

Національна академія наук України
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Літвінов Сергій В'ячеславович

УДК 577.39 [58.084.1]:577.391:577.346:577.21:575.175:575.224.22

ДИСЕРТАЦІЯ
ЗВ'ЯЗОК ТРАНСКРИПЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ КЛЮЧОВИХ ГЕНІВ
РЕПАРАЦІЇ ДНК З ПОСТРАДІАЦІЙНИМ ВІДНОВЛЕННЯМ РОСЛИН

03.00.01 – радіобіологія

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
(доктора філософії)

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

Літвінов С.В.

Науковий керівник
Рашидов Намік Мамед огли
доктор біологічних наук
старший науковий співробітник

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Літвінов С. В. Зв'язок транскрипційної активності ключових генів репарації ДНК з пострадіаційним відновленням рослин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.01 радіобіологія (091 – Біологія).

Місце виконання: Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, м. Київ.

Захист відбудеться у спеціалізованій вченій раді К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, м. Київ, 2019.

У дисертаційному дослідженні показано кореляційний зв'язок індукованої радіацією транскрипційної відповіді основних генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMsh2* з ефективністю пострадіаційного відновлення опромінених рослин на рівні цілісного організму (коефіцієнти кореляції Пірсона в інтервалі від $r = 0,6$ до $r = 0,9$, $p < 0,05$). Цей зв'язок проявлявся у діапазоні доз радіації 0,2 Гр – 21,0 Гр, залежав від режиму опромінення та був характерний не тільки для опромінених рослин, але і для нащадків цих рослин покоління F_1 , які не зазнали дії радіації. Найвищі коефіцієнти кореляції для більшості морфометричних показників опромінених рослин з ранніми змінами експресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у тканинах розеткових листків арабідопсису спостерігалися при повторюваному опроміненні.

Іонізуюче опромінення рослин арабідопсису у сублетальних дозах 0,2 Гр – 21 Гр призводило як до середньо-, так і довгострокових ефектів, серед яких: стимуляція росту рослин у довжину, галуження стебла, активація бічних стеблових і квіткових бруньок, кушіння, поява рослин з морфозами та зміненим фенотипом, а також таких рослин, розвиток яких тимчасово зупинявся, стимуляція або пригнічення цвітіння, скорочення або подовження терміну

вегетації. Стимулюючий вплив був більшою мірою характерний для одноразового опромінення у порівнянні з повторюваним та хронічним.

До зкорельованих з ранньою транскрипційною відповіддю параметрів належали: тимчасова або термінальна зупинка росту, поява морфологічних аномалій, стерильність, приріст і галуження стебла, накопичення біомаси. Виявлені кореляції відображають залежність морфометричних параметрів опромінених рослин від зміни активності досліджуваних генів як складової реакції клітин на пошкодження геному.

Дозові залежності ранньої транскрипційної відповіді генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на дію рідкоіонізуючої радіації у сублетальних дозах носили нелінійний характер та відображали як стимуляцію, так і супресію активності генів репарації ДНК у відповідь на рентгенівське опромінення. В той час як при дозах 3 Гр – 9 Гр мала місце підвищена сумарна експресія генів *AtKu70* та *AtRAD51*, поряд із зниженою експресією гена *AtRad1*, при дозі опромінення 12 Гр активність генів *AtKu70* і *AtRAD51* була репресована, а транскрипція гена *AtRad1* навпаки суттєво підвищена у порівнянні з неопроміненим контролем. Одноразове опромінення у дозі 3 Гр та 21 Гр більш ефективно індукувало експресію генів *AtKu70* і *AtRAD51* у порівнянні з повторюваним (фракціонованим), але при інших дозах ефективність індукції для режиму повторюваного опромінення в цілому була співставною або вищою, ніж для одноразового. Характер отриманих дозових залежностей ранньої транскрипційної відповіді генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* вказує на наявність у тканинах опромінених рослин двох субпопуляцій клітин – радіочутливої та радіостійкої.

Активність гена *AtKu70* позитивно корелювала з приростом рослин та накопиченням біомаси після фракціонованого опромінення, в той час як активність гена *AtRad1* була позитивно зкорельована із затримкою або зупинкою розвитку, порушеннями морфогенезу, стерильністю опромінених рослин. Також була встановлена від'ємна кореляція транскрипції гена *AtRAD51* з появою морфологічних аномалій.

Було з'ясовано, що наявність або відсутність у геномі арабідопсису функціонуючого гена *Atmsh2* не впливає на ранню транскрипційну відповідь генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*. Встановлено, що мутанти *Atmsh2*^{-/-} більш чутливі до дії тільки одноразового, але не повторюваного та хронічного іонізуючого опромінення у сублетальних дозах у порівнянні з *Atmsh2*^{+/+} рослинами. Була продемонстрована самостійна роль гена *Atmsh2* у пострадіаційній репарації ДНК, а також його взаємодія з генами *AtKu70* та *AtRad1*. Підвищений після повторюваного опромінення рівень експресії *AtKu70* послаблював пригнічувальний вплив радіації на накопичення біомаси мутантами *Atmsh2*^{-/-}, як і знижений відносно неопроміненого контролю рівень експресії *AtRad1*. Ці ж особливості властиві і для рослин дикого типу, проте коефіцієнти кореляції Пірсона для пар ознак «біомаса надземної частини – транскрипційна активність гена» було статистично достовірно вищі для мутантних рослин *Atmsh2*^{-/-}. Таким чином, взаємодія різних шляхів репарації ДНК дозволяє системам індукцибельної репарації видаляти пошкодження, що виникають внаслідок відсутності MMR-репарації помилково спарених нуклеотидів у мутантів *Atmsh2*^{-/-} під дією повторюваного та хронічного опромінення. Це дає підстави говорити про компенсаторну роль індукцибельної репарації та її функцію по зниженню мутаційного рівня (мутант *Atmsh2*^{-/-} є моделлю швидкого накопичення мутацій у геномі та зростання генетичного тягаря, так званого мутаторного фенотипу).

Індуковані опроміненням зміни активності генів *AtRAD51* і *AtRad1* позначалися на життєздатності та варіативності морфометичних ознак неопромінених рослин, які були нащадками опромінених – активність гена *AtRAD51* сприяла збільшенню схожості та виживаності проростків F₁, активність *AtRad1* – навпаки.

Показано, що підвищена після опромінення у сублетальних дозах експресія генів *AtRAD51* та *AtRad1* могла зберігатись у нащадків першого покоління, в той час як індукована активність *AtKu70* – ні. Успадкування підвищеної активності гена *AtRad1* була пов'язана із зростанням у першому

пострадіаційному поколінні частки рослин, що мали морфологічні аномалії, в порівнянні з неопроміненим контролем.

Вперше виявлено явище радіаційної репресії репаративних генів при дозах 6-15 Гр одноразового та повторюваного опромінення рентгенівськими променями, а також появу вкорочених форм мРНК фактору репарації дволанцюгових розривів ДНК *AtKu70* при одноразовому опроміненні в дозі 9 Гр та одного з основних генів домашнього господарства *AtErf1a* при повторюваному опроміненні дозою 5 Гр + 5 Гр + 5 Гр, що може впливати на формування радіобіологічної реакції пригнічення росту та розвитку рослин. Поряд із дозою 12 Гр, яка зумовлювала зниження експресії генів *AtRAD51* та *AtKu70*, що забезпечують цілісність хроматид і хромосом, в інтервалі сублетальних доз опромінення спостерігалися два локальних максимума експресії даних генів при дозах 3-6 Гр та 21 Гр відповідно. На наш погляд, це підтверджує гетерогенність рослинних тканин, які складаються з пулу активних радіочутливих клітин та пулу радіостійких клітин, що знаходяться у стані спокою. Перший пік активації генів репарації ДНК відповідає індукції досліджуваних генів. У цьому ж дозовому інтервалі у 2-2,5 рази знижувалася транскрипційна активність гена «домашнього господарства» *AtErf1a*. Радіаційне ураження радіочутливих клітин здатне активувати пул радіостійких клітин, стан спокою яких підтримується завдяки активності радіочутливих клітин. Тому при дозі 21 Гр спостерігався другий пік індукційної репарації ДНК – транскрипційний максимум індукційних генів репарації ДНК у клітинах субпопуляції радіорезистентних клітин. Можна припустити, що перший пік стимуляції на двохпікових дозових залежностях морфометричних ознак рослин відповідає індукції систем репарації ДНК, а другий – стимуляції меристем внаслідок активації їх клітинного резерву. Проте і в першому, і в другому випадку транскрипція генів репарації ДНК та підтримки стабільності геному є важливим чинником забезпечення повноцінного пострадіаційного відновлення на молекулярному, клітинному, тканинному та організменому рівнях.

