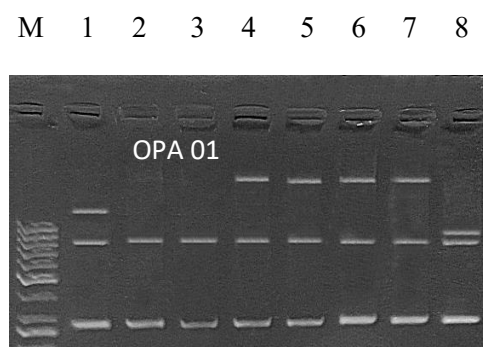
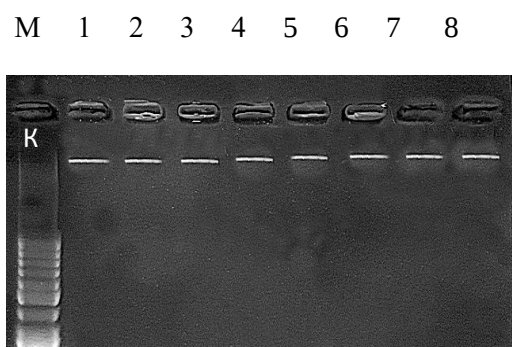
Перейдемо до оцінки впливу передпосівного УФ-С опромінення на стабільність ДНК на стадії цвітіння рослин.

Для характеристики змін спектрів ампліконів при проведенні ISSR-ПЛР і RAPD-ПЛР контрольних і опромінених варіантів використано два показники. Показник «% атипових ампліконів» розраховували як відношення кількості відмінних від контрольних ампліконів до їх загальної кількості; для оцінки значущості різниці середніх показників для різних варіантів дослідження використано непараметричний Х-критерій Ван-дер-Вардена. В якості показника змін спектрів ампліконів різної довжини використано коефіцієнт подібності Жаккарда [177].

Одержані електрофореграми (Рис. 5.1, 5.2) свідчать про значні відмінності у кількості та довжині ампліконів при RAPD– ПЛР та ISSR- ПЛР аналізі у контрольних варіантах двох досліджених генотипів ромашки лікарської та появі різноманітних за довжиною ампліконів при опроміненні. Інтерпретація цих результатів має враховувати особливості дії УФ - опромінення на ДНК.

Безпосередня дія ультрафіолетового випромінювання на ДНК суттєво відрізняється від дії іонізуючого випромінювання. Енергія фотону ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 250 нм складає 5 еВ і цього достатньо тільки для переведення атомів або молекул у збуджений стан, в той час як енергія гамма-фотону становить понад 10^5 еВ і перевершує енергію будь-якого хімічного зв'язку і викликає його руйнацію. Фотопродукти піримідину є основними продуктами безпосередньої дії ультрафіолетового випромінювання на ДНК, основними з яких є циклобутанові піримідинові

димери (CPD), 6-4 фотопродукти піримідину (6-4PP) та їхні ізомери Дьюара [169, 178, 179] . Два суміжні цитозини розглядаються як гарячі точки мутацій при впливі УФ-В та УФ-С випромінювання[180]. Встановлено, що послідовності Т-Т і Т-С є більш фотореактивними, ніж послідовності С-Т та С-С[180, 181]. Крім первинних реакцій взаємодії УФ-С опромінення з молекулою ДНК, значний внесок в біохімічні зміни основ відіграє взаємодія з вільними радикалами, активними формами кисню, включаючи і синглетний кисень, вміст яких стимулюється УФ – опроміненням [169, 181]. Поява подвійних розривів та їх помилкова репарація є основним джерелом реорганізації хроматину після опромінення [180]. Певний внесок у модифікацію первинної структури ДНК надає явище гіперзмінюваності, утворення нових мікросателітів, що різняться за довжиною, а не за нуклеотидною послідовністю, як помилок



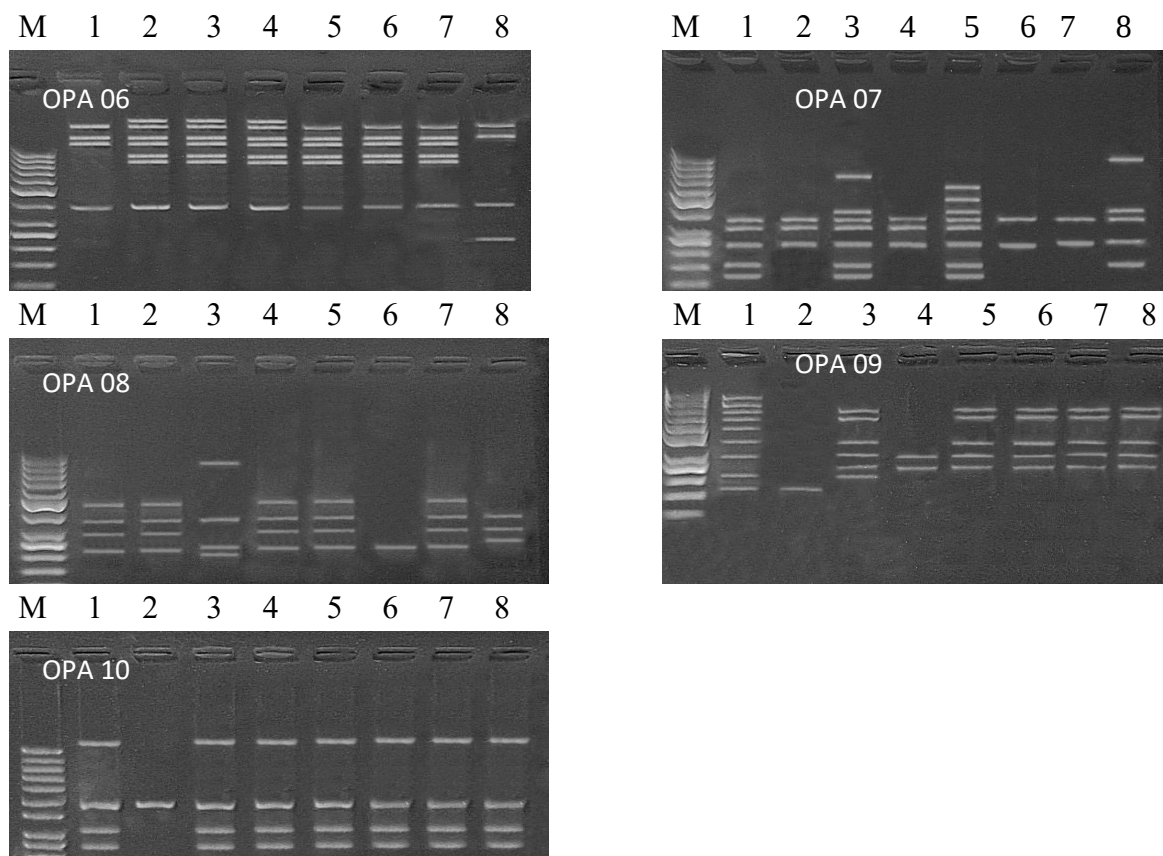
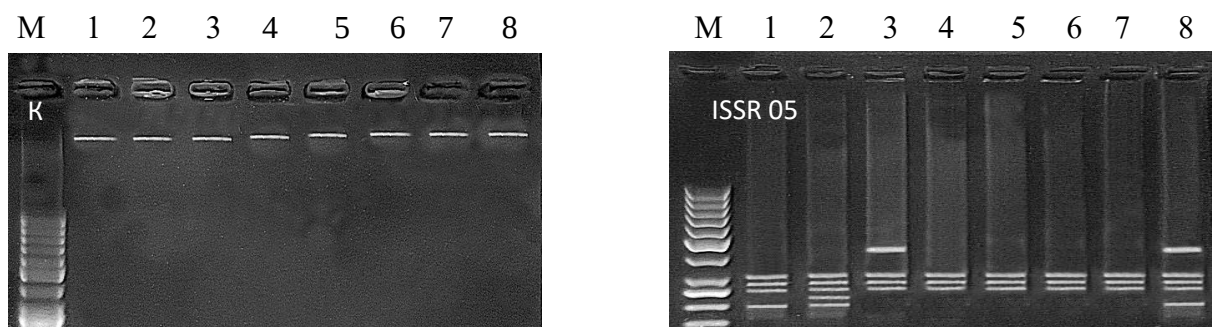


Рис. 5.6. Електрофореграма розділення продуктів RAPD —ПЛР. К — контроль нативності ДНК; М — маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bp; 1 — Перлина лісостепу, контроль; 2 — Перлина лісостепу 5 кДж/м²; 3 — Перлина лісостепу, 10 кДж/м²; 4 — Перлина лісостепу, 15 кДж/м²; 5 — мутант, контроль; 6 — мутант, 5 кДж/м²; 7 — мутант, 10 кДж/м²; 8 — мутант, 15 кДж/м²



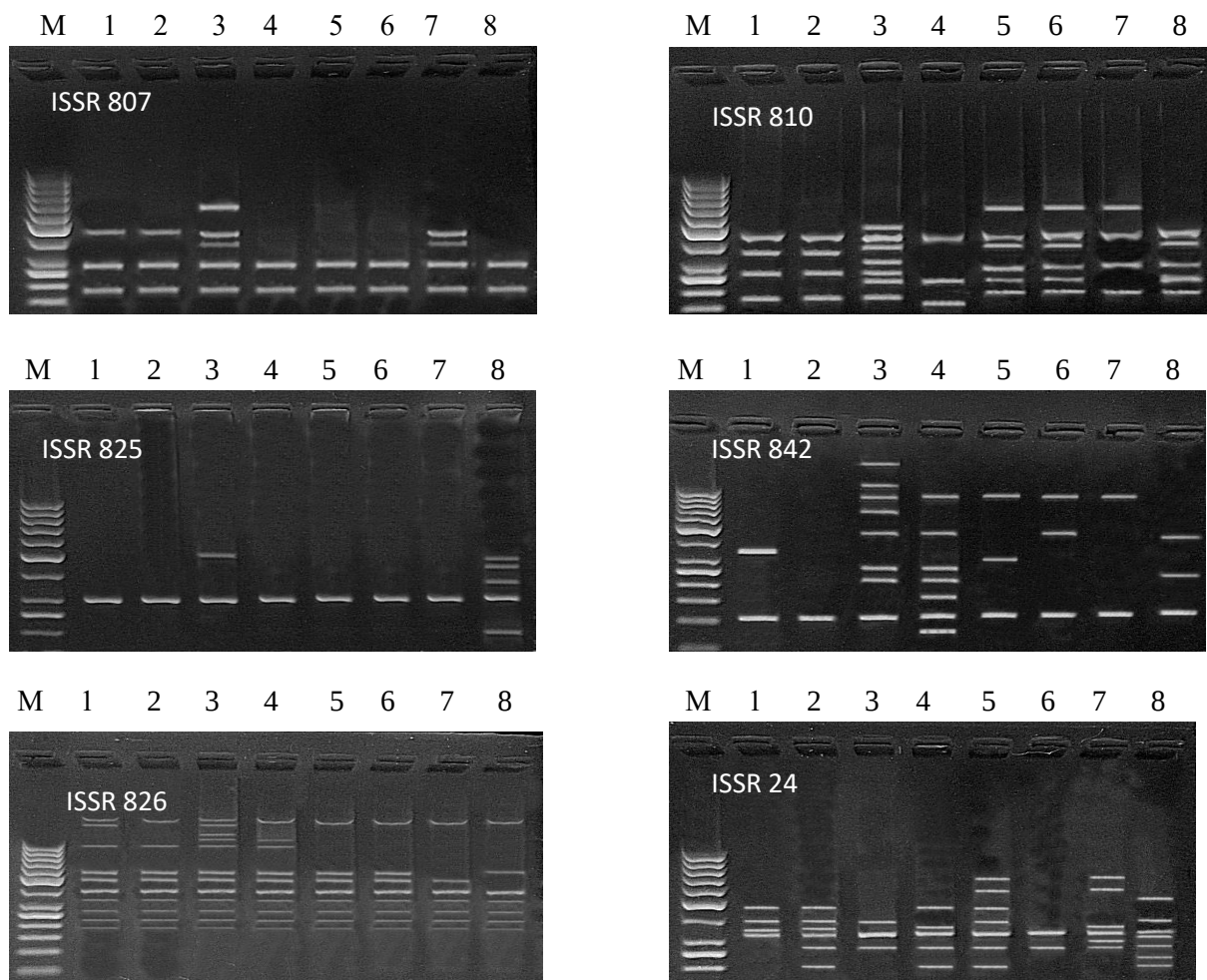


Рис.5.7. Електрофореграма розділення продуктів ISSR —ПЛР. К — контроль нативності ДНК; М — маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bp; 1 — Перлина лісостепу, контроль; 2 — Перлина лісостепу 5 кДж/м²; 3 — Перлина лісостепу, 10 кДж/м²; 4 — Перлина лісостепу, 15 кДж/м²; 5 — мутант, контроль; 6 — мутант, 5 кДж/м²; 7 — мутант, 10 кДж/м²; 8 — мутант, 15 кДж/м²

реплікації і репарації саме в цих послідовностях ДНК[11]. Кінцевим результатом низки цих процесів є значні перебудови первинної структури ДНК і хроматину, що при проведенні ПЛР реакцій з різними праймерами надає картину змін спектрів ампліконів (Рис.5.1, 5.2)

Для кількісного аналізу одержаних результатів та їх співставлення із змінами синтезу та накопичення антиоксидантів у лікарській сировині при УФ-

С опроміненні використано два показники: відсоток атипових ампліконів та індекс подібності Жаккарда.

Обидва обрані показники, тобто відсоток атипових ампліконів та індекс подібності Жаккарда, характеризують зміни у спектрі ампліконів, але процедура розрахунків обумовлює те, що ці показники не дублюються, а взаємодоповнюються. Індекс подібності, як кластерний показник, більше акцентується на якісній відмінності спектрів ампліконів в цілому.

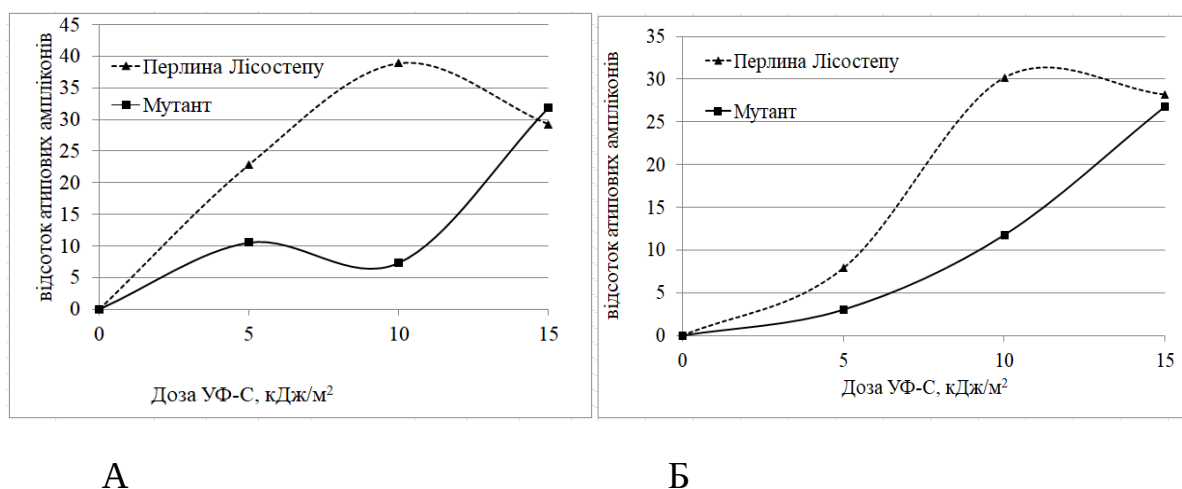


Рис.5.8 Зміни усередненої частоти атипових ампліконів в залежності від дози за даними RAPD (А) та ISSR(Б) ПЛР аналізу.

Статистичний аналіз залежності від дози УФ-С опромінення усередненої частоти атипових ампліконів за даними RAPD (А) – ПЛР та ISSR(Б) - ПЛР аналізу з використанням Х-критерію Ван-дер-Вардена свідчить про існування достовірної різниці між парами середніх значень відсотку атипових ампліконів при різних дозах для продуктів RAPD-ПЛР і ISSR-ПЛР для мутанту Перлини лісостепу. Для сорту Перлина лісостепу спостерігається відсутність значимої різниці значень цих показників при дозах 10-15 кДж/м² як при RAPD- так і ISSR-ПЛР аналізі (Табл.2.1, 2.2).

При проведенні RAPD – ПЛР і ISSR - ПЛР для мутанту спостерігається не тільки значно нижча поява атипових ампліконів при дозах 5 і 10 кДж/м²,

порівняно з таким показником для материнського генотипу (Рис.5.1), але й суттєва різниця у характері дозових залежностей. В той час як для генотипу Перлина лісостепу спостерігається вихід дозової залежності на плато в інтервалі 10 - 15 кДж/м², що непрямым чином свідчить про активацію репаративних процесів, для мутанту цього сорту відсоток атипових ампліконів послідовно зростає з підвищенням дози. Таким чином спостерігається різниця у включенні репаративних процесів у цих двох генотипів.

Перейдемо до розгляду другого показника змін первинної структури ДНК за умов УФ-С опромінення - індексу подібності Жаккарда між спектрами ампліконів контрольних і опромінених варіантів. В таблиці 5.3- 5.4 наведено значення індексу подібності Жаккарда для спектру ампліконів, що одержані при ISSR –ПЛР і RAPD –ПЛР окремо для кожного з генотипів.

Помітна відмінність в поведінці показника подібності у обраних генотипів в залежності від дози. Виявлено монотонне, з підвищенням дози УФ-С опромінення зниження спорідненості спектрів ампліконів при RAPD- ПЛР у сорту Перлина лісостепу і подібна поведінка цього показника у мутанта при ISSR –ПЛР аналізі. Опромінення при дозі 15 кДж/м² Перлини лісостепу викликає підвищення спорідненості з контролем спектрів ампліконів при ISSR-ПЛР аналізі, в той час, як у мутанту певне підвищення спорідненості відмічено при дозі 10 кДж/м², а при 15 кДж/м² значення цього показника досягає мінімальних значень. Співставлення поведінки індексу спорідненості саме для сорту Перлина лісостепу з дозовими залежностями відсотку атипових ампліконів цього генотипу дозволяє припустити, що у даному випадку спостерігається включення репараційних процесів.

Таким чином, основними результатами цього етапу дослідження є, по-перше, виявлення проявів ураженості геному у фазі цвітіння рослин за умов передпосівного УФ-С опромінення сухого насіння.

Табл. 5.1 Залежність від дози УФ-С опромінення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів кожного з генотипів при RAPD- ПЛР аналізі ДНК

	П.Л*. К	П.Л. 5кДж/м ²	П.Л. 10 кДж/м ²	П.Л. 15 кДж/м ²		М. К.	М**. 5 кДж/м ²	М. 10 кДж/м ²	М. 15 кДж/м ²
П.Л. К.	1	0.818	0.833	0.783	М., К	1	0.792	0.875	0.769
П.Л., 5 кДж/м ²		1	0.667	0.850	М., 5 кДж/м ²		1	0.905	0.708
П.Л., 10 кДж/м ²			1	0.708	М., 10 кДж/м ²			1	0.792
П.Л., 15 кДж/м ²				1	М. 15 кДж/м ²				1

Табл.5. 4 Залежність від дози УФ-С опромінення індексу подібності

Жаккарда спектрів ампліконів кожного з генотипів при ISSR- ПЛР аналізі ДНК

	П.Л.	П.Л. 5кДж/м ²	П.Л. 10 кДж/м ²	П.Л. 15 кДж/м ²		М. К	М. 5кДж/м ²	М., 10 кДж/м ²	М., 15 кДж/м ²
П.Л*. К.	1	0.944	0.739	0.895	М., К	1	0.947	0.850	0.800
П.Л., 5 кДж/м ²		1	0.696	0.944	М., 5кДж/м ²		1	0.800	0.842
П.Л., 10 кДж/м ²			1	0.739	М., 10 кДж/м ²			1	0.667
П.Л., 15 кДж/м ²				1	М., 15 кДж/м ²				1

*П.Л- Перлина лісостепу, ** М – мутант Перлини лісостепу

По-друге, встановлення зв'язку між поліморфізмом первинної структури ДНК у різних генотипів та характером її перебудови при УФ-С опроміненні;

по-третє, встановлення значної різниці загальної поведінки дозових залежностей відсотку атипових ампліконів у двох досліджених генотипах та певної відмінності у дозових залежностях спорідненості з контрольними спектрами ампліконів при опроміненні.

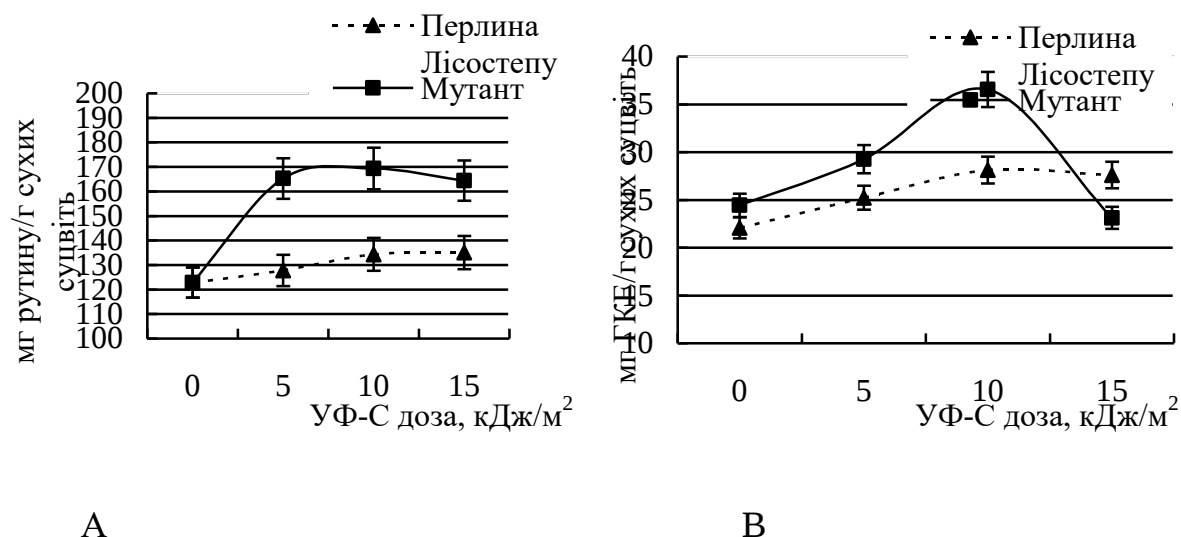


Рис. 5.9 Дозова залежність загального вмісту флаваноїдів (А) та фенолів (В) у суцвіттях *M. chamomilla* сорту Перлина Лісостепу та його мутанта. Довірчий інтервал, $P = 0,95$.

Проаналізуємо вплив передпосівного УФ-С опромінення насіння на зміни у синтезі та накопиченні флаваноїдів та фенолів у суцвіттях двох досліджуваних генотипів. Відзначимо, що у контрольних варіантах генотипів спостерігається однаковий питомий вміст обох антиоксидантів. При УФ-С опроміненні спостерігаються відмінності у рівні стимуляції вмісту цих антиоксидантів у суцвіттях генотипу Перлина лісостепу та його мутанту. У мутанту стимуляція напрацювання цього антиоксиданту при опроміненні у 3.5-4 рази перевищує подібний ефект у суцвіттях Перлини лісостепу. Можливо, цей ефект пов'язано з більш низьким рівнем відсотку атипових ампліконів у

мутанта в інтервалі доз 5-10 кДж/м² (Рис.5.3). Дозові залежності питомого вмісту флавоноїдів у обох генотипах вже при дозах 5 кДж/м² переходять у фазу насичення. Значиме підвищення питомого вмісту фенолів спостерігається тільки у мутанту Перлини Лісостепу з максимумом при дозі опромінення 10 кДж/м² (Рис. 4, Б) з подальшим зниженням при дозі опромінення 15 кДж/м² до контрольного рівня. Відзначимо, що при цій же дозі спостерігається підвищення подібності первинної структури ДНК з контролем за показником RAPD –ПЛР аналізу (Табл.5.3)

Підвищення синтезу антиоксидантів і утримання цього показника на одному рівні співпадає з відсутністю чіткої тенденції відновлення первинної структури ДНК. Вихід на плато дозової залежності відсотка атипових ампліконів, що може розглядатися як включення репаративних процесів, підтверджується другим показником індексом подібності тільки у генотипу Перлина лісостепу при ISSR –ПЛР -аналізі.

Це дає можливість припускати, що не кількість атипових ампліконів є сигналом стимуляції захисних реакцій, а саме ступінь ураження первинної структури ДНК і поява її фрагментів певного розміру.

УФ- С опромінення

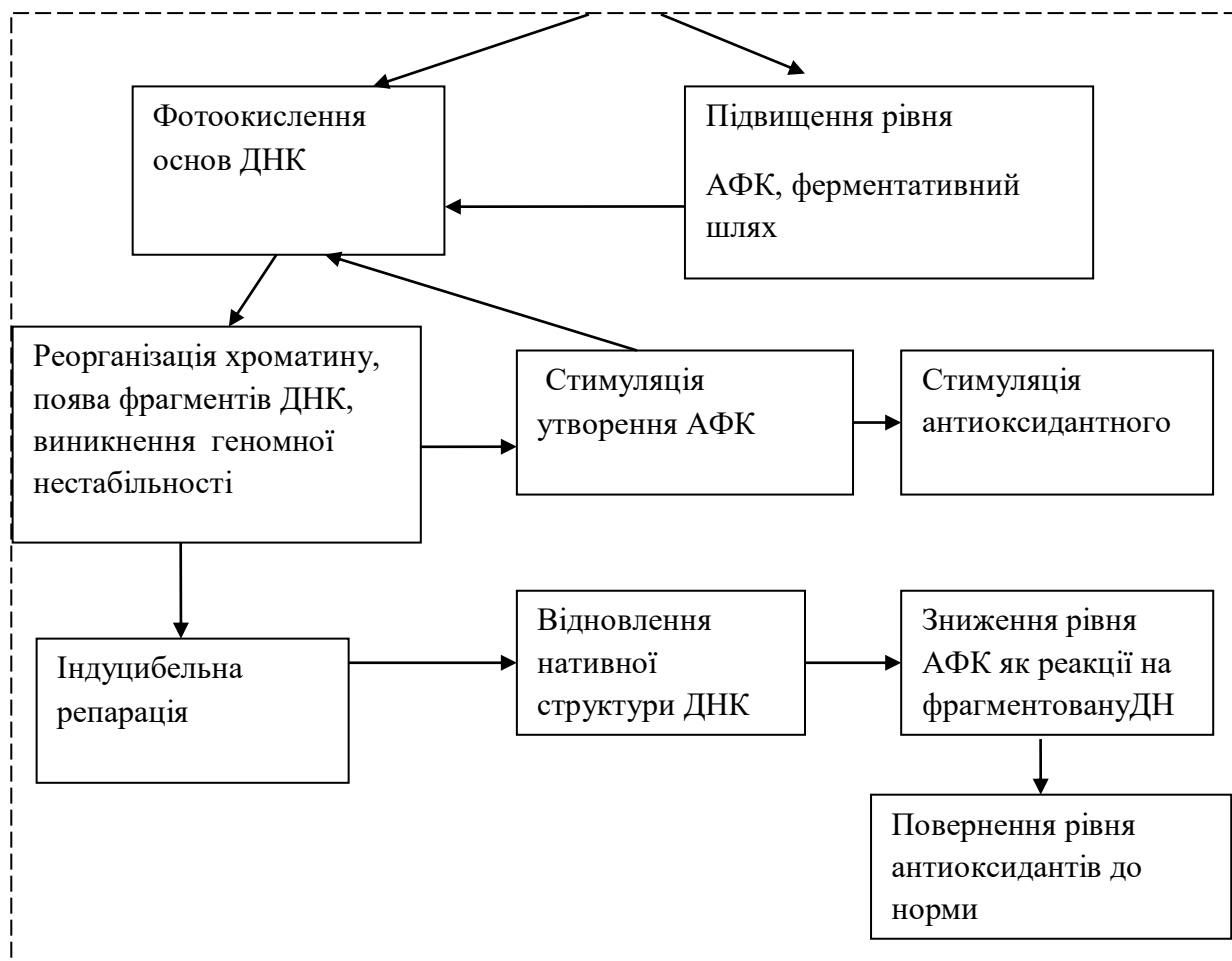


Рис. 5.10 Гіпотетична схема, що відображає залежну від дози опромінення інтерактивну картину взаємодій основних складових пострадіаційного періоду за умов УФ-С опромінення насіння.

ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА

Таким чином, в результаті проведеного дослідження встановлено, що явище стимуляції напрацювання антиоксидантів, як у випадку іонізуючого, так і УФ-С опромінення, пов'язано із взаємодією між розвитком ураження ДНК і репаративними процесами, розпізнаванням помилкової первинної структури ДНК та відповідної конформації хроматину. Важливо, що дія іонізуючого і неіонізуючого, в даному випадку УФ-С опромінення, індукує антиоксидантний відгук через ушкодження ДНК, але має і значні відмінності[182,183]. З практичної точки зору УФ опромінення виявляється більш зручним інструментом у стимуляції вторинного метаболізму за рахунок

специфічного впливу на ДНК і уповільнення включення репаративних процесів.

Одержані результати підтверджують сформульовану попередньо гіпотезу [184] про існування зв'язку між стимуляцією активних форм кисню як захисту від фрагментів ДНК, що можуть сприйматися як чужорідна ДНК, та напрацюванням антиоксидантних сполук. Ці дані, одержані як для рентгенівського так і УФ-С опромінення, дають певний внесок для переходу від суто емпіричного підбору ефективних доз для стимуляції напрацювання тих чи інших метаболітів до виявлення механізмів, що обумовлюють метаболічні перебудови, і наближають теоретично обґрунтоване біотехнологічне використання різних видів опромінення .

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ РЕНТГЕНІВСЬКОГО І УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ОПРОМІНЕННЯ НА ВМІСТ ХАМАЗУЛЕНУ У СУЦВІТТЯХ РОМАШКИ ЛІКАРСЬКОЇ

Дослідження, результати якого розглянуто у попередніх розділах, спрямовано на з'ясування ефектів іонізуючого та УФ-С опромінення на появу типових маркерів оксидативного стресу – низькомолекулярних антиоксидантів флавоноїдів та фенолів. Разом з тим відомо, що однією з найважливіших для медичного застосування сполук, джерелом якої є ромашка лікарська, є антибіотик рослинного походження хамазулен. Хамазулен – входить до складу ефірного масла рослини. Ця ароматична сполука застосовується у лікуванні різноманітних процесів запалення, пришвидшує процеси регенерації, покращує процес загоєння ран та шкірних подразнень.

Хамазулен є терпеноїдним і поліциклічним ароматичним вуглеводнем (ПВ) з емпіричною формулою $C_{14}H_{16}$, може бути отриманий з азулену, екстрагується з ефірної олії ромашки лікарської, а також полину і деревію. Це яскраво синя олія, яка досить швидко розкладається під дією світла, повітря чи тепла. У рослин хамазулен біосинтезується з матрицину[185]. Хамазулен практично не вивчено в радіобіологічних дослідженнях.

Дослідження сумарної антиоксидантної здатності в експериментах *in vitro* підтвердила більш високу антиоксидантну активність хамазулена ($IC_{50} = 6,4$ мкг/мл) порівняно з аскорбіновою кислотою ($IC_{50} = 12,8$ мкг/мл), α -токоферолом ($IC_{50} = 20,5$ мкг/мл) та фенолом ($IC_{50} = 30,8$ мкг/мл) тобто сполуками, які добре вивчено при дослідженні антиоксидантного захисту у радіобіологічних дослідженнях. Спостерігалася сильна і значно ($P < 0,05$) більш висока активність уловлювання вільних радикалів ($IC_{50} = 3,7$ мкг мл⁻¹) по відношенню до фенолу ($IC_{50} = 6,2$ мкг мл⁻¹) та токоферолу ($IC_{50} = 11,5$ мкг/мл) [186,1187].

Разом з тим, широко досліджено ефекти хамазулену в дієтології, неврології, дерматології. Показано, що крім антибактеріальної і ранозагоюючої активності [185-188] ця сполука ефективна при лікуванні ожиріння та метаболічного синдрому[189]. Цими, як виявилось, різноманітними властивостями та застосуванням у медицині зумовлено на сьогодні підвищений інтерес до практичного використання хамазулену в різноманітних лікувальних процедурах.

При попередньому дослідженні вмісту хамазулена в рослинній продукції різних фармацевтичних компаній України («Віола», «Ліктрави», «Гербіон», Organic Herbs) було виявлено відсутність хамазулена в їх продукції.

Відпрацювання методики виділення хамазулена відбувалося виключно на наданій нам Центральною станцією лікарських рослин (Лубни) врожаю суцвіть ромашки лікарської сорту Перлина лісостепу. Саме цей сорт ромашки використовувався у подальших дослідженнях з використанням передпосівного рентгенівського та УФ-С опромінення.

У зв'язку з низьким виходом ефірного масла ромашки лікарської та наднизьким вмістом головного рослинного антибіотика – хамазулену у ефірній олії, дослід базувався виключно на одержанні рослинного матеріалу у польових умовах. Повторність дослідів – трикратна.

Сівбу ромашки лікарської у 2021-2023 роках було проведено в різні терміни, кінець березня - середина травня; насіння висівали з шириною міжряддя 45 см поверхнево без загортання ґрунтом, норма висіву 5 г/м², сорт «Перлина Лісостепу».

Сходи були дружними і вирівняними, суттєвих відмінностей у темпах проростання насіння і темпах росту рослин не виявлено. У фазу бутонізації ромашка лікарська у всіх варіантах вступила на початку травня – кінці червня.

Погодні умови вегетаційних періодів 2021-2023 рр року були в цілому сприятливі для інтенсивного росту та розвитку ромашки лікарської,

забезпечення ґрунтовою вологою рослин за рахунок регулярного поливу було достатньо, що сприяло практично постійному збору квітів ромашки і швидкому формуванню нових бутонів. Отримані результати польових досліджень свідчать, що застосування передпосівного рентгенівського опромінення насіння ромашки лікарської сприяє підвищенню продуктивності фармакологічної сировини (Рис.6.1) Із збільшенням дози опромінення до 15 Гр спостерігалася тенденція до підвищення урожайності суцвіть. Так, у варіанті із дозою опромінення 10 Гр урожайність повітряносухої сировини ромашки лікарської склала 262 г/м², що перевищувала контроль на 33 г/м². Найвищу продуктивність ромашки лікарської – 282 г/м² повітряно сухих суцвіть було отримано у варіанті передпосівного опромінення насіння при дозі передпосівного рентгенівського опромінення насіння 15 Гр, подальше підвищення дози опромінення дещо знижувало продуктивність культури. На контрольному варіанті, без опромінення, урожайність повітряно сухої сировини склала 229 г/м².

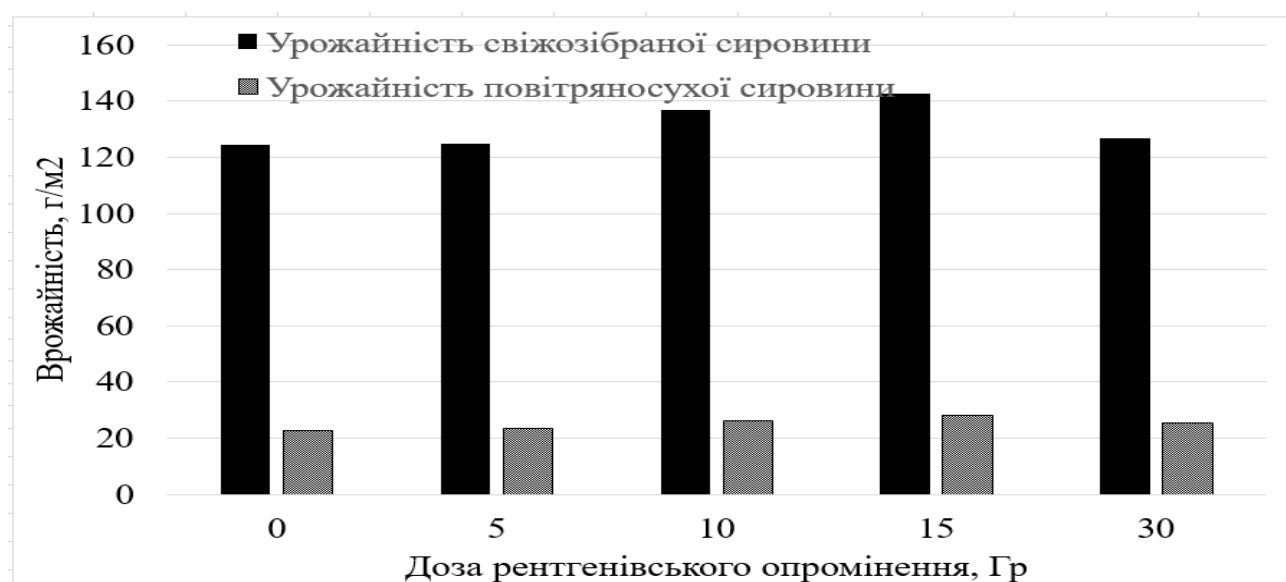


Рис. 6.1. Співвідношенні між свіжозібраною та повітряносухою фармацевтичною сировиною при рентгенівському передпосівному опроміненні *Matricaria chamomilla.*, сорт *Перлина лісостепу*, 2022

Спостерігалася тенденція щодо збільшення виходу повітряносухої сировини із свіжозібраної маси з підвищенням дози опромінення – вихід повітряносухої сировини на контролі складав 18,5 %, у варіанті із опроміненням при дозі 10 Гр він був 19,2 %, а з підвищенням дози до 30 Гр складав 20,2 % (Рис.6.1)

Ефірне масло виділяли шляхом перегонки з водяним паром з подальшим змивом із стінок приймача фіксованим об'ємом етилового спирту, як зазначено у розділі 2.

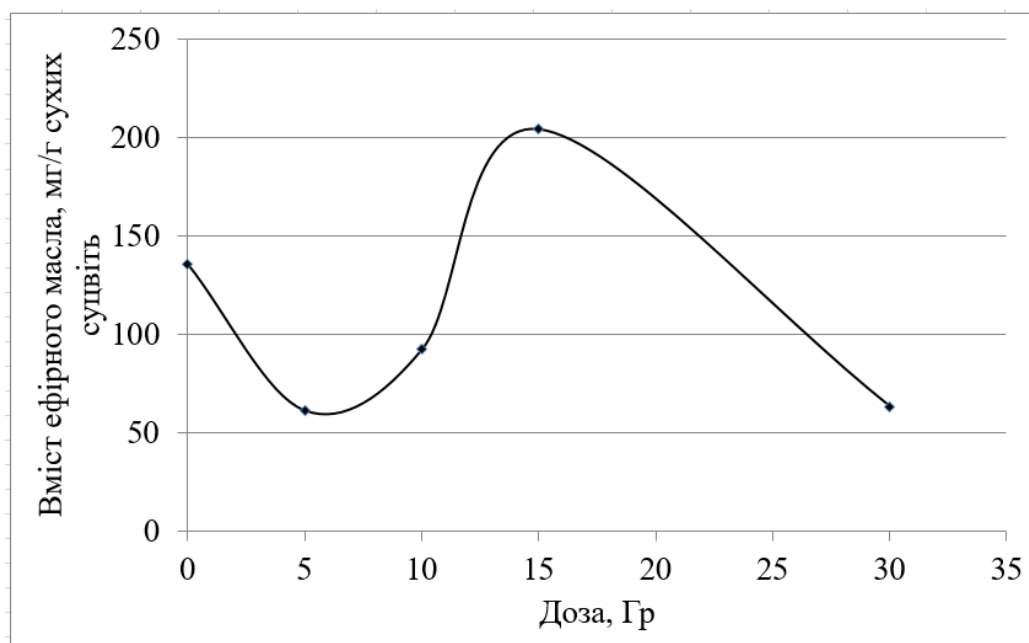


Рис. 6.2 Залежність від дози передпосівного рентгенівського опромінення насіння питомого вмісту ефірного масла у фармацевтичній сировині ромашки лікарської. За непараметричним критерієм Ван-дер-Вардена виявлено достовірні відмінності між значеннями всіх варіантів доз від контролю ($P \geq 0,95$).

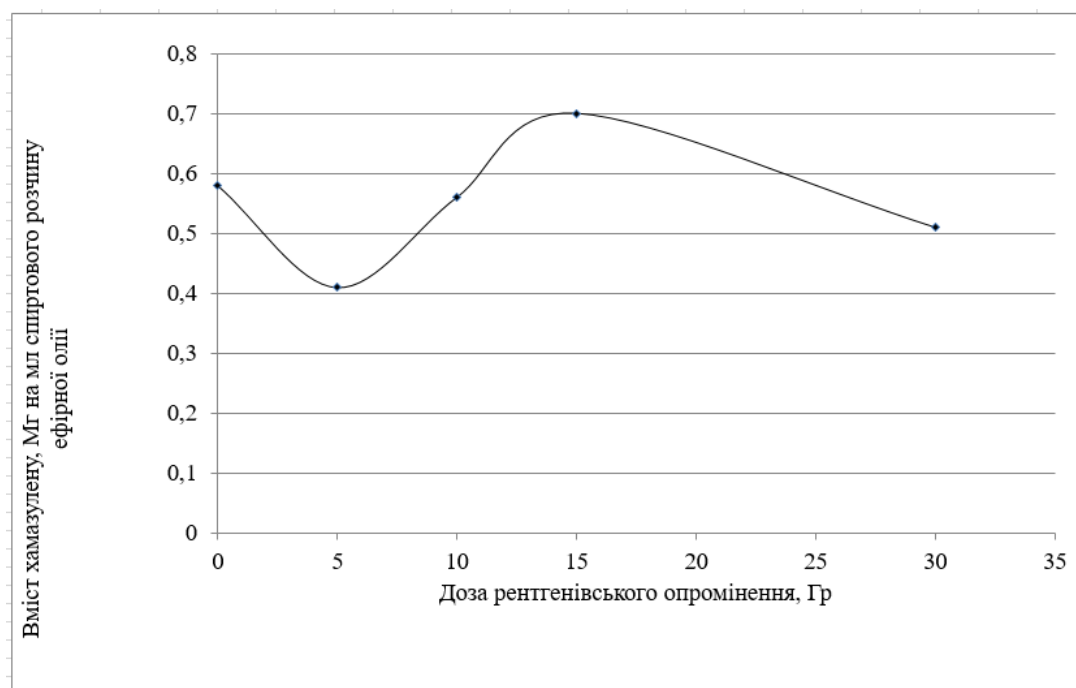


Рис.6.3 Дозова залежність питомого вмісту хамазулену у спиртовому розчині ефірної олії ромашки лікарської за умов рентгенівського передпосівного опромінення. За непараметричним критерієм Ван-дер-Вардена виявлено достовірні відмінності між значеннями всіх варіантів доз від контролю ($P \geq 0,95$).