При фракціонованому (повторюваному) опроміненні був сильніше виражений пригнічувальний ефект радіації на пострадіаційний розвиток рослин дослідних варіантів. Також виявлено значне (у 1,5 і більше разів) підвищення транскрипційної активності генів *AtRad1* та особливо *AtRAD51* у листках рослин, хронічно опромінених малими дозами γ -радіації (0,2 Гр та 0,3 Гр протягом 35 і 7 діб відповідно). При цьому спостерігались радіобіологічні ефекти, кількісно та якісно співставні з ефектами, що були зафіксовані у рослин арабідопсису, гостро опромінених на порядок більшими дозами. Зазначені факти дають підставу припустити, що висока біологічна ефективність повторюваного та хронічного рідкоіонізуючого опромінення частково зумовлена впливом ініційованих радіацією змін активності систем репарації ДНК.

На межі інтервалу сублетальних доз (21 Гр), незважаючи на другий пік активації ключових генів репарації ДР ДНК *AtKu70* та *AtRAD51*, відбувалася масштабна деградація нуклеїнових кислот у клітинах листків рослин через 30 діб після опромінення, що проявлялося у зниженні їх вмісту у тканинах більше, ніж у 5 разів. У листках опромінених рослин різко знижувався вміст протеїнів та ліпідів, зростало співвідношення бета-структурних і альфа-спіральних доменів білків, руйнувався хлорофіл, накопичувалися пурпурово-фіолетові пігменти, відбувалося заміщення пектину та лігніну целюлозою й геміцелюлозою, акумулювався крохмаль, спостерігалися модифікації складу жирних кислот кутину. Це підтверджує гіпотезу щодо ураження радіочутливих клітин як причину другого піку стимуляції при дозах в області верхньої межі інтервалу сублетальної дії рідкоіонізуючої радіації, що пов'язано з активацією резервної субпопуляції радіостійких клітин.

Продемонстрований прямо пропорційний зв'язок транскрипційної активності гена репаративної ендонуклеази *AtRad1* з порушеннями морфогенезу, зупинкою росту та розвитку, стерильністю опромінених рослин арабідопсису. Підвищена експресія гена *AtRad1* може бути маркером арешту клітинного циклу активних клітин, що призводить до підвищення частки

рослин з морфологічними аномаліями серед нащадків опромінених рослин. Отримані дані вказують на гіпотетичну роль даного гена як учасника системи клітинного добору та онтогенетичного чекпойнту, який дозволяє елімінувати з меристематичних тканин клітини, що містять критичні пошкодження, а з популяції рослин – організми з численними пошкодженнями геному, тим самим зменшуючи генетичний тягар, який повинен неминуче зростати в умовах дії генотоксичних чинників, особливо, якщо мова йде про автономічні популяції.

Наукова новизна одержаних результатів. З'ясовано, що як стимуляція, так і пригнічення росту та розвитку рослин під впливом радіації в діапазоні сублетальних доз частково зумовлені активацією або репресією транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*.

Встановлено, що радіобіологічні ефекти малих доз хронічного рідкоіонізуючого опромінення частково пов'язані з радіаційною модифікацією активності системи підтримки цілісності геному. Інгібуюча дія хронічного опромінення корелює з підвищенням експресії гена *AtRad1*, а стимулююча – з активацією гена *AtRAD51*. При режимі фракціонування дози гострого опромінення (повторюване опромінення рівними фракціями з інтервалом у 24 години) активність гена *AtKu70* позитивно корелює з приростом рослин та накопиченням біомаси, в той час як активність гена *AtRad1* позитивно зкорельована із затримкою або зупинкою процесів росту та розвитку, морфологічними аномаліями, стерильністю опромінених рослин. Також була встановлена від'ємна кореляція транскрипції гена *AtRAD51* з появою морфологічних аномалій. Виявлено, що індуковані опроміненням модифікації активності генів *AtRAD51* і *AtRad1* позначаються на життєздатності та варіативності морфометричних ознак неопромінених рослин, які є нащадками опромінених – активність гена *AtRAD51* сприяє збільшенню схожості та виживаності проростків F1, активність *AtRad1* корелює із зниженими значеннями цих показників.

Доведено, що опромінення у сублетальних дозах може не тільки стимулювати, але і пригнічувати транскрипцію генів репарації ДНК, а також призводити до появи вкорочених мРНК.

Встановлено характер експресії ключових генів репарації ДНК рослин *Arabidopsis thaliana* у листках прикореневої розетки на межі вегетативної та генеративної фаз розвитку: експресія гена *AtRAD51* є радіаційно-індуцибельною, а гени *AtKu70* і *AtRad1* експресуються як конститутивно, так і радіаційно-індуцибельно.

Вперше отримана нелінійна двохпікова дозова залежність транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у тканинах розеткових листків рослин арабідопсису, опромінених сублетальними дозами рентгенівської радіації у інтервалі 3-21 Гр.

Вперше показано, що фракціоноване опромінення менш ефективно індукує експресію генів репарації ДНК *AtKu70* та *AtRAD51* у порівнянні з одноразовим опроміненням при сублетальних дозах 3 Гр та 21 Гр, але при інших дозах інтервалу 6-15 Гр ефективність повторюваного (фракціонованого) опромінення щодо індукції генів *AtKu70* та *AtRAD51* є співставною або вищою, ніж при одноразовому опроміненні у тій самій дозі. При режимі повторюваного опромінення виявлена більш висока статистично достовірна кореляція між активністю генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та морфометричними показниками у пострадіаційний період, ніж при одноразовому опроміненні.

Отримано нові дані на користь існування двох відмінних за радіочутливістю субпопуляцій рослинних клітин, які відіграють різну роль у пострадіаційному відновленні та радіаційній стимуляції, що зумовлює характерну двохпікову залежність «доза-ефект».

Показано, що за низкою біохімічних маркерів опромінення рідкоіонізуючою радіацією у сублетальній дозі 21 Гр призводить до прискореного старіння листків рослин. Зокрема, в листках зростає співвідношення бета-структурних і альфа-спіральних доменів білків та зменшується їх загальний вміст, знижується питома концентрація нуклеїнових

кислот та ліпідів, відбувається заміщення пектину та лігніну целюлозою й геміцелюлозою, відкладається крохмаль, відбувається модифікація складу жирних кислот кутину, руйнується хлорофіл і накопичуються пурпурово-фіолетові пігменти.

Запропонована пояснювальна модель регуляції ранньої транскрипційної відповіді ключових генів репарації ДНК на іонізуюче опромінення.

На основі отриманих результатів запропоновано використання підвищеного рівня активності гена *Rad1* (*UVH1*) в якості маркера радіаційно індукovanого арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *Ef1a* – як характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. В той же час показані обмеження застосування транскрипційної активності гена *RAD51* як маркера рівня пошкоджень ДНК у клітинах цілої рослини чи органу. Запропоновано додатковий індекс $I_{DDR} = (TA_D(AtKu70) - TA_D(AtRad1)) - (TA_0(AtKu70) - TA_0(AtRad1))$, де TA_D – транскрипційна активність відповідного гена при дозі опромінення D , TA_0 – транскрипційна активність відповідного гена за відсутності дії іонізуючого опромінення. Індекс I_{DDR} корелює із стимулюючим впливом рідкоіонізуючого опромінення у сублетальних дозах та відображає індукцію DDR відповіді.

Вперше встановлено, що змінена опроміненням у сублетальних дозах активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* може зберігатись у нащадків першого покоління, а модифікована активність гена *AtKu70* не успадковується. Успадкування зміненої активності генів репарації позначається на частці дочірніх рослин з морфологічними аномаліями.

Вперше показано, що мутанти *Atmsh2*^{-/-} є більш чутливими у порівнянні з рослинами генотипу *Atmsh2*^{+/+} до дії одноразового, але не повторюваного та хронічного іонізуючого опромінення у сублетальних дозах. Продемонстрована самостійна роль продукту гена *Atmsh2* у пострадіаційній репарації ДНК, а також його взаємодія з продуктами генів *AtRad1* та *AtRAD51*.

Практичне значення отриманих результатів. Одержані експериментальні дані свідчать, що підбираючи режим та

сублетальну/стимулюючу дозу іонізуючого опромінення можливо модулювати транскрипцію генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* з метою зміни їх експресії. Спрямована зміна патернів експресії генів підтримки цілісності геному дасть можливість модифікувати такі значущі характеристики рослин як рівень мутабільності та компетентність до генетичних маніпуляцій, зокрема, до трансгенної трансформації.