При рентгенівському опроміненні спостерігається чітко виражена не лінійна і не монотонна дозова залежність виходу ефірної олії в суцвіттях ромашки та питомого вмісту хамазулену в цій олії. Це явище є типовим для діапазону малих доз.

Одержані результати свідчать про ефективність застосування рентгенівського опромінення для стимуляції синтезу та накопичення лікарськими рослинами не тільки добре відомих антиоксидантів, але й важливих поліфункціональних сполук, антиоксидантні властивості яких ще мало досліджені. Використання таких малих доз дозволяє підвищувати як врожайність суцвіть, що є фармацевтичною сировиною, так і питомий вміст власне лікарських сполук.

Протилежна картина змін у питомому вмісті хамазулена спостерігається при УФ-С передпосівному опроміненні ромашки.

На Рис. 6.4. показана діаграма вмісту хамазулену у спиртовому розчині ефірного масла ромашки, дослід з передпосівним опроміненням насіння ультрафіолетовим опроміненням. Спостерігається зниження вмісту хамазулена при підвищенні дози УФ-С опромінення.

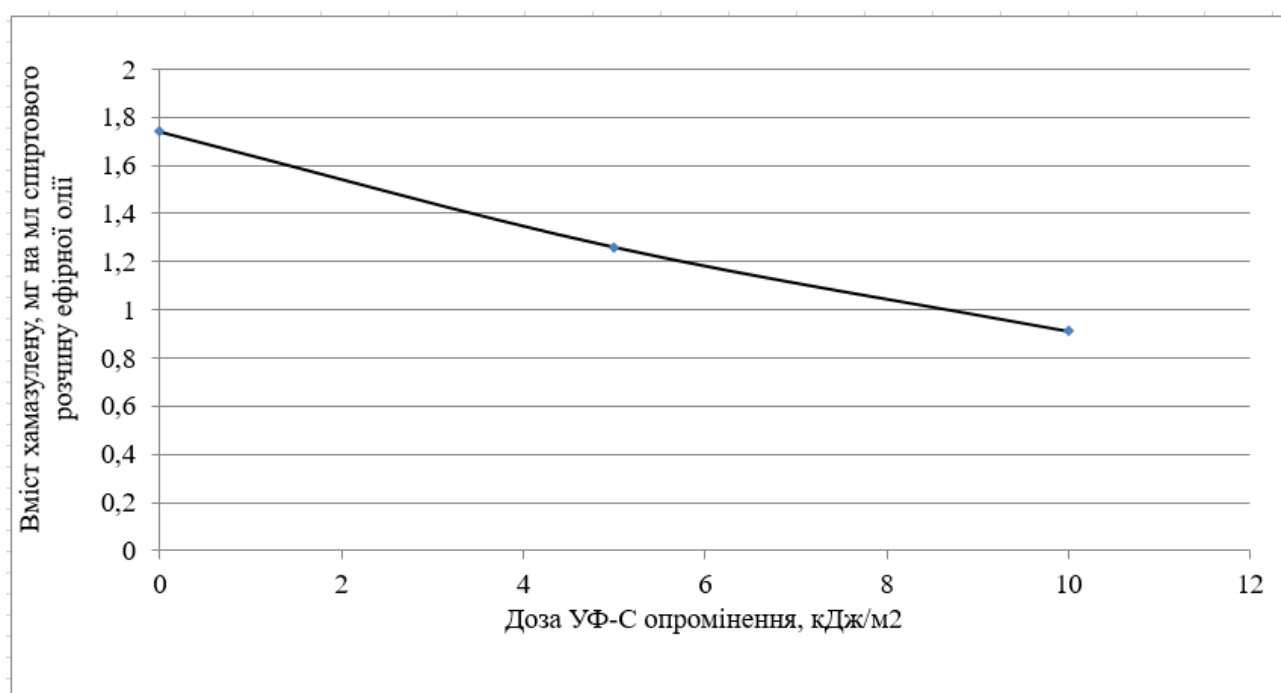


Рис.6.5 Вміст хамазулена в спиртовому розчині ефірного масла Ромашки Лікарської. Дослід з передпосівним УФ-С опроміненням насіння. За непараметричним критерієм Ван-дер-Вардена виявлено достовірні відмінності між значеннями всіх варіантів доз від контролю($P \geq 0,95$).

Проаналізуємо одержані результати з точки зору зв'язку із змінами у первинній структурі ДНК, які спостерігаються при двох типах опромінення.

Аналіз залежних від дози опромінення змін спектрів ампліконів [9] було проведено із використанням індексу подібності Жаккарда. Для дослід з рентгенівським опроміненням встановлено, що найбільші перебудови

первинної структури ДНК при проведенні ISSR-ПЛР і RAPD-ПЛР, що проявляється у зниженні подібності з контрольними спектрами ампліконів, спостерігаються при малій дозі опромінення в 5 Гр (табл. 6.1, 6.2). Виявлено тенденцію до наближення цього показника до контрольного варіанту при дозі опромінення 10 Грей у випадку ISSR-ПЛР, і при дозі в 15 Гр у випадку RAPD-ПЛР.

Для дослідів з УФ-С опроміненням спостерігається зниження індексу подібності Жаккарда між опроміненими і контрольним варіантами при підвищенні дози УФ-С опромінення (табл. 6.1, 6.2).

Табл. 6.1 Залежність від дози передпосівного рентгенівського опромінення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів при ISSR- ПЛР аналізі ДНК

	Контроль	5 Гр	10 Гр	15 Гр
Контроль	1	0.69	0.65	0.80
5 Гр		1	0.82	0.77
10 Гр			1	0.72
15 Гр				1

Табл. 6.2 Залежність від дози передпосівного рентгенівського опромінення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів при RAPD- ПЛР аналізі ДНК

	Контроль	5 Гр	10 Гр	15 Гр
Контроль	1	0.62	0,68	0.67
5 Гр		1	0,82	0.73

10 Гр			1	0.89
15 Гр				1

Табл. 6.3 Залежність від дози передпосівного УФ-С опромінення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів при RAPD-ПЛР аналізі ДНК

	Контроль	5кДж	10кДж	15кДж
Контроль	1	0.82	0.83	0.78
5кДж		1	0.67	0.85
10кДж			1	0.71
15кДж				1

Табл. 6.4 Залежність від дози передпосівного УФ-С опромінення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів при RAPD-ПЛР аналізі ДНК

	Контроль	5кДж	10кДж	15кДж
Контроль	1	0.94	0.74	0.89
5кДж		1	0.70	0.94
10кДж			1	0.74
15кДж				1

Виявлено зв'язок між вмістом хамазулену і ураженням ДНК при двох типах передпосівного опромінення ромашки лікарської. Разом з тим, результати УФ-С і рентгенівського опроміненні є практично протилежними.

Це не співпадає з даними дослідження стимуляції низькомолекулярних антиоксидантів – флавоноїдів та фенолу, дозові залежності стимуляції яких різняться, але загальні тенденції змін в залежності від рівня втрати нативності ДНК співпадають. Це свідчить про те, що флавоноїди та феноли відіграють універсальну роль як антиоксиданти на відміну від хамазулена.

При УФ –С опроміненні з падінням індексу подібності Жаккарда при підвищенні дози спостерігається і падіння вмісту хамазулену, тобто не відбувається стимуляція його нагромадження як антиоксиданта. Тільки у випадку рентгенівського опромінення, при малій дозі опромінення (5Гр) спостерігається падіння вмісту хамазулену, і падіння індексу подібності Жаккарда між опроміненим і контрольним варіантами. При підвищенні дози росте як вміст хамазулена, так і індекс подібності Жаккарда. Ці данні дозволяють припустити, що хамазулен може бути однією зі складових комплексу неспецифічних реакцій рослини на стрес, але його напрацювання є вузько специфічною реакцією лише на певні форми ушкодження ДНК та її первинну структуру. Таким чином відмінності у процесів стимуляції антиоксидантів при різних видах опромінення, що проявляються як при нагромадженні як фенолів, флавоноїдів, хамазулену пов'язані з конкретними процесами відновлення, які відбуваються в нанопросторі. Інакше кажучи, з існуванням певних зон нестійкості у самій первинній структурі ДНК. Це повертає нас до питання про природу існування ламких сайтів у первинній структурі ДНК.

У радіаційній біофізики неодноразово звертали увагу на не випадковий характер виникнення ламких сайтів у первинній структурі ДНК та їх біофізичної природи.

Тому нами було проведено статистичний аналіз зв'язку появи атипових ампліконів із нуклеотидним складом праймеру. Відмітимо, що висока і достовірна кореляція при всіх дозах опромінення спостерігається тільки при аналізі ISSR-праймерів, для яких характерна тандемна структура.

Табл 6.5 Коефіцієнт кореляції Пірсона між відсотком атипових ампліконів і вмістом нуклеотидів в праймері для Перлини Лісостепу і її Мутанту у випадку іонізуючого випромінювання, RAPD-ПЛР.

Коефіцієнт кореляції Пірсона між відсотком атипових ампліконів і вмістом нуклеотидів в праймері					Коефіцієнт кореляції Пірсона між відсотком атипових ампліконів і вмістом нуклеотидів в праймері				
	A	G	T	C		A	G	T	C
5Гр	0,33	0,06	0,01	-0,24	5Гр	0,11	-0,06	0,13	-0,07
10Гр	0,34	0,27	0,13	-0,46	10Гр	0,42	-0,17	-0,07	-0,46
15Гр	0,31	0,23	0,17	-0,43	15Гр	0,34	0,06	-0,01	-0,23

Табл 6.6 Коефіцієнт кореляції Пірсона між відсотком атипових ампліконів і вмістом нуклеотидів в праймері для Перлини Лісостепу і її Мутанту у випадку іонізуючого випромінювання, ISSR-ПЛР.

Коефіцієнт кореляції Пірсона між відсотком атипових ампліконів і вмістом нуклеотиду в праймері:					Коефіцієнт кореляції Пірсона між відсотком атипових ампліконів і вмістом нуклеотиду в праймері				
	A	G	T	C		A	G	T	C
5Гр	0,16	-0,13	-0,20	-0,53	5Гр	0,68	-0,18	-0,17	0,14
10Гр	0,52	-0,13	-0,50	0,15	10Гр	0,76	-0,36	-0,33	0,33
15Гр	0,34	0,40	0,20	-0,45	15Гр	0,60	0,00	-0,07	-0,06

Як свідчать проведені оцінки, висока і значима лінійна кореляція ($R, p \geq 0.95$) існує для відсотку аденіну, при дозі 10 Гр, та ($R, p \geq 0.90$) при дозі 5 Гр. При дозі 15 Гр спостерігається зниження коефіцієнту кореляції ($R = 0.60, p \geq 0.68$). За сучасними біофізичними даними [174] між аденіном і тиміном формуються два водневих зв'язки, в той час як між гуаніном і цитозином – три.

Таким чином локальна міцність ДНК контакту між ланцюгами ДНК є слабшою в зоні розташування аденіну, що підвищує вірогідність розриву при

радіаційному впливі. Далі [164,165] , відомо, що при формуванні нуклеосомних послідовностей найбільш енергетично вигідним є послідовності збачені аденином – тіміном (через кожні 10 пар нуклеотидів). Вони утворюють певний вигин первинної структури ДНК, що обумовлює зниження виникнення механічної напруги в цих ділянках. Цим, найбільш вирогідно, пояснюється виникнення розривів однититкової ДНК під час ПЛР і зупинки полімеразної реакції.

Це повертає нас до неодноразово обговорюваного у радіобіологічній літературі питання про існування «ламких» сайтів у первинній структурі ДНК та їх біофізичної природи.

За ідентичною до іонізуючого опромінення схемою було проведено аналіз зв'язку ламкості первинної структури ДНК із нуклеотидною послідовністю і для УФ-С опромінення. На табл 6.7 і 6.8 показано значення коефіцієнту кореляції Пірсона для RAPD-ПЛР і ISSR-ПЛР відповідно.

Табл. 6.7 Коефіцієнт кореляції між відсотком атипових ампліконів і вмістом нуклеотидів в праймері для Перлини Лісостепу і її Мутанту у випадку УФ-С випромінювання, RAPD-ПЛР

Коефіцієнт кореляції Пірсона (R) між відсотком атипових ампліконів і відносним вмістом нуклеотиду (%) у праймері:				
	A	G	T	C
5кДж/м ²	0,06	0,21	-0,25	-0,09
10кДж/м ²	-0,13	0,53	0,34	-0,49
15кДж/м ²	-0,25	-0,17	0,01	0,27

Коефіцієнт кореляції Пірсона (R) між відсотком атипових ампліконів і відносним вмістом нуклеотиду (%) у праймері:				
	A	G	T	C
5кДж/м ²	-0,36	0,06	0,11	0,10
10кДж/м ²	-0,04	0,08	0,15	-0,11
15кДж/м ²	0,12	-0,19	-0,13	0,14

Табл 6.8 Коефіцієнт кореляції між відсотком атипових ампліконів і вмістом нуклеотидів в праймері для Перлини Лісостепу і її мутанту у випадку УФ-С випромінювання, ISSR-ПЛР

Коефіцієнт кореляції Пірсона (R) між відсотком атипових ампліконів і відносним вмістом нуклеотиду (%) у праймері:					Коефіцієнт кореляції Пірсона (R) між відсотком атипових ампліконів і відносним вмістом нуклеотиду (%) у праймері:				
	A	G	T	C		A	G	T	C
5кДж/м ²	-0,16	-0,09	0,46	0,03	5кДж/м ²	0,18	-0,48	-0,35	0,53
10кДж/м ²	0,36	-0,44	-0,23	0,45	10кДж/м ²	-0,16	0,36	0,64	-0,46
15кДж/м ²	-0,09	-0,03	-0,21	0,08	15кДж/м ²	0,30	0,30	0,14	0,84

Як свідчать проведені оцінки, висока і значима лінійна кореляція (R, $p \geq 0.95$) для відсотку цитозина та (R, $p \geq 0.90$) для тиміну. Інакше кажучи, достовірний ефект спостерігається тільки для піримідинових основ при УФ-С опроміненні. Це може бути пов'язано з утворенням піримідинових дімерів, які спричиняють вигин, викривлення нуклеотидної послідовності ДНК, що приводить до зупинки полімеразної реакції під час ПЛР.

ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА. Одержані результати виявились дещо несподіваними відносно відсутності стимуляції нагромадження хамазулена у суцвіттах ромашки при передпосівному УФ-С опроміненні.