Запропоновано використання підвищеного рівня активності гена *Rad1* (*UVH1*) в якості маркера радіаційно індукованого арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *Ef1a* – як характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. Показні обмеження застосування транскрипційної активності гена *RAD51* як маркера рівня пошкоджень ДНК у клітинах цілої рослини чи органу. Запропоновано додатковий індекс $I_{DDR} = (TA_D(AtKu70) - TA_D(AtRad1)) - (TA_0(AtKu70) - TA_0(AtRad1))$, де TA_D – транскрипційна активність відповідного гена при дозі опромінення D , TA_0 – транскрипційна активність відповідного гена за відсутності дії іонізуючого опромінення. Індекс I_{DDR} корелює із стимулюючим впливом рідкоіонізуючого опромінення у сублетальних дозах та відображає індукцію DDR відповіді. Відповідні індекси придатні для застосування при проведенні радіоекологічного моніторингу та в селекційній роботі.

Матеріали дисертаційної роботи можуть використовуватись при викладанні курсу радіобіології у вищих навчальних закладах.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., іонізуюче випромінювання, репарація ДНК, транскрипційна активність, *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, *Atmsh2*, пострадіаційне відновлення.

Список публікацій:

1. Litvinov S.V. The main repair pathways of double-strand breaks in the genomic DNA and interactions between them. *Cytology and Genetics*. 2014. Vol. 48, No. 3. P. 64-77.

С.В. Літвінов провів аналіз публікацій, присвячених основним шляхам репарації дволанцюгових розривів геномної ДНК еукаріот, узагальнив їх, запропонував типологію шляхів репарації дволанцюгових розривів ДНК, написав текст публікації.

2. Литвинов С.В. Влияние хронического облучения семян и проростков *Arabidopsis thaliana* малыми дозами γ -радиации на рост и развитие растений. *Ядерна фізика та енергетика*. 2015. Т. 15, № 4. С. 406-414.

Здобувач провів лабораторні експерименти з вивчення впливу хронічного опромінення на насіння та проростки рослин *Arabidopsis thaliana*, їх подальший ріст і розвиток до кінця вегетаційного періоду.

3. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Изменение параметров морфогенеза *Arabidopsis thaliana* L. при хроническом облучении семян и проростков малыми дозами редкоионизирующей радиации. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Збірник наукових праць. 2016. Т. 18. С. 51-55.

Дисертант вивчив зміни основних параметрів морфогенезу *Arabidopsis thaliana* L. при хронічному опроміненні насіння малими дозами γ -радіації, проаналізував отримані дані, зробив висновки та написав текст статті.

4. Litvinov S.V., Rashydov N.M. The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes to X-rays. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 2017, 7 (1). P. 52 – 60. doi: 10.17265/2161-6256/2017.01.008

С.В. Літвінов виростив та опромінив рослини *Arabidopsis thaliana* на рентгенівському терапевтичному апараті РУМ-17, виділив із свіжих листків сумарну РНК, провів зворотну транскрипцію з випадковими гексануклеотидними праймерами, здійснив ПЛР з праймерами, специфічними до кДНК генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, оцінив відносний рівень транскрипційної активності генів за допомогою методу гель-денситометрії, проаналізував зв'язок цієї активності з деякими морфометричними

характеристиками рослин у пострадіаційний період, зробив висновки та написав текст статті.

5. Літвінов С.В., Кривохижа М.В., Кухарський В.М., Рашидов Н.М. Зміни непігментних сполук у листках опромінених рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія*. 2018, № 2 (73). С. 157-164.

Здобувач разом з М.В. Кривохижою за допомогою методу інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (FTIR) визначив вміст основних непігментних сполук у свіжому ліофілізованих листках арабідопсису через місяць після опромінення у пошкоджуючій сублетальній дозі 21 Гр., проаналізував отримані дані, написав текст статті.

6. Litvinov S., Rashydov N. Transgenerational Transmission of Radiation-Induced Expression Patterns of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Rad51 and Rad1 Genes. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2018. Vol. 5, No. 2. P. 149-155.

Дисертант провів весь комплекс лабораторних робіт з культивування рослин, їх опромінення, виділення сумарної РНК та оцінки відносного рівня транскрипційної активності цільових генів, проаналізував дані для двох послідовних поколінь арабідопсису – опроміненого та неопроміненого, зробив висновки та написав текст статті.

7. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Відносна радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708* у діапазоні сублетальних доз опромінення радіацією. *Ядерна фізика та енергетика*. 2018. Т.19, №2. С. 145-149.

С.В. Літвінов оцінив відносну радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708* у діапазоні сублетальних доз 3-21 Гр одноразового та повторюваного (фракціонованого) рентгенівського опромінення за параметром накопичення біомаси пагону, провів аналіз даних, підготував текст статті.

8. Кравець О.П., Літвінов С.В., Рашидов Н.М., Соколова Д.О. Розвиток захисних реакцій за умов дії гострого опромінення. // Епігенетичні фактори

адаптації рослин : монографія / за редакцією д.б.н. О.П. Кравець та к.б.н.

Ю.В.Шиліної. К.: ПАЛИВОДА А.В., 2018. С. 100-124.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

9. Літвінов С.В. Пострадіаційні ефекти малих доз хронічного гамма-опромінення насіння та проростків *Arabidopsis thaliana* L. *Актуальні проблеми ботаніки та екології*. Матеріали міжнародної конференції молодих учених. Умань: Видавець «Сочінський», 2014. С. 128.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку. Доповідь відзначено грамотою.

10. Литвинов С.В. Радиационные и пострadiационные эффекты хронического гамма-облучения семян и проростков *A. thaliana* в малых дозах. *VII Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность)*: Москва, 21-24 октября 2014 г. Москва : РУДН, 2014. С. 288.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

11. Litvinov S.V., Rashydov N.M. Transcription of *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes in leaves of *A. thaliana* L. plants under conditions of acute and fractionated X-rays irradiation. *International Conference of Young Scientists-2015 (CYS-2015) «Today's challenges in molecular and cell biology»*, Kyiv, 21-25 September 2015: Abstract Book. Lutsk, 2015. P. 45.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

12. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Транскрипция генов *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в листьях растений *A.thaliana* L. в условиях острого и фракционированного рентгеновского облучения. *Тези доповідей VI з'їзду Радіобіологічного Товариства України*, Київ, 5-9 жовтня 2015 р. Київ, 2015. С. 83.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку. Доповідь відзначено грамотою як найкращу серед молодих науковців.

13. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Зв'язок транскрипційної активності генів підтримки цілісності геному з морфо-фенологічними характеристиками опромінених рослин *A. thaliana* L. *XXIII щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 01 - 05 лютого 2016 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2016. С. 180-182.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

14. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Радіаційна модифікація транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та морфометричні характеристики опромінених рослин *A. thaliana* L. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016). Київ: НТУУ «КПІ», 2016. С. 51.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

15. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Роль генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в пострадіаційному відновленні *A. thaliana* L. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016). Київ: НТУУ «КПІ», 2016. С. 52.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

16. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Транскрипційна відповідь на іонізуювальне опромінення генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* *A. thaliana* L. та пострадіаційне відновлення рослин. *Актуальні проблеми ботаніки та екології*. Матеріали міжнародної конференції молодих учених (м. Херсон, 29 червня – 3 липня 2016 року). Херсон: ХДУ, 2016. С. 119.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

17. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Трансгенераційне наслідування радіаційно модифікованих паттернів експресії генів підтримання цілостності генома арабидопсиса. Тези доповідей Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм», м. Долина, Івано-Франківська обл., 4-7 жовтня 2016 р. Ів.-Франківськ: «Місто НВ», 2016. С. 78.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

18. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Пострадіаційні зміни біохімічного складу нефотосинтезуючих структур листя рослин *A. thaliana* L. XXIV щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, 10 - 13 квітня 2017 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2017. С. 203.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

19. Літвінов С.В., Кривохижа М.В., Кухарський В.М., Рашидов Н.М. Пострадіаційні зміни біохімічного складу нефотосинтезуючих структур листя рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Радіоекологія-2017*: Збірник статей Науково-практичної конференції із міжнародною участю, м. Київ, 24-26 квітня 2017 року. Житомир: Вид-во ЕЦ «Укрекобіокон», 2017. С.168-172.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

20. Litvinov S.V., Rashydov N.M. Transgenerational inheritance of radiation-induced activation of *Arabidopsis thaliana* (L.) *RAD51* and *Rad1* genes. Збірка тез Третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (м. Київ, 16-18 травня 2017 р., Національний авіаційний університет). К.:НАУ, 2017. С. 48.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

21. Litvinov S., Krivohizhaya M., Rashydov N. Radiation induced long-term changes in the non-pigmented compounds in leaves of the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Abstract book. Scientific & practical Seminar with international participation «Stress factors & Secondary metabolites», December 11-15, 2017 Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2017. – P. 4.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

22. ЛІТВІНОВ С.В., Рашидов Н.М. Непігментні біохімічні маркери радіаційно індукованого старіння листя рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., опромінених рентгенівськими променями у сублетальній дозі. XXV щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, 16 - 20 квітня 2018 року): додаток до збірника тез доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2018. Д17.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

23. Litvinov S., Rashydov N., Krivohizhaya. Radiation-induced long-term changes in the non-pigmented compounds in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. RAD 2018: Sixth International Conference on radiation and applications in various fields of research, 18.06-22.06.2018, Ohrid, Macedonia. Ohrid, 2018. P. 35.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

24. Litvinov S., Rashydov N. A model of Early Transcriptional Response of the Plant Genome Integrity Maintenance Genes to Ionizing Radiation. *The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity* 03-06 July 2018, Kiev - Ukraine: Abstract Book. Kiev, 2018. P. 305.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

25. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Чутливість мутанта *Atmsh2* лінії *SALK_002708* до дії сублетальних доз іонізуючої радіації. *XXVI щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 8 - 12 квітня 2019 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2019. С. 181-182.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

SUMMARY

Litvinov S.V. Relationship between transcriptional activity of the key DNA repair genes and postradiational recovery of plants. – Qualification scientific work (Manuscript).

Thesis for a degree of the Candidate of Biological Sciences (Ph.D) in specialty 03.00.01 – Radiobiology (091 – Biology).

The study has been performed at the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

Defence of the thesis is to be held at the meeting of specialized academic council K 26.202.01 at the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

In the dissertation research the correlation of radiation-induced transcription response of the main DNA repair genes *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMsh2* with the efficiency of postradiational recovery of irradiated plants at the level of the whole organism was shown (Pearson correlation coefficients $r = 0.6$ to $r = 0.9$, $p < 0.05$). This correlation manifested itself in the range of doses of 0.2 Gy - 21.0 Gy, depending on the irradiation mode and was characteristic not only for the irradiated F_0 plants, but also for the unirradiated plants of the generation F_1 . The highest correlation coefficients for most morphometric indices of irradiated plants with early changes in the expression of *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes in the tissues of the rosette leaves of *Arabidopsis thaliana* were observed with repeated irradiation.

Ionizing irradiation of *Arabidopsis* plants in doses of 0.2 Gy-21 Gy had been lead to both medium and long-term effects, including stimulation of plant growth in length, branching of the stem, activation of lateral stem and flower buds, tillering, the appearance of plants with morphoses and the modified phenotype, and also such plants, the development of which was temporarily arrested, stimulation or suppression of the flowering, reduction or extension of the vegetation period. The stimulating effect was more characteristic of single exposure than repeated and chronic.

Correlated with the early transcriptional response parameters included: temporal or terminal growth arrest, the emergence of morphological anomalies, sterility, growth and branching of the stem, accumulation of biomass. The revealed correlations reflect the dependence of the morphometric parameters of irradiated plants on the change in the activity of the investigated genes as a component of the cell's response to the genome damage.

Dose dependencies of the early transcriptional response of the *AtKu70*, *AtRAD51*, and *AtRad1* genes on the effect of low-LET ionizing radiation in sublethal doses were nonlinear and had been reflected both stimulation and suppression of the activity of these genes in response to X-rays. While at 3 Gy – 9 Gy doses the increased total expression of the *AtKu70* and *AtRAD51* genes had been occurred, along with the reduced expression of the *AtRad1* gene, at an exposure dose of 12 Gy *AtKu70* and *AtRAD51* genes activities were repressed, and the transcription of the *AtRad1* gene was, by contrast, significantly increased compared to non-irradiated control. A single dose of 3 Gy and 21 Gy more effectively induced the expression of *AtKu70* and *AtRAD51* genes in comparison with repeated (fractionated) irradiation, but at other doses the induction efficiency for repeated irradiation mode had been generally equal or higher than for single use. The nature of the received dose dependences of the early transcriptional response of the *AtKu70*, *AtRAD51*, and *AtRad1* genes indicates the presence of two subpopulations of cells in the tissues of irradiated plants – radiosensitive and radioresistant.

The activity of the *AtKu70* gene had been correlated positively with the growth of plants and the accumulation of biomass after fractionated irradiation, while the activity of the *AtRad1* gene had been positively correlated with delayed or stopped development, morphogenetic deviations, sterility of irradiated plants. Negative correlation of transcription of the *AtRAD51* gene with morphological anomalies has been also established.

It was found that the presence or absence of the functioning *Atmsh2* gene in *Arabidopsis* genome did not affect the early transcriptional response of the *AtKu70*, *AtRAD51*, and *AtRad1* genes. *Atmsh2*^{-/-} mutants are more sensitive to the effect of single, but not repeated and chronic ionizing irradiation in sublethal doses compared to *Atmsh2*^{+/+} plants. An independent role of the *Atmsh2* gene in postradiational DNA repair had been demonstrated, as well as its interaction with the *AtKu70* and *AtRad1* genes. Increased after repeated exposure level of *AtKu70* expression weakened the suppressive effects of radiation on the accumulation of biomass in *Atmsh2*^{-/-} mutants, decreased expression of *AtRad1* had the same effect. These peculiarities are also typical of wild-type plants, but the Pearson correlation coefficients for pairs of "above-ground biomass - transcription activity of the gene" were statistically significantly higher for mutant plants *Atmsh2*^{-/-}. Thus, the interaction of different pathways of DNA repair allows the systems of inducible repair to eliminate lesions that result from the lack of MMR repair in *Atmsh2*^{-/-} mutants under the action of repeated and chronic irradiation. This gives reasons to speculate on compensatory role of inducible repair and its function in reducing the mutational level (the *Atmsh2*^{-/-} mutant is a model for rapid accumulation of mutations in the genome and increase in the genetic load, so called mutator phenotype).

Changes in the activity of the *AtRAD51* and *AtRad1* genes, induced by irradiation, had been affected the viability and variation of the morphological characteristics of non-irradiated plants that was a progeny of irradiated plants – activity of the *AtRAD51* gene has been promoted an increase in the germination and survival of F1 seedlings, the activity of *AtRad1* on the contrary.

Expression of *AtRAD51* and *AtRad1* genes, increased after irradiation in sublethal doses, might be transmitted to the first-generation progeny, while the induced activity of *AtKu70* had not been transmitted. The transgenerational transmission of the increased activity of the *AtRad1* gene had been associated with the increased frequency of plants with morphological anomalies in the first postradiational generation as compared to non-irradiated control.

For the first time the phenomenon of radiation repression of reparative genes at doses of 6-15 Gy of single and repeat X-ray irradiation was observed, as well as the appearance of the truncated mRNA of DNA DSBs repair factor *AtKu70* after a single exposure at dose of 9 Gy and of the truncated mRNA of one of the main household genes *AtEfla* after repeated irradiation of 5 Gy + 5 Gy + 5 Gy dose, that may influence the formation of the radiobiological reaction of inhibition of plant growth and development. Along with a dose of 12 Gy, resulted in a decrease in the expression of *AtRAD51* and *AtKu70* genes, that provide the integrity of chromatids and chromosomes, in the interval of sublethal irradiation doses there were two local maximums of the expression of these genes at doses of 3-6 Gy and 21 Gy, respectively. In our point of view, this confirm heterogeneity of plant tissues, which consist of a pool of active radiosensitive cells and a pool of radioresistant cells in state of dormancy. The first peak of activation of DNA repair genes corresponds to the induction of the investigated genes. At the same dose interval, the transcription activity of the "housekeeping" gene *AtEfla* was reduced by 2-2.5 times. Radiation damage of radiosensitive cells can activate a pool of radioresistant cells, which state of dormancy is supported by the activity of radiosensitive cells. Therefore, at a dose of 21 Gy a second peak of inducible DNA repair had been observed – transcriptional maximum of inducible DNA repair genes in cells of radioresistant subpopulation. It can be assumed that the first peak of stimulation on double-peak dose dependencies of morphometric characteristics of plants corresponds to the induction of DNA repair systems, and the second – to hyperstimulation of meristems due to the activation of their cellular reserve. However, in the first and second cases, the transcription of DNA repair genes and the maintenance of genome stability is an important factor in

ensuring a complete postradiational recovery at the molecular, cellular, tissue, and organismic levels.