Разом з тим, результати свідчать про ефективність застосування рентгенівського опромінення для стимуляції напрацювання лікарськими рослинами не тільки добре відомих антиоксидантів, але й важливих протизапальних сполук, антиоксидантні властивості яких ще мало досліджені. В медичній практиці виявлено досить широкий спектр можливостей хамазулена у неврології, ендокринології, що зумовлює підвищення інтересу до дослідження цієї сполуки і розробки методів до підвищення його напрацювання у фармацевтичній сировині.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Проведене дослідження свідчить про існування значного впливу організації первинної структури ДНК і певних її послідовностей на стимуляцію захисних реакцій рослинного організму при різних видах опромінення. Розгляд одержаних результатів з точки зору виникнення віддалених ефектів при разовому опроміненні різної фізичної природи, дозволяє констатувати, що ключовим механізмом, який визначає відтерміновані у часі метаболічні перебудови у структурах, що не були опромінені безпосередньо, є підтримка геномної нестабільності. Ефект збереження геномної нестабільності на завершальній стадії онтогенезу рослини виявлено при передпосівному як іонізуючому, так і УФ-С опроміненні. Встановлено відмінності у формуванні антиоксидантного захисту при УФ-С і рентгенівському опроміненні, пов'язані з різною природою

первинних ушкоджень, а також з різною дозовою залежністю стимуляції індукцйбельної репарації.

Заключними висновками роботи будуть наступні:

1. Поліморфізм ДНК по RAPD мінісателітним послідовностям тісно асоціюється з різною стимуляцією врожайності фармацевтичної сировини (суцвіть) ромашки лікарської. Не виявлено чіткого зв'язку міні сателітного поліморфізму із специфікою реакції на опромінення по показнику стимуляції низькомолекулярних антиоксидантів;

2. Ключовим механізмом, що обумовлює віддалені ефекти разового радіаційного впливу є радіаційно – індукована геномна нестабільність;

3. Підвищення утворення вторинних метаболітів пов'язано із зниженням спорідненості первинної послідовності ДНК з її нативною первинною послідовністю і зникає при відновленні нативності геному;

4. Існує відмінність темпів і структури відновлювальних процесів у рослинному організмі при рентгенівському і УФ-С опроміненні. Відмічено переваги УФ-С опромінення для біотехнологічного застосування, що пов'язано з затримкою включення репаративних процесів і обумовлює більш широкий діапазон доз стимуляції синтезу антиоксидантів;

5. Встановлено значну стимуляцію синтезу хамазулена при рентгенівському опроміненні (10-15 Грей) та відсутність стимуляційного ефекту при УФ-С опроміненні. Виявлені ефекти можуть свідчити про різницю у метаболічних шляхах відновлення при різних видах первинного ураження ДНК.

6. Встановлено неспецифічність формування ламких сайтів, виникнення яких можливо як при генотоксичному впливі хімічних сполук, так і іонізуючому та УФ-С опроміненні, що може бути пов'язано з виникненням підвищеної механічної напруги в первинній структурі ДНК в сайтах збагачення аденіну (у випадку іонізуючого опромінення) і цитозина та тиміну (УФ-С).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. M.A. Coleman, E. Yin, L. E. Peterson et al. Low dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive responses. *Radiat. Res.* 2005. – Vol. 164, № 41. – P. 369 – 382.
2. Sokolova D. A. An Analysis of the Correlation between the Changes in Satellite DNA Methylation Patterns and Plant Cell Responses to the Stress . *CellBio.* 2013. – Vol. 2. – P. 163 – 171.
3. Кравец А.П., Соколова Д.А, Венгжен Г.С., Гродзинский Д.М. Влияние фракционированного УФ-С облучения на изменение профиля метилирования функционально различных последовательностей ДНК и выход нестабильных хромосомных aberrаций у проростков кукурузы. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2013. – Т. 43, №6. – С. 583 – 592
4. Danchenko M, Klubicova K, Rashydov N, Hajdich M. (2010) Proteome changes in mature seeds suggest adaptation toward chernobyl environment. *Febs J. Jun*: 277:278–278.
5. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730с.
6. Kravets A. P., Sokolova D. A.. Epigenetic factors of individual radiosensitivity and adaptive capacity. *International Journal of Radiation Biology*, 2020 - Vol. 96, - N 8 . – P. 999-1007
7. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. Наукова Думка. 1989р.
8. Шиліна Ю.В., Пчеловська С.В., Літвінов С.В. та ін. «Спосіб підвищення вмісту флавоноїдів в сировині лікарських рослин шляхом радіаційної передпосівної обробки насіння» (Патент на корисну модель № 129749, зареєстровано в Державному реєстрі патентів України) – 2018 р.

9. Sokolova D, Kravets A, Zhuk V, Sakada V, Gluschenko L & Kuchuk M. (2021) Productivity of medicinal raw materials by different genotypes of *Matricaria Chamomilla* L. is affected with pre-sowing radiation exposure of seeds. *International journal of Secondary metabolite*, 8(2): 127-135. <https://doi.org/10.21448/ijsm.889817>.
10. Zhuk V, Sokolova D, Kravets A et.al. (2021) Efficiency of pre-sowing seeds by UV-C and X-ray exposure on the accumulation of antioxidants in inflorescence of plants of *Matricaria chamomilla* L. genotypes. *International Journal of Secondary Metabolite*, 8(3): 186–194. <https://doi.org/10.21448/ijsm.889860>
11. Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews. Genetics* 5 (6):435–45. PMID 15153996. doi:10.1038/nrg1348.
12. Hemleben V, Beridze TG, Bakhman L (2003) Satellite DNA. *Uspehi Biol. Khimii* 43: 267-306.
13. Croft KD (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854 (1):435. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x>
14. Halliwell B (1999) Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning), *Free Radical Research* 31:261-72. doi: 10.1080/10715769900300841.
15. Khattak K, Simpson D. (2008) Effect of gamma irradiation on the extraction yield, total phenolic content and free radical-scavenging activity of *Nigella sativa* seed. *Food chemistry* 110 (4): 967-972. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.003.
16. Alothman M, Bhat R, Karim AA (2009) Effects of radiation processing on phytochemicals and antioxidants in plant produce/ *Trends in food science & technology* 20 (5):201-212. DOI : 10.1016/j.tifs.2009.02.003
17. Sumira J, Parween T, Siddiqi TO (2012) Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environmental Reviews*, 20 (1): 17-39 <https://doi.org/10.1139/a11-021>

18. Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr.Opin.Plant. Biol.*, 5: 218 - 223. DOI: 10.1016/s1369-5266(02)00256-x.
19. Aypar U, Morgan WF, Baulch JE (2010) Radiation-induced genomic instability: Are epigenetic mechanisms the missing link? *Int J Radiat Biol* 87(2):179-91. doi: 10.3109/09553002.2010.522686
20. Kim J-H, Ryu TH, Lee SS et al (2019) Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: An overview of DNA damage signalling and repair mechanisms in plants. *Plant Sci* 278:44-53. doi:10.1016/j.plantsci.2018.10.013
21. Durkin SG, Glover TW (2007) Chromosome Fragile Sites. *Chromosome Fragile Sites. Ann Rev Gen* 41:169-192 doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007,165900
22. Aguilera A, García-Muse T (2013) Causes of Genome Instability. *Ann Rev Gen* 47:1-32 doi:10.1146/annurev-genet-111212-133232
23. Ward, J. (1999). New paradigms for low-dose radiation response in proceedings of the American statistical association conference on radiation and health. *Radiation Research*, 151, 92e117.
24. Iyer, R., & Lehnert, B. E. (2000). Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells. *Biochemistry and Biophysics*, 376(1), 14e25.
25. Wright, E. G. (2000). Inducible genomic instability: new insights into the biological effects of ionizing radiation. *Medicine Conflict and Survival*, 16, 117e130.
26. Wolff, S. (1998). The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environmental Health Perspect*, 106, 277e283.
27. Joiner, M. C., et al. (2001). Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 49(2), 379e389.
28. Amundson, S. A., et al. (2001). Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation. *Radiation Research*, 156, 657e661.

29. Nagasawa, H., & Little, J. B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Research*, 52, 6394e6396.
30. Morgan, W. F., & Bair, W. J. (2013). Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective. *Radiation Research*, 179, 501e510.
31. Yang, H., Assad, N., & Held, K. D. (2005). Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene*, 24, 2096e2103.
32. Azzam, E. I., De Toledo, S. M., Spitz, D. R., & Little, J. B. (2002). Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alphaparticle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Research*, 62, 5436e5442.
33. Huo, L., Nagasawa, H., & Little, J. B. (2001). HPRT mutants induced in bystander cells by very low fluences of alpha particles result primarily from point mutations. *Radiation Research*, 156, 521e525.
34. Kashino G., Prise K. M., Schettino G., Folkard M. Vojnovic, B., Michael B. D., Suzuki K., Kodama S, Watanabe M., Evidence for induction of DNA double strand breaks in the bystander response to targeted soft X-rays in CHO cells, *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 556: 209e215.
35. Zhou, H., Randers -Pehrson, G., Waldren, C. A., Vannais, D., Hall, E. J., & Hei, T. K. (2000). Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 97, 2099e2104.
36. Limoli, C. L., & Giedzinski, E. (2003). Induction of chromosomal instability by chronic oxidative stress. *Neoplasia*, 5, 339e346.
37. Lorimore, S. A., Kadhim, M., Pocock, D. A., Papworth, D., Stevens, D. L., Goodhead, D. T., et al. (1998). Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after a-particle irradiation. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 95, 5730e5733.
38. Sawant, S. G., Randers-Pehrson, G., Geard, C. R., Brenner, D. J., & Hall, E. J. (2001). The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells,. *Radiation Research*, 155, 397e401.
39. Belyakov, O. V., Folkard, M., Mothersill, C., Prise, K. M., & Michael, B. D. (2002). Bystander induced apoptosis and premature differentiation in primary urothelial explants after charged particle microbeam irradiation. *Radiation Protection Dosimetry*, 99, 249e251.

40. Iyer, R., & Lehnert, B. E. (2000). Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells. *Biochemistry and Biophysics*, 376(1), 14e25.
41. Gerashchenko, B. I., & Howell, R. W. (2003). Flow cytometry as a strategy to study radiation-induced bystander effects in coculture systems. *Cytometry*, 54A, 1e7.
42. Koturbash, I., Zemp, F., Kolb, B., & Kovalchuk, O. (2011). Sexspecific radiation-induced microRNAome responses in the hippocampus, cerebellum and frontal cortex in a mouse model. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 722, 114e118.
43. Kovalchuk, O., Zemp, F. J., Filkowski, J. N., Altamirano, A. M., Dickey, J. S., Jenkins-Baker, G., et al. (2010). MicroRNAome changes in bystander three-dimensional human tissue models suggest priming of apoptotic pathways. *Carcinogenesis*, 31, 1882e1888.
44. Tominaga H, Kodama S, Matsuda N et al (2004) Involvement of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Induction of Genetic Instability by Radiation. *J Radiat Res*, 45(2):181-188. doi:10.1269/jrr.45.181
45. Szumiel I (2015) Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: the pivotal role of mitochondria. *Int J Radiat Biol* 91(1):1-12. doi:10.3109/09553002.2014.934929
46. Nikjoo, H., & Khvostunov, I. K. (2004). A theoretical approach to the role and critical issues associated with bystander effect in risk estimation. *Human & Experimental Toxicology*, 23, 81e86.
47. Azzam, E. I., de Toledo, S. M., & Little, J. B. (2001). direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 98, 473e478.
48. Dowling-Warriner, C. V., & Trosko, J. E. (2000). Induction of gap junctional intercellular communication, connexin43 expression, and subsequent differentiation in human fetal neuronal cells by stimulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience*, 95, 859e868.
49. Sokolov, M. V., Dickey, J. S., Bonner, W. M., & Sedelnikova, O. A. (2007). Gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. *Cell Cycle*, 6, 2210e2212.
50. Hussain, S. P., Hofseth, L. J., & Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3, 276e285.

51. Хемлебен В., Беридзе Т. Г., Бахман Л., Коварик Я., Торрес Р. Сателлитные ДНК // Успехи биологической химии. — 2003. — Т. 43. — С. 267—306
52. López-Flores I., Garrido-Ramos M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes // Garrido-Ramos M.A. Genome Dynamics. — 2012. — Т. 7. — С. 1—28. — ISBN 978-3-318-02149-3. — doi:10.1159/isbn.978-3-318-02150-9
53. Human Molecular Genetics by Tom Strachan, Andrew Read, p289
54. J. R. Lupski, G. M. Weinstock. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes (англ.) // American Society for Microbiology (англ.)рус.. — American Society for Microbiology (англ.)рус., 1992-7. — Vol. 174, iss. 14. — P. 4525—4529.
55. Singer MF (March 1982). "SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes". *Cell*. **28** (3): 433–4. doi:10.1016/0092-8674(82)90194-5. PMID 6280868. S2CID 22129236.
56. Jurka, J. (1998). "Repeats in genomic DNA: Mining and meaning". *Current Opinion in Structural Biology*. **8** (3): 333–337. doi:10.1016/S0959-440X(98)80067-5. PMID 9666329
57. Kapitonov VV, Tempel S, Jurka J (December 2009). "Simple and fast classification of non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequences". *Gene*. **448** (2): 207–13. doi:10.1016/j.gene.2009.07.019. PMC 2829327. PMID 19651192.
58. Heitkam T, Schmidt T (September 2009). "BNR - a LINE family from Beta vulgaris - contains a RRM domain in open reading frame 1 and defines a L1 sub-clade present in diverse plant genomes". *The Plant Journal*. **59** (6): 872–82. doi:10.1111/j.1365-3113.2009.03923.x. PMID 19473321.
59. Zupunski V, Gubensek F, Kordis D (October 2001). "Evolutionary dynamics and evolutionary history in the RTE clade of non-LTR retrotransposons". *Molecular Biology and Evolution*. **18** (10): 1849–63. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003727. PMID 11557792.
60. Komatsu M, Shimamoto K, Kyozuka J (August 2003). "Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice LINE-type retrotransposon Karma". *The Plant Cell*. **15** (8): 1934–44. doi:10.1105/tpc.011809. PMC 167180. PMID 12897263.
61. Heitkam T, Holtgräwe D, Dohm JC, Minoche AE, Himmelbauer H, Weisshaar B, et al. (August 2014). "Profiling of extensively diversified plant LINEs reveals distinct plant-specific subclades". *The Plant Journal*. **79** (3): 385–97. doi:10.1111/tpj.12565. PMID 24862340.