Fractionated (repeated) irradiation had more clear depressive effect on the postradiational development of plants of the experimental variants. Significant (1.5 and more times) increase of the transcriptional activity of *AtRad1* genes and especially *AtRAD51* in the leaves of plants, chronically irradiated with small doses of γ -radiation (0.2 Gy and 0.3 Gy for 35 and 7 days, respectively) had been detected. At the given doses radiobiological effects were observed, quantitatively and qualitatively comparable to the effects observed in plants of *Arabidopsis*, acutely irradiated at doses order of magnitude higher. These facts suggest that the high biological efficiency of repeated and chronic low LET ionizing irradiation is partly due to the influence of radiation-induced changes in the activity of DNA repair systems.

At the margin of the interval of sublethal doses (21 Gy), despite the second peak of activation of the key repair genes of DSBs DNA *AtKu70* and *AtRAD51*, large-scale degradation of nucleic acids had been detected in plant cells of rosette leaves 30 days after irradiation, which is manifested in lowering their content in tissues more than 5 times. In the leaves of irradiated plants, the content of proteins and lipids decreased sharply, the ratio of beta layers and alpha domains of proteins increased, chlorophyll had been partly destroyed with accumulation of purple pigments, pectin and lignin were replaced by cellulose and hemicellulose, starch was accumulated, modifications of the fatty acids content of the cutin were observed. This confirms the hypothesis of the affection of radiosensitive cells as the cause of the second peak of stimulation at doses about upper margin of the interval of the low LET ionizing radiation sublethal effects, which is associated with the activation of the reserve subpopulation of radioresistant cells.

A direct proportional relationship between the transcriptional activity of the *AtRad1* reparative endonuclease gene and morphological anomalies, growth arrest and sterility of irradiated plants of *Arabidopsis* has been demonstrated. Increased expression of the *AtRad1* gene could be used as a marker of arrest of the cell cycle of active cells, which leads to an increase in the percentage of plants with morphological

anomalies among the offspring of irradiated plants. The obtained data point to the hypothetical role of this gene as a participant in the system of cell selection and ontogenetic checkpoint, which allows elimination of cells, containing critical damage, from the meristem tissues and also eliminate from the population of plants organisms with numerous damage of the genome, thereby reducing the genetic load, that must inevitably to grow under the conditions of genotoxic factors, especially in the case of populations of self-pollinating plants.

Scientific novelty of the obtained results. It was found, that both stimulation and inhibition of the growth and development of plants under the influence of radiation in the range of sublethal doses are partly due to activation or repression of the transcriptional activity of the *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes.

It has been established that the radiobiological effects of small doses of chronic low LET ionizing radiation are partly due to the radiation-induced modification of the activity of the genome integrity maintaining system. The inhibitory effect of chronic irradiation correlates with increased expression of the *AtRad1* gene, and stimulating – with the activation of the *AtRAD51* gene. At the fractionation mode of acute exposure (repeated irradiation with equal fractions at an interval of 24 h), the activity of the *AtKu70* gene positively correlates with plant growth and accumulation of biomass, while the activity of the *AtRad1* gene positively correlates with delayed or arrested growth and development, morphological anomalies, sterility of irradiated plants. A negative correlation of transcription of the *AtRAD51* gene with morphological anomalies was also established. It was found that irradiation-induced changes of the activity of the *AtRAD51* and *AtRad1* genes affect the viability and variability of morphological characteristics of non-irradiated offsprings of the irradiated plants – the activity of the *AtRAD51* gene promotes an increase in the germination and survival of F1 seedlings, the activity of *AtRad1* correlates with the lower values of these indices.

It has been shown that irradiation in sublethal doses can not only stimulate, but also suppress transcription of DNA repair genes, as well as lead to the appearance of truncated mRNA.

The character of expression of the key DNA repair genes of *Arabidopsis thaliana* plants in the rosette leaves at the margin between the vegetative and generative phases of development is established: expression of the *AtRAD51* gene is radiation-inducible, and the *AtKu70* and *AtRad1* genes are expressed both constitutively and in radiation-inducible manner.

For the first time the nonlinear double-peak dose dependence of the transcriptional activity of *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes in the tissues of rosette leaves of *Arabidopsis* plants, irradiated at sublethal doses of 3-21 Gy of X-rays, was obtained.

For the first time fractionated irradiation has been shown to less effectively induce expression of the DNA repair genes *AtKu70* and *AtRAD51* compared to single exposure at a doses of 3 Gy and 21 Gy, but at other doses of 6 Gy-15 Gy, the effect of repeated (fractionated) irradiation on the induction of the DNA repair genes is comparable or higher than with single irradiation at the same dose. In the mode of repeated irradiation, a higher, than with single irradiation, statistically significant correlation between activity of the *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes and morphometric parameters in the postradiation period was detected.

New data were obtained in favor of the existence of two different by radiosensitivity subpopulations of plant cells, which play a different role in post-radiation recovery and radiation stimulation, which leads to a characteristic double-peak dose-effect relationship.

It has been shown that according to a number of biochemical markers X-ray irradiation at a sublethal dose of 21 Gy leads to accelerated aging of plant leaves. In particular, the ratio of beta-layers and alpha domains of proteins increases and their total content decreases, the content of nucleic acids and lipids decreases, pectin and lignin are replaced by cellulose and hemicellulose, starch is deposited, modification of composition of the fatty acids of cutin is observed, chlorophyll is destroyed and purple pigments are accumulated.

An explanatory model for regulating the early transcriptional response of key DNA repair genes to ionizing radiation is proposed.

Based on the obtained results, the application of measured elevated levels of *Rad1* (*UVH1*) gene activity as a marker of radiation-induced arrest of cell cycle of active cells in plant organs and a reduced level of expression of the *Ef1a* gene as characteristics of the damage of subpopulation of active cells were proposed. At the same time, the limitations of the use of transcriptional activity of the *RAD51* gene as a marker of the DNA damage level in cells of a whole plant or an organ had been shown. An additional index $I_{DDR} = (TA_D(AtKu70) - TA_D(AtRad1)) - (TA_0(AtKu70) - TA_0(AtRad1))$ is proposed, where TA_D is the transcription activity of the corresponding gene at the dose of irradiation D , TA_0 is the transcription activity of the corresponding gene in the absence of ionizing irradiation exposure. The I_{DDR} index correlates with the stimulating effect of low LET ionizing radiation in sublethal doses and reflects the induction of the DDR response.

For the first time it has been found that altered by irradiation in sublethal doses activity of the *AtRAD51* and *AtRad1* genes may be inherited by first-generation offsprings, and the modified activity of the *AtKu70* gene is not inherited. Transgenerational transmission of the modified activity of the DNA repair genes affects the frequency of the F1 plants with morphological abnormalities.

It has been shown for the first time that *Atmsh2*^{-/-} mutants are more susceptible than *Atmsh2*^{+/+} plants to the single-dose, but not repeated or chronic ionizing irradiation in sublethal doses. An independent role of the *Atmsh2* gene product in post-radiation DNA repair, as well as its interaction with *AtRad1* and *AtKu70* genes have been demonstrated.

The practical significance of the results. Experimental data have shown that selecting the mode and sublethal/stimulative dose of ionizing radiation could modulate transcription of the *AtKu70*, *AtRAD51*, and *AtRad1* genes to alter their expression. A directed change in expression patterns of genome integrity maintaining genes will enable the modification of such economically relevant plant characteristics as the level of mutability and the competence for genetic manipulation, in particular, to transgenic transformation.

The application of measured elevated levels of *Rad1* (*UVH1*) gene activity as a marker of radiation-induced arrest of cell cycle of active cells in plant organs and a reduced level of expression of the *Ef1a* gene as characteristics of the damage of subpopulation of active cells were proposed. The limitations of the use of transcriptional activity of the *RAD51* gene as a marker of the DNA damage level in cells of a whole plant or an organ had been shown. An additional index $I_{DDR} = I_{DDR} = (TA_D(AtKu70) - TA_D(AtRad1)) - (TA_0(AtKu70) - TA_0(AtRad1))$ is proposed, where TA_D is the transcription activity of the corresponding gene at the dose of irradiation D , TA_0 is the transcription activity of the corresponding gene in the absence of ionizing irradiation exposure. The I_{DDR} index correlates with the stimulating effect of low LET ionizing radiation in sublethal doses and reflects the induction of the DDR response.

In the long run, the obtained data can help optimize plant cultivation protocols during space missions and programs.

The materials of the thesis could be used in the teaching of academic disciplines and special courses in higher education institutions.

Key words: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ionizing radiation, DNA repair, transcriptional activity, *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, *Atmsh2*, post-radiation recovery.