62. Smyshlyaev G, Voigt F, Blinov A, Barabas O, Novikova O (December 2013). "Acquisition of an Archaea-like ribonuclease H domain by plant L1 retrotransposons supports modular evolution". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **110** (50): 20140–
5. Bibcode:2013PNAS..11020140S. doi:10.1073/pnas.1310958110. PMC 3864347. PMID 24277848.
63. Novikova O, Fet V, Blinov A (February 2009). "Non-LTR retrotransposons in fungi". *Functional & Integrative Genomics*. **9** (1): 27–42. doi:10.1007/s10142-008-0093-8. PMID 18677522. S2CID 23319640.
64. Malik HS, Burke WD, Eickbush TH (June 1999). "The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements". *Molecular Biology and Evolution*. **16** (6): 793–805. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026164. PMID 10368957.
65. Hancks DC, Kazazian HH (June 2012). "Active human retrotransposons: variation and disease". *Current Opinion in Genetics & Development*. **22** (3): 191–203. doi:10.1016/j.gde.2012.02.006. PMC 3376660. PMID 22406018.
66. Vassetzky NS, Kramerov DA (January 2013). "SINEBase: a database and tool for SINE analysis". *Nucleic Acids Research*. **41** (Database issue): D83-9. doi:10.1093/nar/gks1263. PMC 3531059. PMID 23203982.
67. Sun FJ, Fleurdépine S, Bousquet-Antonelli C, Caetano-Anollés G, Deragon JM (January 2007). "Common evolutionary trends for SINE RNA structures". *Trends in Genetics*. **23** (1): 26–33. doi:10.1016/j.tig.2006.11.005. PMID 17126948.
68. V.L. Kretoich. *Plant Biochemistry* (Moscow: Vusha. Shkola, 1986). 497 p. (in Russian)
69. 2. Yu.B. Kudryashov. *Basic principles in radiobiology. Radiation biology. Radioecology* 41 (5) (2001) 531. (in Russian)
70. D. Treutter. *Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environ. Chem. Lett.* 4 (3) (2006) 147.
71. R. Mittler. *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.. Trends Plant Sci.* 7 (2002) 405.
72. K. Harrison & L. M. Were. *Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of almond skin extracts. Food Chemistry.* 102 (3) (2007) 932-937.

73. J. Dai & R. J. Mumper. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15 (10) (2010) 7313.
74. S. S. Moghaddam et al. Effects of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella asiatica*. *Molecules*, 16 (6) (2011) 4994.
75. S. Kaur & P. Mondal. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *J. Microbiol. Exp.* 1 (1) (2014) 1.
76. M. Sengul et al. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm Sci.* 22 (1) (2009). 102.
77. A.M. Kuzin. Structural and metabolic hypothesis in radiobiology (Moscow: Nauka, 1970) 221 p. (in Russian)
78. D.B. Little The unintended effects of ionizing radiation: conclusions regarding low-dose effects. *Radiat. biology. Radioecology.* 47 (3) (2007) 262. (in Russian)
79. A.P. Kravets, G.S., Wengzhen, D.M. Grodzinsky. Remote interaction of irradiated and unirradiated plants. *Radiation biology. Radioecology.* 49 (4) (2009) 490. (in Russian)
80. Noctor, G. and C.H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:249–279.,
81. Asada, K. 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:601–637.,
82. Smirnoff, N. and G.L. Wheeler. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19:267–290.,
83. Strzalka, K., G.A. Kostecka and D. Latowski. 2003. Carotenoids and environmental stress in plants: significance of carotenoid-mediated modulation of membrane physical properties. *Russ. J. Plant Physiol.* 50:168–172.
84. Dixon, R.A. and N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097.,

85. Grace, S.C. and B.A. Logan. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355:1499–1510.
86. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller and G. Paganga. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152–159.).
87. Attaguile, G., A. Russo, A. Campisi, F. Savoca, R. Acquaviva, N. Ragusa and A. Vanella. 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts of *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol. Toxicol.* 16:83–90.).
88. ^ Sancar A (June 2003). "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors". *Chemical Reviews*. **103** (6): 2203–37. doi:10.1021/cr0204348. PMID 12797829.
89. ^ Lucas-Lledó JI, Lynch M (May 2009). "Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family". *Molecular Biology and Evolution*. **26** (5): 1143–53. doi:10.1093/molbev/msp029. PMC 2668831. PMID 19228922.
90. ^ Jump up to:^{a b c} Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R (2004). *Molecular Biology of the Gene* (5th ed.). Pearson Benjamin Cummings; CSHL Press. Ch. 9, 10. OCLC 936762772.
91. ^ Jump up to:^{a b c} Willey J, Sherwood L, Woolverton C (2014). *Prescott's Microbiology*. New York: McGraw Hill. p. 381. ISBN 978-0-07-3402-40-6.
92. ^ Russell P (2018). *i Genetics*. Chennai: Pearson. p. 186. ISBN 978-93-325-7162-4.
93. ^ Jump up to:^{a b c d} Reardon JT, Sancar A (2006). "Purification and characterization of *Escherichia coli* and human nucleotide excision repair enzyme systems". *DNA Repair, Part A. Methods in Enzymology*. Vol. 408. pp. 189–213. doi:10.1016/S0076-6879(06)08012-8. ISBN 9780121828134. PMID 16793370.
94. Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR (July 1997). "Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining". *Nature*. **388** (6641): 495–
98. Bibcode:1997Natur.388..495W. doi:10.1038/41365. PMID 9242411. S2CID 4422938.
95. Wang L. et al. Allele-specific late replication and fragility of the most active common fragile site, FRA3B. *Human molecular genetics*. — 1999. — Vol. 8, no. 3. — P. 431-437.
96. Letessier A. et al. Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature*. – 2011. – V. 470. – №. 7332. – P. 120-123.

97. Sutherland BM, Bennett PV, Schenk H, et al. Clustered DNA damages induced by high and low LET radiation, including heavy ions. *Physica Medica : PM : an International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology : Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*. 2001 ;17 Suppl 1:202-204. PMID: 11776262.
98. Saha, G. B. (2013). *Radiation biology in physics and radiobiology of nuclear medicine*. New York: Springer Science & Business Media.
99. E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz, and T. Ellenberger, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, DC, USA, 2006.
100. R. P. Sinha and D.-P. Hader, "UV-induced DNA damage and repair: a review," *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 1, no. 4, pp. 225–236, 2002.
101. K. M. D. Lima-Bessa, M. G. Armelini, V. Chigancas et al., "CPDs and 6–4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells," *DNA Repair*, vol. 7, no. 2, pp. 303–312, 2008.
102. Y.-H. You, P. E. Szabo, and G. P. Pfeifer, "Cyclobutane pyrimidine dimers form preferentially at the major p53 mutational hotspot in UVB-induced mouse skin tumors," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 11, pp. 2113–2117, 2000.
103. J.-L. Ravanat, T. Douki, and J. Cadet, "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 63, no. 1–3, pp. 88–102, 2001.
104. J. Cadet, E. Sage, and T. Douki, "Ultraviolet radiation mediated damage to cellular DNA," *Mutation Research*, vol. 571, no. 1-2, pp. 3–17, 2005.
105. D. I. Pattison and M. J. Davies, "Actions of ultraviolet light on cellular structures," in *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, L. P. Bignold, Ed., Birkhauser, Switzerland, 2006.
106. J. S. Taylor, H. F. Lu, and J. J. Kotyk, "Quantitative conversion of the (6–4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 51, no. 2, pp. 161–167, 1990.
107. S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron et al., "Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes

exposed to UVB and UVA radiations,” *DNA Repair*, vol. 4, no. 7, pp. 836–844, 2005.

108. T. Carell and R. Epple, “Repair of UV light induced DNA lesions: a comparative study with model compounds,” *European Journal of Organic Chemistry*, no. 7, pp. 1245–1258, 1998.

109. T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, and E. Sage, “Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation,” *Biochemistry*, vol. 42, no. 30, pp. 9221–9226, 2003.

110. J. E. Donnellan Jr. and R. B. Setlow, “Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores,” *Science*, vol. 149, no. 3681, pp. 308–310, 1965. *Journal of Nucleic Acids* 23

111. M. M. Becker and Z. Wang, “Origin of ultraviolet damage in DNA,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 210, no. 3, pp. 429–438, 1989.

112. V. Lyamichev, “Unusual conformation of (dA)_n(dT)_n tracts as revealed by cyclobutane thymine-thymine dimer formation,” *Nucleic Acids Research*, vol. 19, no. 16, pp. 4491–4496, 1991.

113. J. R. Pehrson and L. H. Cohen, “Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation,” *Nucleic Acids Research*, vol. 20, no. 6, pp. 1321–1324, 1992.

114. A. Aboussekhra and F. Thoma, “TATA-binding protein promotes the selective formation of UV-induced (6–4)- photoproducts and modulates DNA repair in the TATA box,” *EMBO Journal*, vol. 18, no. 2, pp. 433–443, 1999.

115. T. Douki and J. Cadet, “Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions,” *Biochemistry*, vol. 40, no. 8, pp. 2495–2501, 2001.

116. A. S. Balajee and V. A. Bohr, “Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair,” *Gene*, vol. 250, no. 1-2, pp. 15–30, 2000.

117. J. M. Gale, K. A. Nissen, and M. J. Smerdon, “UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly

modulated with a period of 10.3 bases,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 19, pp. 6644–6648, 1987.

118. D. Perdiz, P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi, and E. Sage, “Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells: possible role of dewar photoproducts in solar mutagenesis,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 35, pp. 26732–26742, 2000.

119. E. Kvam and R. M. Tyrrell, “Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation,” *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 12, pp. 2379–2384, 1997.

120. S. N. Bose, R. J. H. Davies, S. K. Sethi, and J. A. McCloskey, “Formation of an adenine-thymine photoadduct in the deoxydinucleoside monophosphate d(TpA) and in DNA,” *Science*, vol. 220, no. 4598, pp. 723–725, 1983.

121. S. N. Bose and R. J. Davies, “The photoreactivity of T-A sequences in oligodeoxyribonucleotides and DNA,” *Nucleic Acids Research*, vol. 12, no. 20, pp. 7903–7914, 1984.

122. P. W. Doetsch, T. H. Zastawny, A. M. Martin, and M. Dizdaroglu, “Monomeric base damage products from adenine, guanine and thymine induced by exposure of DNA to ultraviolet radiation,” *Biochemistry*, vol. 34, pp. 737–742, 1995.

123. D. B. Hall, R. E. Holmlin, and J. K. Barton, “Oxidative DNA damage through long-range electron transfer,” *Nature*, vol. 382, no. 6593, pp. 731–735, 1996.

124. A. B. Britt, “Repair of DNA damage induced by solar UV,” *Photosynthesis Research*, vol. 81, no. 2, pp. 105–112, 2004.

125. T. Lindahl, “Instability and decay of the primary structure of DNA,” *Nature*, vol. 362, no. 6422, pp. 709–715, 1993.

126. K. McAteer, Y. Jing, J. Kao, J.-S. Taylor, and M. A. Kennedy, “Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-syn thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 282, no. 5, pp. 1013–1032, 1998.

127. J.-H. Lee, S.-H. Bae, and B.-S. Choi, “The Dewar photoproduct of thymidylyl(3 → 5)-thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in

accordance with the “A rule”,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 9, pp. 4591–4596, 2000.

128. M. Lukin and C. de los Santos, “NMR structures of damaged DNA,” *Chemical Reviews*, vol. 106, no. 2, pp. 607–686, 2006.

129. J.-H. Lee, G.-S. Hwang, J.-K. Kim, and B.-S. Choi, “The solution structure of DNA decamer duplex containing the Dewar product of thymidylyl(3 → 5)thymidine by NMR and full relaxation matrix refinement,” *FEBS Letters*, vol. 428, no. 3, pp. 269–274, 1998.

130. L.-S. Kan, L. Voituriez, and J. Cadet, “Nuclear magnetic resonance studies of Cis-Syn, Trans-Syn, and 6–4 photodimers of thymidylyl(3 –5)thymidine monophosphate and CisSyn photodimers of thymidylyl(3 –5)thymidine cyanoethyl phosphotriester,” *Biochemistry*, vol. 27, no. 15, pp. 5796– 5803, 1988.

131. S. N. Rao, J. W. Keepers, and P. Kollman, “The structure of d(CGCGAAT[]TCGCG)-d(CGCGAATTCGCG): the incorporation of a thymine photodimer into a B-DNA helix,” *Nucleic Acids Research*, vol. 12, no. 11, pp. 4789–4807, 1984.

132. A. E. Rumora, K. M. Kolodziejczak, A. M. Wagner, and M. E. Nu’nez, “Thymine dimer-induced structural changes to the ~ DNA duplex examined with reactive probes,” *Biochemistry*, vol. 47, no. 49, pp. 13026–13035, 2008.

133. D. A. Pearlman, S. R. Holbrook, D. H. Pirkle, and S.-H. Kim, “Molecular models for DNA damaged by photoreaction,” *Science*, vol. 227, no. 4692, pp. 1304–1308, 1985.

134. J.-K. Kim and B.-S. Choi, “The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6–4) photoproduct of thymidylyl(3 → 5)thymidine by NMR and relaxation matrix refinement,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 228, no. 3, pp. 849–854, 1995.

135. T. V. Wang and K. C. Smith, “Postreplication repair in ultraviolet-irradiated human fibroblasts: formation and repair of DNA double-strand breaks,” *Carcinogenesis*, vol. 7, no. 3, pp. 389–392, 1986.

136. T. A. Slieman and W. L. Nicholson, “Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus*

subtilis spore DNA,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 1, pp. 199–205, 2000.

137. C. Baumstark-Khan, U. Hentschel, Y. Nikandrova, J. Krug, and G. Horneck, “Fluorometric analysis of DNA unwinding (FADU) as a method for detecting repair-induced DNA strand breaks in UV-irradiated mammalian cells,” *Photochemistry and Photobiology*, vol. 72, no. 4, pp. 477–484, 2000.

138. R. P. Rastogi, S. P. Singh, D.-P. Hader, and R. P. Sinha, “Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidantsensing probe 2 ,7 -dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 397, no. 3, pp. 603–607, 2010.

139. C. L. Limoli, E. Giedzinski, W. M. Bonner, and J. E. Cleaver, “UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA doublestrand breaks, γ -H2AX formation, and Mre11 relocalization,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 1, pp. 233–238, 2002.

140. L. F. Z. Batista, B. Kaina, R. Meneghini, and C. F. M. Menck, “How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis,” *Mutation Research*, vol. 681, no. 2-3, pp. 197–208, 2009.