Publications:

1. Litvinov S.V. The main repair pathways of double-strand breaks in the genomic DNA and interactions between them. *Cytology and Genetics*. 2014. Vol. 48, No. 3. P. 64-77.
С.В. Літвінов провів аналіз публікацій, присвячених основним шляхам репарації дволанцюгових розривів геномної ДНК еукаріот, узагальнив їх, запропонував типологію шляхів репарації дволанцюгових розривів ДНК, написав текст публікації.
2. Литвинов С.В. Влияние хронического облучения семян и проростков *Arabidopsis thaliana* малыми дозами γ -радиации на рост и развитие растений. *Ядерна фізика та енергетика*. 2015. Т. 15, № 4. С. 406-414.

Здобувач провів лабораторні експерименти з вивчення впливу хронічного опромінення на насіння та проростки рослин *Arabidopsis thaliana*, їх подальший ріст і розвиток до кінця вегетаційного періоду.

3. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Изменение параметров морфогенеза *Arabidopsis thaliana* L. при хроническом облучении семян и проростков малыми дозами редкоионизирующей радиации. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Збірник наукових праць. 2016. Т. 18. С. 51-55.

Дисертант вивчив зміни основних параметрів морфогенезу *Arabidopsis thaliana* L. при хронічному опроміненні насіння малими дозами γ -радіації, проаналізував отримані дані, зробив висновки та написав текст статті.

4. Litvinov S.V., Rashydov N.M. The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes to X-rays. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 2017, 7 (1). P. 52 – 60. doi: 10.17265/2161-6256/2017.01.008

С.В. Літвінов виростив та опромінив рослини *Arabidopsis thaliana* на рентгенівському терапевтичному апараті РУМ-17, виділив із свіжих листків сумарну РНК, провів зворотну транскрипцію з випадковими гексануклеотидними праймерами, здійснив ПЛР з праймерами, специфічними до кДНК генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, оцінив відносний рівень транскрипційної активності генів за допомогою методу гель-денситометрії, проаналізував зв'язок цієї активності з деякими морфометричними характеристиками рослин у пострадіаційний період, зробив висновки та написав текст статті.

5. Літвінов С.В., Кривохижа М.В., Кухарський В.М., Рашидов Н.М. Зміни непігментних сполук у листках опромінених рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія*. 2018, № 2 (73). С. 157-164.

Здобувач разом з М.В. Кривохижою за допомогою методу інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (FTIR) визначив вміст основних непігментних сполук у свіжих ліофілізованих листках арабідопсису через місяць після опромінення у пошкоджуючій сублетальній дозі 21 Гр., проаналізував отримані дані, написав текст статті.

6. Litvinov S., Rashydov N. Transgenerational Transmission of Radiation-Induced Expression Patterns of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Rad51 and Rad1 Genes. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2018. Vol. 5, No. 2. P. 149-155.

Дисертант провів весь комплекс лабораторних робіт з культивації рослин, їх опромінення, виділення сумарної РНК та оцінки відносного рівня транскрипційної активності цільових генів, проаналізував дані для двох послідовних поколінь арабідопсису – опроміненого та неопроміненого, зробив висновки та написав текст статті.

7. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Відносна радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708* у діапазоні сублетальних доз опромінення радіацією. *Ядерна фізика та енергетика*. 2018. Т.19, №2. С. 145-149.

С.В. Літвінов оцінив відносну радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708* у діапазоні сублетальних доз 3-21 Гр одноразового та повторюваного (фракціонованого) рентгенівського опромінення за параметром накопичення біомаси пагону, провів аналіз даних, підготував текст статті.

8. Кравець О.П., Літвінов С.В., Рашидов Н.М., Соколова Д.О. Розвиток захисних реакцій за умов дії гострого опромінення. // Епігенетичні фактори адаптації рослин : монографія / за редакцією д.б.н. О.П. Кравець та к.б.н. Ю.В.Шиліної. К.: ПАЛИВОДА А.В., 2018. С. 100-124.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

9. Літвінов С.В. Пострадіаційні ефекти малих доз хронічного гамма-опромінення насіння та проростків *Arabidopsis thaliana* L. *Актуальні проблеми ботаніки та екології*. Матеріали міжнародної конференції молодих учених. Умань: Видавець «Сочінський», 2014. С. 128.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку. Доповідь відзначено грамотою.

10.Литвинов С.В. Радиационные и пострadiационные эффекты хронического гамма-облучения семян и проростков *A. thaliana* в малых дозах. *VII Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность)*: Москва, 21-24 октября 2014 г. Москва : РУДН, 2014. С. 288.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

11.Litvinov S.V., Rashydov N.M. Transcription of *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes in leaves of *A. thaliana* L. plants under conditions of acute and fractionated X-rays irradiation. *International Conference of Young Scientists-2015 (CYS-2015) «Today's challenges in molecular and cell biology»*, Kyiv, 21-25 September 2015: Abstract Book. Lutsk, 2015. P. 45.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

12.Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Транскрипция генов *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в листьях растений *A.thaliana* L. в условиях острого и фракционированного рентгеновского облучения. *Тези доповідей VI з'їзду Радіобіологічного Товариства України*, Київ, 5-9 жовтня 2015 р. Київ, 2015. С. 83.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку. Доповідь відзначено грамотою як найкращу серед молодих науковців.

13.Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Зв'язок транскрипційної активності генів підтримки цілісності геному з морфо-фенологічними характеристиками опромінених рослин *A. thaliana* L. *XXIII щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 01 - 05 лютого 2016 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2016. С. 180-182.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

14. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Радіаційна модифікація транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та морфометричні характеристики опромінених рослин *A. thaliana* L. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016). Київ: НТУУ «КПІ», 2016. С. 51.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

15. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Роль генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в пострадіаційному відновленні *A. thaliana* L. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016). Київ: НТУУ «КПІ», 2016. С. 52.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

16. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Транскрипційна відповідь на іонізуювальне опромінення генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* *A. thaliana* L. та пострадіаційне відновлення рослин. *Актуальні проблеми ботаніки та екології*. Матеріали міжнародної конференції молодих учених (м. Херсон, 29 червня – 3 липня 2016 року). Херсон: ХДУ, 2016. С. 119.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

17. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Трансгенерационное наследование радиационно модифицированных паттернов экспрессии генов поддержания целостности генома арабидопсиса. Тези доповідей Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм», м. Долина, Івано-Франківська обл., 4-7 жовтня 2016 р. Ів.-Франківськ: «Місто НВ», 2016. С. 78.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

- 18.Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Пострадіаційні зміни біохімічного складу нефотосинтезуючих структур листя рослин *A. thaliana* L. XXIV щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, 10 - 13 квітня 2017 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2017. С. 203.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

- 19.Літвінов С.В., Кривохижа М.В., Кухарський В.М., Рашидов Н.М. Пострадіаційні зміни біохімічного складу нефотосинтезуючих структур листя рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Радіоекологія-2017*: Збірник статей Науково-практичної конференції із міжнародною участю, м. Київ, 24-26 квітня 2017 року. Житомир: Вид-во ЕЦ «Укрекобіокон», 2017. С.168-172.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

- 20.Litvinov S.V., Rashydov N.M. Transgenerational inheritance of radiation-induced activation of *Arabidopsis thaliana* (L.) *RAD51* and *Rad1* genes. Збірка тез Третьої конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (м. Київ, 16-18 травня 2017 р., Національний авіаційний університет). К.:НАУ, 2017. С. 48.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

- 21.Litvinov S., Krivohizhaya M., Rashydov N. Radiation induced long-term changes in the non-pigmented compounds in leaves of the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Abstract book. Scientific & practical Seminar with international participation «Stress factors & Secondary metabolites», December 11-15, 2017 Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2017. – P. 4.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

22.Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Непігментні біохімічні маркери радіаційно індукованого старіння листя рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., опромінених рентгенівськими променями у сублетальній дозі. *XXV щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 16 - 20 квітня 2018 року): додаток до збірника тез доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2018. Д17.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

23.Litvinov S., Rashydov N., Krivohizhaya. Radiation-induced long-term changes in the non-pigmented compounds in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. *RAD 2018: Sixth International Conference on radiation and applications in various fields of research*, 18.06-22.06.2018, Ohrid, Macedonia. Ohrid, 2018. P. 35.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

24.Litvinov S., Rashydov N. A model of Early Transcriptional Response of the Plant Genome Integrity Maintenance Genes to Ionizing Radiation. *The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity* 03-06 July 2018, Kiev - Ukraine: Abstract Book. Kiev, 2018. P. 305.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

25.Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Чутливість мутанта *Atmsh2* лінії *SALK_002708* до дії сублетальних доз іонізуючої радіації. *XXVI щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 8 - 12 квітня 2019 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2019. С. 181-182.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