141. R. P. Rastogi, S. P. Singh, D.-P. Hader, and R. P. Sinha, “Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidantsensing probe 2 ,7 -dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 397, no. 3, pp. 603–607, 2010.

142. W. P. Roos and B. Kaina, “DNA damage-induced cell death by apoptosis,” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 12, no. 9, pp. 440–450, 2006.

143. M. M. Vilenchik and A. G. Knudson, “Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 22, pp. 12871–12876, 2003.

144. A. Takahashi and T. Ohnishi, "Does γ H2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks?" *Cancer Letters*, vol. 229, no. 2, pp. 171–179, 2005.

145. T. Ohnishi, E. Mori, and A. Takahashi, "DNA doublestrand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes," *Mutation Research*, vol. 669, no. 1-2, pp. 8–12, 2009.

146. D. Strumberg, A. A. Pilon, M. Smith, R. Hickey, L. Malkas, and Y. Pommier, "Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 11, pp. 3977–3987, 2000.

147. H. C. Box, J. B. Dawidzik, and E. E. Budzinski, "Free radicalinduced double lesions in DNA," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 31, no. 7, pp. 856–868, 2001.

148. J. P. Banath and P. L. Olive, "Expression of phosphorylated ' histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks," *Cancer Research*, vol. 63, no. 15, pp. 4347–4350, 2003.

149. J. V. Harper, J. A. Anderson, and P. O'Neill, "Radiation induced DNA DSBs: contribution from stalled replication forks?" *DNA Repair*, vol. 9, pp. 907–913, 2010.

150. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies / E. Pernot [et al.] // In: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. — 2012. — Vol. 751, № 2. — P. 258–286.

151. Ковалева, О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О. А. Ковалева // *Цитология и генетика*. — 2008. — Т. 42, № 1. — С. 58–72.

152. Лебедева, Л. И. Возможные механизмы возникновения перестроек хромосом. VI. Задержка митоза как протекторный механизм происхождения спонтанных разрывов хромосом / Л. И. Лебедева, С. В. Скорова, Е. М. Ахмаметьева // *Генетика*. — 1993. — Т. 29, № 4. — С. 1826–1831.

153. Georgakilas, A. G. Induction and Repair of Clustered DNA Lesions: What Do We Know So Far? / A. G. Georgakilas, P. O'Neill, R. D. Stewart // Radiat. Res. — 2013. — Vol. 180. — P. 100–109.

154. Collins, A. R. The Comet Assay for DNA / A. R. Collins // Damage and Repair Molecular Biotechnology. — 2004. — Vol. 26, Issue 3. — P. 249–261.

155. Langer-Safer, P. R.; Levine, M.; Ward, D. C. (1982). "Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes". Proceedings of the National Academy of Sciences. **79** (14): 4381–4381–
5. Bibcode:1982PNAS...79.4381L. doi:10.1073/pnas.79.14.4381. PMC 346675. PMID 6812046.

156. Amann, Rudolf; Fuchs, Bernhard M. (2008). "Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescent in situ hybridization techniques". Nature Reviews Microbiology. **6** (5): 339–348. doi:10.1038/nrmicro1888. PMID 18414500. S2CID 22498325.

157. Р.Н. Календарь, В.И. Глазко. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. Физиология и биохимия культ. Растений 2002. Т.43. №4.

158. Ismail Poyraz. Comparison of ITS, RAPD and ISSR from DNA-based genetic diversity techniques. C. R. Biologies 339 (2016) 171–178

159. Галич Т.В.. Зв'язок поліморфізму генотипів ромашки лікарської по issr- rapd- послідовностям днк та стійкості до іонізуючого та уф-с опромінення. Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики: матеріали Міжнародної наукової конференції, присвяченої 75-річчю Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. – 2021. – С. 54

160. Зв'язок чутливості до іонізуючого випромінювання з генетичним поліморфізмом *matricaria chamomilla*. Д. О. Соколова, Т.В. Галич, В. В. Жук. Матеріали XV-ї Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського.

161. Зв'язок чутливості до ультрафіолетового випромінювання з генетичним поліморфізмом *matricaria chamomilla*. Д. О. Соколова, Т.В. Галич, В. В. Жук. Матеріали XV-ї Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського

162. Connection between genetic polymorphism of *matricaria chamomilla* and sensitivity to various stressors. Sokolova D., Halych T., Zhuk V., Kravets O. The 5th Symposium on EuroAsian Biodiversity.-2021-P.213
163. Gaziev AI (2011) Low efficiency of repair of critical DNA damage caused by low doses of radiation. *Radiation Biology. Radioecology* 5:512-529
164. Teif VB, Shkrobkov AV, Egorova VP et al. (2012) Nucleosomes in generegulation: theoretical approach. *Molecular Biology*, 46 (6): 1-11. DOI: 10.1134/S002689331106015X
165. Teif VB (2015) Nucleosome positioning: resources and tools online. *Briefings in bioinformatics*, 17: 745 – 757. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv086>
166. IAEA. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. Thechnical reports. Series N 405 (2001). International Atomic Energy Agency, Vienna , 108 p. STI/DOC/010/40592-0-102101-1
167. Kumari S, Rastogi RP, Singh KL (2008) DNA damage: Detection strategies. *EXCLI Journal* 7: 44-62. ISSN 1611-2156
168. Rinne De Bont , Nik van Larebeke (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19
169. Pinto M, Prise KM, Michael BD (2005) Evidence for complexity at the nanometer scale of radiation-induced DNA DSBs as a determinant of rejoining kinetics. *Radiat Res* 164(1): 73-85.doi: 10.1667/rr3394.
170. Burlakova EB et al. (1999) Features of the biological effect of small doses of radiation. *Radiation. Biology. Radioecology* 39:26.(in Russian)
171. Kolomiytseva IB (2003) Non-monotonicity of the dose-effect relationship in the region of low
172. Tubiana M, Aurengo A, Auerbeck D (2006) Recent reports on the effect of low doses of ionizing radiation and its dose-effect relationship. *Radiat Environ Biophys.* 44:245–51. doi: 10.1007/s00411-006-0032-9

173. Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21: 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
174. Волькштейн, «Наука», Москва, 1975р.
175. Daryna A. Sokolova, Taras V. Halych, Vladyslav V. Zhuk & Alexandra P. Kravets (2023): Relationship of radiation-induced genomic instability and antioxidant production in the chamomile plant, *International Journal of Radiation Biology*, DOI: 10.1080/09553002.2023.2188934
176. Зв'язок стимуляції антиоксидантного захисту рослин із ознаками нестабільності геному. Д. О. Соколова, Т.В. Галич, В. В. Жук, О. П. Кравець ISSN 0564—3783. *Цитологія і генетика*. 2022. Т. 56. DOI: 10.3103/S0095452722050103 № 5
177. Eliseeva II, Rukavishnikov VO (1977) Grouping, correlation, pattern recognition: (statistical methods of classification and measurement of relationships). M.: Statistics: 143.
178. Taylor JS, Lu HF, Kotyk JJ. Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem Photobiol*. 1990 Feb;51(2):161-7. doi: 10.1111/j.1751-1097.1990.tb01698.x. PMID: 2333334.
179. J.-H. Lee, S.-H. Bae, and B.-S. Choi, “The Dewar photoproduct of thymidyl(3 → 5)-thymidine (Dewar product) exhibits mutagenic behavior in accordance with the “A rule”,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 9, pp. 4591–4596, 2000
180. D. I. Pattison and M. J. Davies, “Actions of ultraviolet light on cellular structures,” in *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, L. P. Bignold, Ed., Birkhauser, “ Switzerland, 2006.
181. J.-L. Ravanat, T. Douki, and J. Cadet, “Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 63, no. 1–3, pp. 88– 102, 2001.
182. Increasing the productivity of *matricaria chamomilla* by pre-sowing ultraviolet irradiation. Sokolova D., Halych T., Zhuk V., Kravets O. XV Міжнародна науково-практична конференція «Multidisciplinary academic notes. Science research and practice», 2022 p., С. 477-485.

183. The relationship of uv-c induced genomic instability with the content of antioxidants in pharmaceutical raw materials of plants. Sokolova D., Halych T., Zhuk V., Kravets O. XXVII Міжнародна науково-практична конференція «Multidisciplinary academic notes. Theory, methodology and practice», 12-15 липня 2022 р., Прага, Чехія. с. 54-57.

184. D. O. Sokolova, O. P. Kravets, V. V. Zhuk, V. I. Sakada 1, L. A. Gluschenko. Epigenetic factors of effect of uv-c and x-ray pre-sowing seeds. Radiation exposure in *matricaria chamomilla* l. Genotypes. International Journal of Secondary Metabolite. 2022, Vol. 9, No. 2, 127–135

185. Sharifi-Rad M, Nazaruk J, Polito L, Morais-Braga MFB, Rocha JE, Coutinho HDM, Salehi B, Tabanelli G, Montanari C, Del Mar Contreras M, Yousaf Z, Setzer WN, Verma DR, Martorell M, Sureda A, Sharifi-Rad J. Sharifi-Rad M, et al. *Matricaria* genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. Microbiol Res. 2018 Oct;215:76-88. doi: 10.1016/j.micres.2018.06.010. Epub 2018 Jun 25. Microbiol Res. 2018. PMID: 30172312 Review.

186. Capuzzo a.; Occhipinti a.; Maffei m.. Antioxidant and radical scavenging activities of chamazulene. NATURAL PRODUCT RESEARCH. 28 (24) pp: 2321-2323. DOI: 10.1080/14786419.2014.931393

187. Ornano L, Venditti A, Ballero M, Sanna C, Quassinti L, Bramucci M, Lupidi G, Papa F, Vittori S, Maggi F, Bianco A. Ornano L, et al. Chemopreventive and antioxidant activity of the chamazulene-rich essential oil obtained from *Artemisia arborescens* L. growing on the Isle of La Maddalena // Chem Biodivers. 2013 Aug;10(8):1464-74. doi: 10.1002/cbdv.201200435. Chem Biodivers. 2013. PMID: 23939794

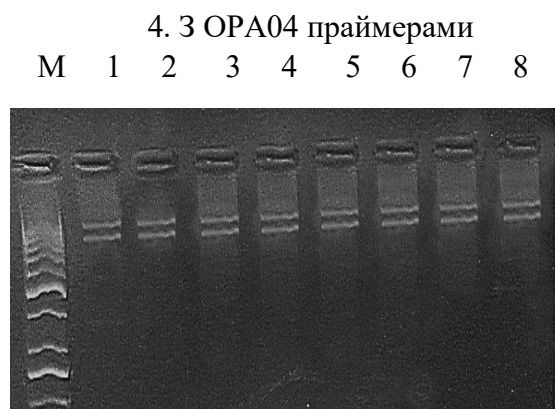
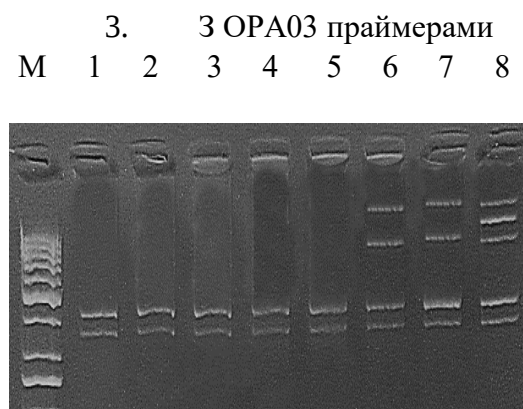
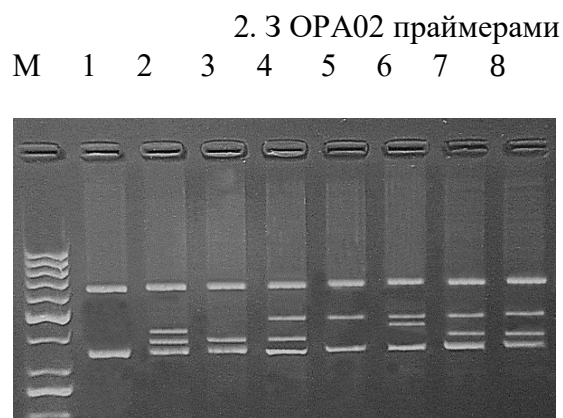
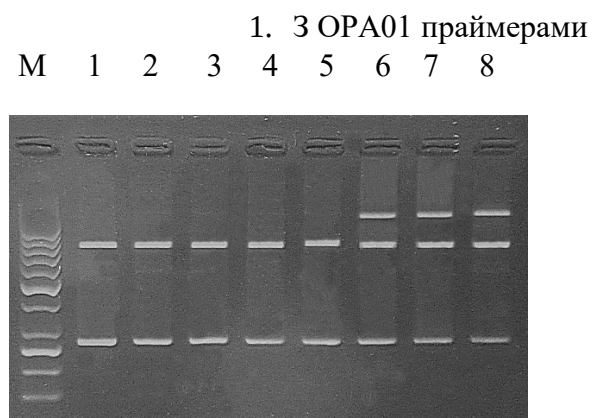
188. Wang X, Dong K, Ma Y, Jin Q, Yin S, Wang S. Wang X, et al. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. Open Life Sci. 2020 Apr 20;15(1):251-258. doi: 10.1515/biol-2020-0026. eCollection 2020. Open Life Sci. 2020. PMID: 33817213 Free PMC article.

189. Marinas IC, Oprea E, Gaboreanu DM, Gradisteanu Pircalabioru G, Buleandra M, Nagoda E, Badea IA, Chifiriuc MC. Marinas IC, et al. Chamomile as a potential remedy for obesity and metabolic syndrome. Antibiotics (Basel). 2023 Feb 10;12(2):371. doi: 10.3390/antibiotics12020371. Antibiotics (Basel). 2023. PMID: 36830282 Free PMC article.

Додаток до РОЗДІЛУ 3. Оцінка мінісателітного поліморфізму 8 генотипів ромашки лікарської



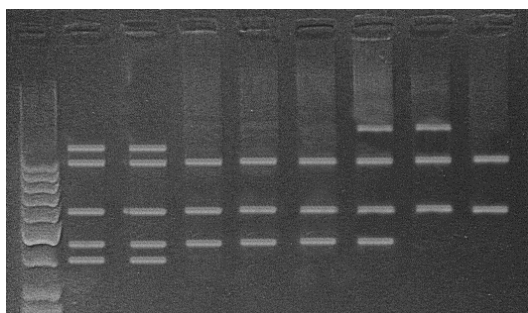
Рис. 1 Додаток. Контроль нативності виділеної ДНК



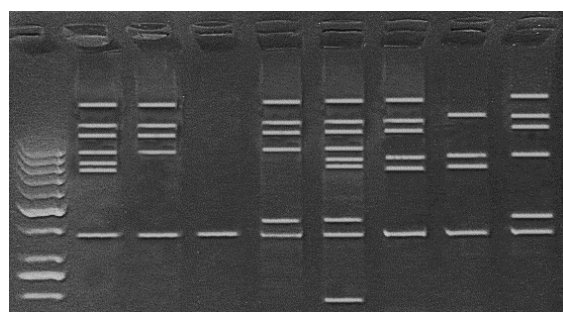
5. 3 ОРА05 праймерами

6. 3 ОРА06 праймерами

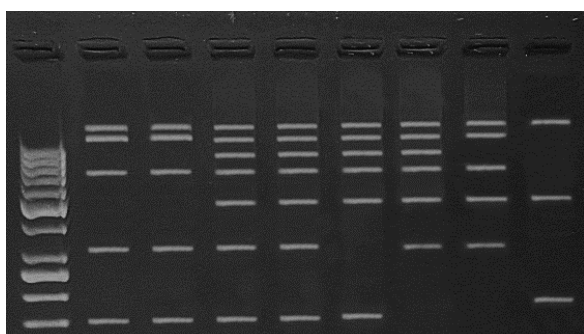
M 1 2 3 4 5 6 7 8



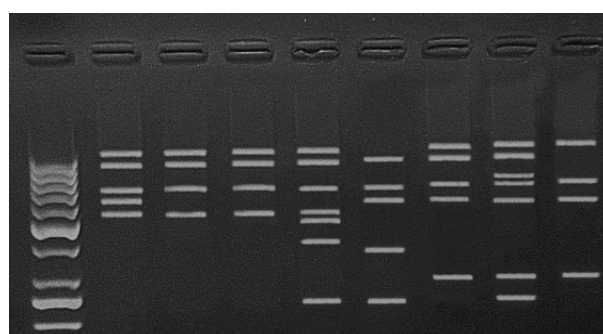
M 1 2 3 4 5 6 7 8



7. 3 OPA07 праймерами
M 1 2 3 4 5 6 7 8



8. 3 OPA08 праймерами
M 1 2 3 4 5 6 7 8



9. 3 OPA09 праймерами
M 1 2 3 4 5 6 7 8



10. 3 OPA10 праймерами
M 1 2 3 4 5 6 7 8

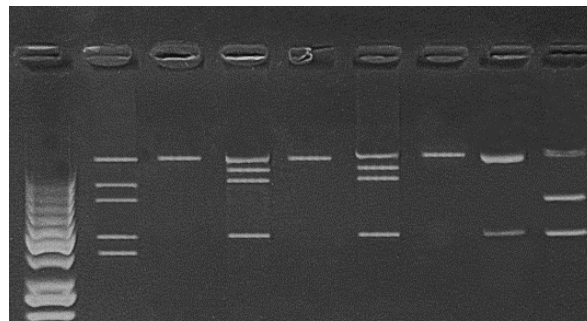
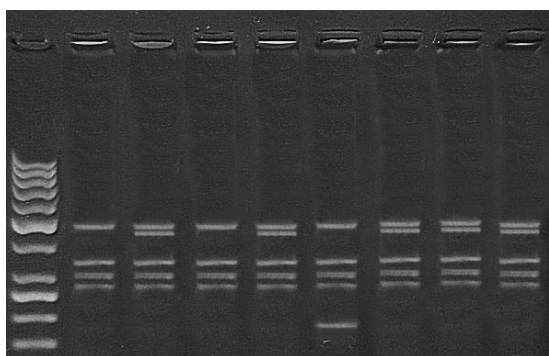


Рис. 2_у додатку. Електрофореграми, отримані при проведенні ПЛР з використанням RAPD-маркерів. 1- Мутант Перлини лісостепу; 2- Кведлінбург; 3- Горал; 4-Азулена; 5- Златий лан; 6- Перлина лісостепу; 7- Golden Garden; 8- Seed Era

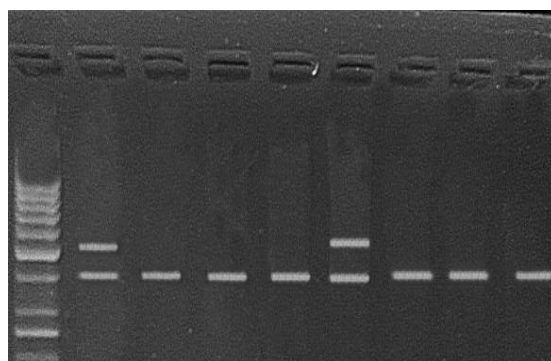
11. 3 ISSR05 праймерами

М 1 2 3 4 5 6 7 8



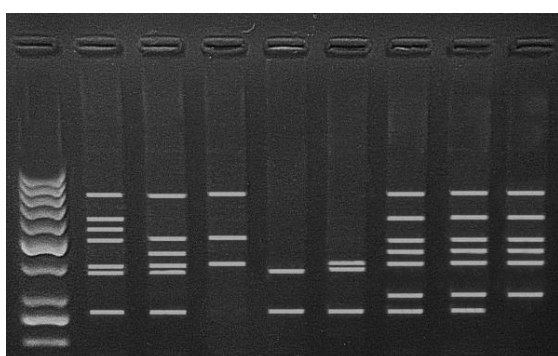
12. 3 ISSR807 праймерами

М 1 2 3 4 5 6 7 8



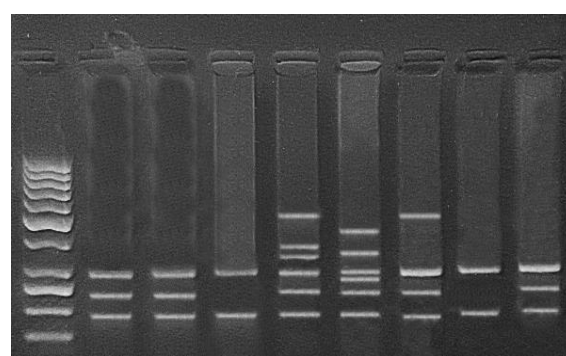
13. 3 ISSR810 праймерами

М 1 2 3 4 5 6 7 8



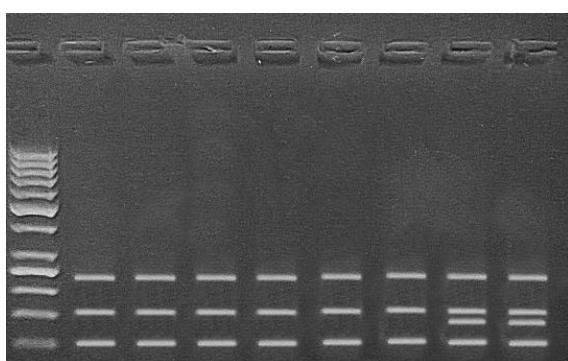
14. 3 ISSR825 праймерами

М 1 2 3 4 5 6 7 8



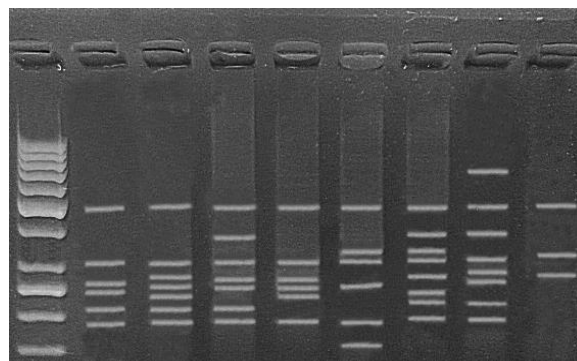
15. 3 ISSR842 праймерами

М 1 2 3 4 5 6 7 8



16. 3 ISSR826 праймерами

М 1 2 3 4 5 6 7 8



17. 3 ISSR24 праймерами

18. 3 ISSR834 праймерами

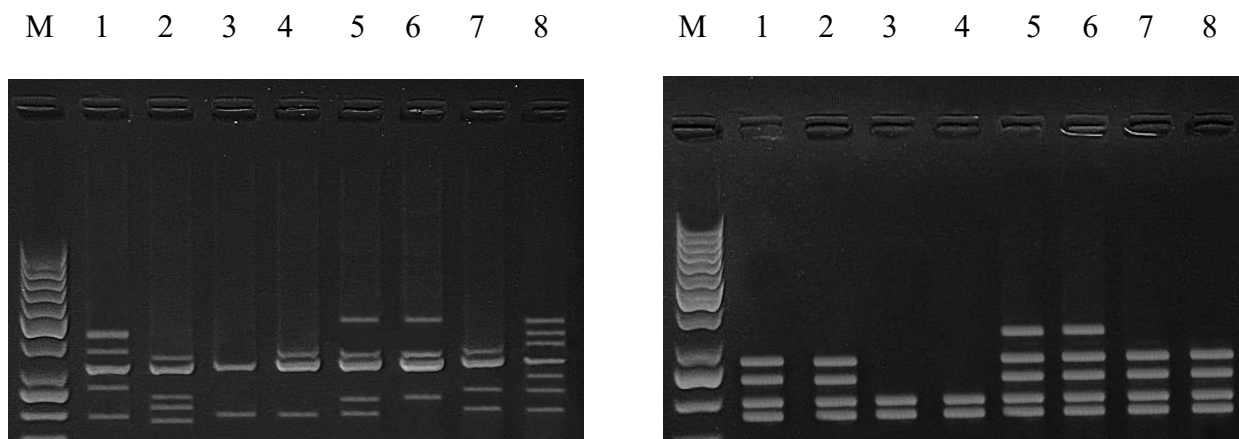


Рис. 3 у Додатку. Електрофореграми, отримані при проведенні ПЛР з використанням ISSR-маркерів 1- Мутант Перлини лісостепу; 2- Кведлінбург; 3- Горал; 4-Азулена; 5- Златий лан; 6- Перлина лісостепу; 7- Golden Garden; 8- Seed Era

Таблиця довжин ампліконів отриманих при проведенні ПЛР з використанням RAPD-маркерів

	Мутант Перлини лісостепу	Кведлінбург	Горал	Азулена	Златий Лан	Перлина Лісостепу	Golden Garden	Seed Era
ОРА 01	900, 275	900, 275	900, 275	900, 275	900, 275	1100, 900, 275	1100, 900, 275	1100, 900, 275
ОРА 02	675, 350	675, 450, 400, 350	675, 400, 350	675, 500, 400, 350	675, 500, 350	675, 500, 475, 350	675, 500, 400, 350	675, 500, 400, 350
ОРА 03	450, 375	450, 375	450, 375	450, 375	450, 375	1100, 900, 450, 375	1100, 900, 450, 375	1100, 1000, 900, 450, 375
ОРА 04	1000, 900	1000, 900	1000, 900	1000, 900	1000, 900	1000, 900	1000, 900	1000, 900
ОРА 05	1100, 1000, 560, 500, 400	1100, 1000, 560, 500, 400	1000, 650, 500	1000, 650, 500	1000, 650, 500	1200, 1000, 650, 500	1200, 1000, 650	1000, 650

ОРА 06	1400, 1250, 1200, 1000, 900, 800, 400	1400, 1250, 1200, 1000, 400	400	1400, 1250, 1200, 1000, 450, 400	1400, 1250, 1200, 1000, 900, 800, 450, 400, 200	1400, 1250, 1200, 900, 800, 400	1300, 900, 800, 400	1400, 1250, 1200, 900, 450, 400
ОРА 07	1150, 1100, 800, 350, 150	1150, 1100, 800, 350, 150	1150, 1100, 900, 800, 550, 350, 150	1150, 1100, 900, 800, 550, 350, 150	1150, 1100, 900, 800, 550, 150	1150, 1100, 900, 800, 550, 350	1150, 1100, 800, 550, 350	1150, 550, 200
ОРА 08	1100, 1000, 800, 700, 600	1100, 1000, 800, 600	1100, 1000, 800, 600	1100, 1000, 800, 600, 550, 450, 250	1000, 800, 700, 400, 250	1100, 1000, 800, 700, 300	1100, 1000, 850, 800, 700, 300, 250	1100, 800, 700, 300
ОРА 09	1000, 750	1000, 750, 450, 275, 150, 100	1000, 750, 450, 275	1000, 750, 450, 275	1000, 750	1000, 750	1000, 750	1000, 750
ОРА 10	1150, 1000, 900, 600, 500	1150	1150, 1100, 1000, 600	1150	1150, 1100, 1000, 600	1150	1150, 600	1150, 900, 600

Таблиця довжин ампліконів отриманих при проведенні ПЛР з використанням ISSR-маркерів

	Мутант Перлини лісостепу	Кведлінбург	Горал	Азулена	Златий Лан	Перлина Лісостепу	Golden Garden	Seed Era
ISSR 05	500, 350, 300, 275	500, 475, 350, 300, 275	500, 350, 300, 275	500, 475, 350, 300, 275	500, 350, 300, 275, 175	500, 475, 350, 300, 275	500, 475, 350, 300, 275	500, 475, 350, 300, 275
ISSR 807	550, 400	400	400	400	550, 400	400	400	400

ISSR 810	900, 650, 600, 550, 425, 400, 275	900, 550, 450, 425, 400, 275	900, 550, 425	400, 275	425, 400, 275	900, 650, 550, 450, 425, 325, 275	900, 650, 550, 450, 425, 325, 275	900, 650, 550, 450, 425, 325
ISSR 825	300, 250, 200	300, 250, 200	300, 200	550, 400, 350, 300, 250, 200	500, 350, 300, 275, 250, 200	550, 300, 250, 200	300, 200	300, 250, 200
ISSR 842	250, 150, 100	250, 150, 100	250, 150, 100	250, 150, 100	250, 150, 100	250, 150, 100	250, 150, 140, 100	250, 150, 140, 100
ISSR 826	500, 300, 275, 250, 225, 175	500, 300, 275, 250, 225, 175	500, 375, 300, 275, 250, 225, 175	500, 300, 275, 250, 240, 175	500, 350, 300, 250, 175, 150	550, 300, 250, 200	300, 200	300, 250, 200
ISSR 24	500, 400, 350, 275, 200	375, 350, 250, 225, 175	350, 200	375, 350, 250	600, 375, 350, 250, 200	600, 375, 350, 250	375, 350, 275, 225	600, 500, 450, 350, 325, 275, 225
ISSR 834	300, 250, 200, 175	300, 250, 200, 175	200, 175	200, 175	375, 300, 250, 200, 175	375, 300, 250, 200, 175	300, 250, 200, 175	300, 250, 200, 175