ЗМІСТ

	Стор.
АНОТАЦІЯ.....	1
SUMMARY.....	16
ЗМІСТ.....	31
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	34
ВСТУП.....	37
РОЗДІЛ 1. ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МОЛЕКУЛЯРНОГО ТА ОРГАНІЗМЕНОГО РІВНІВ ФОРМУВАННЯ ВІДПОВІДІ РОСЛИН НА ОПРОМІНЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	46
1.1. Радіобіологічні ефекти з позицій системної біології.....	46
1.2. Дія радіації на організм рослин.....	49
1.2.1. Летальні та сублетальні дози опромінення.....	49
1.2.2. Генотоксичний ефект рідкоіонізуючої радіації.....	51
1.2.3. Радіаційна стимуляція життєвих процесів.....	53
1.2.4. Радіоадаптація та радіаційно індукована нестабільність геному.....	56
1.3. Індуковані радіацією пошкодження ДНК та подальша доля клітини.....	57
1.3.1. DDR-сигналінг в клітинах рослин.....	57
1.3.2. Розриви ДНК як фактор індукції DDR-відповіді.....	60
1.3.3. Індуковані опроміненням зміни експресії генів репарації ДНК.....	68
1.3.4. Репарація дволанцюгових розривів ДНК та пострадіаційне відновлення рослин.....	70
1.4. Висновки до розділу 1.....	74
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	76
2.1. Характеристика об'єктів дослідження.....	76
2.2. Опис та основні методичні принципи дослідження.....	78
2.2.1. Етапи дослідження.....	78
2.2.2. Обґрунтування схеми повторюваного опромінення та особливостей визначення активності генів <i>AtKu70</i> , <i>AtRAD51</i> , <i>AtRad1</i>	81
2.2.3. Вибірка та повторюваність дослідів.....	83
2.3. Підготовка насіннєвого матеріалу та культивування рослин.....	83
2.4. Морфометричний аналіз.....	85
2.5. Інфрачервона Фур'є-спектроскопія.....	87
2.6. Визначення відносної транскрипційної активності цільових генів.....	88
2.6.1. Екстракція РНК та зворотна транскрипція.....	88

2.6.2. Ампліфікація цільових послідовностей кДНК.....	89
2.6.3. Гель денситометрія продуктів ампліфікації кДНК.....	90
2.7. Статистичний аналіз даних.....	91

РОЗДІЛ 3. РАННЯ ТРАНСКРИПЦІЙНА ВІДПОВІДЬ ГЕНІВ <i>ATKu70</i> , <i>ATRAD51</i> , <i>ATRAD1</i> НА ДІЮ РІДКОІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ У СУБЛЕТАЛЬНИХ ДОЗАХ.....	93
3.1. Залежність змін рівня транскрипції генів <i>AtKu70</i> , <i>AtRAD51</i> , <i>AtRad1</i> від дози опромінення в інтервалі 3-21 Гр.....	93
3.2. Зміна характеру транскрипційної відповіді в критичних точках дозової залежності.....	101
3.3. Патерн активності досліджуваних генів репарації ДНК при хронічному низькодозовому опроміненні <i>A.thaliana</i>	104
3.4. Трансгенераційне збереження радіаційно модифікованої експресії генів <i>AtKu70</i> , <i>AtRAD51</i> , <i>AtRad1</i>	108
3.5. Корегуляція ранньої транскрипційної відповіді ключових генів репарації розривів ДНК <i>Arabidopsis thaliana</i> як частина механізму DDR.....	112
3.6. Висновки до розділу 3.....	114

РОЗДІЛ 4. ДІЯ ХРОНІЧНОГО НИЗЬКОДОЗОВОГО ОПРОМІНЕННЯ НА НАСІННЯ ТА ПРОРОСТКИ РОСЛИН <i>A. THALIANA</i>	117
4.1. Вплив хронічного низькодозового опромінення насіння та проростків рідкоіонізуючою радіацією на ріст та розвиток <i>A.thaliana</i>	117
4.2. Радіаційно індуковані морфологічні аномалії та морфози.....	124
4.3. Особливості радіобіологічних реакцій мутанта <i>Atmsh2 SALK_002708</i> в інтервалі малих доз хронічного рідкоіонізуючого опромінення.....	130
4.4. Модифікація морфометричних кореляцій під дією малих доз опромінення.....	132
4.5. Висновки до розділу 4.....	134

РОЗДІЛ 5. ЗВ'ЯЗОК MORFOMETРИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ОПРОМІНЕНИХ РОСЛИН АРАБІДОПСИСУ З РАННІМИ РАДІАЦІЙНО ІНДУКОВАНИМИ ЗМІНАМИ ТРАНСКРИПЦІЇ ГЕНІВ РЕПАРАЦІЇ ДНК <i>ATKu70</i> , <i>ATRAD51</i> , <i>ATRAD1</i>	136
5.1. Залежність морфометричних параметрів рослин арабідопсису від дози опромінення в інтервалі 3 – 21 Гр.....	136
5.2. Біохімічні зміни у листках рослин, одноразово опромінених дозою 21 Гр рентгенівських променів.....	145

5.3. Радіаційно індуковані зміни транскрипційної активності генів підтримки цілісності геному та морфометричні показники <i>A. thaliana</i> у пострадіаційний період.....	152
5.4. Радіочутливість мутанта <i>Atmsh2</i> ^{-/-} <i>SALK_002708</i> та ймовірна роль білку MSH2 у пострадіаційному відновленні ДНК рослин.....	164
5.5. Оцінка ступеню радіаційного ураження ДНК арабідопсису використаними дозами опромінення.....	168
5.6. Висновки до розділу 5.....	170
 РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	174
 ВИСНОВКИ.....	184
 СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	186

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АП-сайт – апуриновий / апіримідиновий сайт ДНК

АФК – активні форми кисню

див. – дивись

длДНК – дволанцюгова ДНК

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДР ДНК – дволанцюгові розриви ДНК

ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція з етапом попередньої зворотної транскрипції з метою отримання кДНК на матриці РНК

ІР – іонізуюча радіація

ІЧ – інфрачервоний

кДНК – комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота

ЛПЕ – лінійна передача енергії

МАГАТЕ – Міжнародна агенція з атомної енергії

МГЕ – мобільний генетичний елемент

міРНК – мала інтерферуюча РНК

мРНК – матрична РНК

олДНК – одноланцюгова ДНК

ОР ДНК – одноланцюгові розриви ДНК

ПКЗ – програмована клітинна загибель

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

пре-мРНК – високомолекулярний попередник мРНК

рис. – рисунок

РІНГ – радіаційно індукована нестабільність геному

РНК – рибонуклеїнова кислота

табл. – таблиця

T-ДНК – transfer DNA, фрагмент ДНК Ti-плазмиди або Ri-плазмиди агробактерій, що здатний інтегруватись у ядерний геном клітини-господаря

тРНК – транспортна рибонуклеїнова кислота

у.о. – умовна одиниця

УФ – ультрафіолет

ЧАЕС – Чорнобильська атомна електростанція

ATR – ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, атаксія-телеангіектазія і Rad3-споріднений білок, серин/треонінова протеїнкіназа, яка активується одноланцюговою ДНК

ATM – ataxia-telangiectasia mutated protein kinase, мутантний при атаксії-телеангіектазії білок, серин/треонінова протеїнкіназа, яка рекрутується та активується дволанцюговими розривами ДНК

BER – base excision repair, ексцизійна репарація основ

bp – base pair, пара основ двох нуклеотидів на комплементарних ланцюжках нуклеїнових кислот. Те саме, що й п.н. та н.п.

2C, 4C – кількість ДНК (хроматид) у клітинах у G_0 / G_1 та G_2 фазах клітинного циклу відповідно

ddH₂O – стандарт чистоти води подвійної дистиляції

DDR – DNA damage response, клітинна відповідь на пошкодження ДНК

DDT – DNA damage tolerance, клітинна відповідь, яка проявляється як підвищення стійкості до генотоксичних чинників

dNTP – deoxynucleotide, деоксинуклеотид, мономер ланцюга молекули ДНК

EtBr – бромистий етидій

F₀ – батьківське покоління

F₁ – перше покоління нащадків батьківського покоління (F₀)

FTIR – Fourier-transform infrared spectroscopy, інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є або Фур'є- спектроскопія

HR – homologous recombination, гомологічна рекомбінація

M, m – mean, середнє

MMEJ – Microhomology-mediated end joining, мікрогомологічне поєднання кінців ДНК, один із шляхів мутагенної репарації дволанцюгових розривів ДНК

NER – nucleotide excision repair, ексцизійна репарація нуклеотидів

NHEJ – non-homologous end joining, негомологічне поєднання кінців ДНК у сайті дволанцюгового розриву

SE – standard error, стандартна похибка

SOG1 – suppressor of gamma response 1, супресор гамма-відповіді 1, транскрипційний фактор, що регулює відповідь рослинних клітин на пошкодження ДНК

SOS-репарація – система індукцибельної репарації ДНК бактерій, що активується у відповідь на розриви ДНК або інгібування реплікації

SSA – single-strand annealing, одноланцюговий відпал, один з мутагенних шляхів репарації дволанцюгових розривів ДНК

TLS – translesion synthesis, транслейжн-синтез, шлях неточної репарації ДНК, що забезпечує стійкість процесу реплікації до наявності у ДНК пошкоджень, таких як АП-сайти або тимінові димери

UNSCEAR – United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, Науковий комітет ООН з дії атомної радіації (НКДАР)

wt – wild type, рослини *A. thaliana* дикого типу лінії Col 0.

ВСТУП

Актуальність теми. Збереження цілісності та функціональності генетичного апарату необхідні як для забезпечення нормального онтогенезу, так і для функціонування дорослих живих організмів. Особливе значення це має для вищих наземних *Embryophyta*. Закріплені в субстраті рослини в порівнянні з рухомими тваринами більш вразливі до дії генотоксичних факторів, серед яких ультрафіолетова компонента сонячного світла, підвищена та знижена відносно фізіологічного оптимуму температура навколишнього середовища, аніони хлору і катіони важких металів, сполуки, які є джерелом АФК, зокрема хлорофіл [1;102;153;165;173]. Не менше значення має й характер розмноження наземних рослин, життєвий цикл яких починається із зародку або зачатку, що проходять через період спокою, часто в умовах дегідратації (сухе насіння або спори). Дегідратація є одним із найсильніших генотоксичних чинників, які діють на клітини рослин в природних умовах [143]. Еволюцію ефективних механізмів репарації розривів ДНК у рослин, зокрема потенційно летальних дволанцюгових розривів, пов'язують з пристосуванням представників царства *Plantae* до дегідратації на ранніх стадіях онтогенезу [143;147;173]. Можливо, саме ця обставина пояснює радіорезистентність насіння більшості видів вищих рослин. Однак їх чутливість до сублетальних доз іонізуючого опромінення, особливо повторюваного, пролонгованого або хронічного, не так сильно відрізняється від радіочутливості тваринних організмів [10;12;32;68;177]. Причина таких подібностей і відмінностей в біологічній дії радіації на рослинні та тваринні об'єкти залишається нез'ясованою, але, ймовірно, пов'язана з ефективністю репарації ДНК при різних дозах та режимах опромінення [13;131;133;164].

Важливо і те, що індукція комплексних пошкоджень геному під впливом іонізуючого випромінювання дозволяє використовувати радіацію як тестовий стрес-фактор стійкості організму до генотоксичних впливів середовища [175;193-195].

Метаболізм будь-якої еукаріотичної клітини також є потужним джерелом вільних радикалів, що генеруються у мітохондріях, а у рослин ще й у фотосинтетичному апараті хлоропластів [173;174]. Тому вивчення роботи ключових для підтримки цілісності геному репаративних шляхів рослин в умовах дії іонізуючого випромінювання становить інтерес не тільки для радіобіології, але і для фізіології рослин, а також для біологічної науки в цілому.

Однією з проблем, що не втратили свою актуальність, залишається вивчення механізмів адаптації вищих рослин до дії радіації, пов'язаних з модифікацією роботи системи репарації ДНК у відповідь на одноразове та повторюване опромінення. В цьому контексті має значення встановлення зв'язку між активним характером змін експресії генів, які забезпечують репарацію ДНК, та пострадіаційним відновленням рослин на організменому рівні, особливо на критичних етапах онтогенезу. Адже характерною рисою живих організмів є тісна інтеграція молекулярних, клітинних, тканинних, органних процесів, які забезпечують виживання і розмноження в мінливому середовищі, в тому числі і за умов дії генотоксичних чинників.

Вирішення окреслених наукових проблем можливе за допомогою експериментального опромінення модельної рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. рідкоіонізуючою радіацією у сублетальних дозах, вивчення транскрипційної відповіді ключових генів підтримки структурної цілісності геному *A. thaliana* на дію радіації, а також з'ясування характеру зв'язку цієї відповіді з пострадіаційним відновленням життєдіяльності рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалась з 2011 по 2018 роки у відділі біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом д.б.н. Рашидова Н.М. в межах тем: «Епігеномна складова адаптації у рослин» (№ 0108U000875, 2008-2012); III-4-13 «Роль епігеномних механізмів в адаптогенезі рослин» (державний реєстраційний номер роботи 0113U000228, 2012-2016); II-3-12 «Розробка способів скерованого

впливу на сигнальні системи і епігенетичну пластичність культурних рослин для підвищення їх продуктивності та стійкості» (державний реєстраційний номер роботи 0112U003077, 2012-2016); II-4-07 «Виділення та аналіз стрес-стійких форм рослин з їх популяцій, сформованих в умовах хронічного опромінення, методом біомаркерів» (2007–2011, державний реєстраційний номер теми 0107U002870); European Commission FP-7-PEOPLE IRSES GA-2013-612587 «Plant DNA tolerance».

Мета і завдання дослідження. Мета дослідження – виявити зв’язок ранньої транскрипційної відповіді основних генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMSH2* на дію сублетальних доз рідкоіонізуючої радіації з ефективністю пострадіаційного відновлення опромінених рослин на рівні цілісного організму.

Відповідно до поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Дослідити середньо- та довгострокові ефекти впливу сублетальних доз рідкоіонізуючого опромінення на ріст та розвиток модельної рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
2. Визначити дозові залежності ранньої транскрипційної відповіді генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на дію рідкоіонізуючої радіації в сублетальних дозах та пояснити їх особливості.
3. Виявити кореляції фенотипу та морфометричних характеристик рослин у пострадіаційний період з ранньою транскрипційною відповіддю генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на одноразове та повторюване опромінення у сублетальних дозах.
4. З’ясувати роль гена *AtmsH2* у модифікації індукованої опроміненням ранньої транскрипційної відповіді генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та у пострадіаційному відновленні рослин.
5. Дослідити вплив індукованих опроміненням змін активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на життєздатність і варіативність морфометричних ознак нащадків опромінених рослин.

6. Перевірити гіпотезу про трансгенераційне збереження радіаційно модифікованої експресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*.

Об'єкт дослідження – пострадіаційне відновлення рослин на організаційному рівні та рання транскрипційна відповідь на дію іонізуючої радіації основних генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMSH2*.

Предмет дослідження – зв'язок ранньої транскрипційної відповіді основних генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMSH2* на дію іонізуючої радіації у сублетальних дозах та ефективності пострадіаційного відновлення рослин.

Методи дослідження – біометричні, радіометричні, молекулярно-біологічні, біофізичні, стандартні методи статистичної обробки та аналізу даних.

Наукова новизна одержаних результатів. З'ясовано, що як стимуляція, так і пригнічення росту та розвитку рослин під впливом радіації в діапазоні сублетальних доз частково зумовлені активацією або репресією транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*.

Встановлено, що радіобіологічні ефекти малих доз хронічного рідкоіонізуючого опромінення частково пов'язані з радіаційною модифікацією активності системи підтримки цілісності геному. Інгібуюча дія хронічного опромінення корелює з підвищенням експресії гена *AtRad1*, а стимулююча – з активацією гена *AtRAD51*. При режимі фракціонування дози гострого опромінення (повторюване опромінення рівними фракціями з інтервалом у 24 години) активність гена *AtKu70* позитивно корелює з приростом рослин та накопиченням біомаси, в той час як активність гена *AtRad1* позитивно зкорельована із затримкою або зупинкою процесів росту та розвитку, морфологічними аномаліями, стерильністю опромінених рослин. Також була встановлена від'ємна кореляція транскрипції гена *AtRAD51* з появою морфологічних аномалій. Виявлено, що індуковані опроміненням модифікації активності генів *AtRAD51* і *AtRad1* позначаються на життєздатності та варіативності морфометричних ознак неопромінених рослин, які є нащадками опромінених – активність гена *AtRAD51* сприяє збільшенню схожості та

виживаності проростків F1, активність *AtRad1* корелює із зниженими значеннями цих показників.

Доведено, що опромінення у сублетальних дозах може не тільки стимулювати, але і пригнічувати транскрипцію генів репарації ДНК, а також призводити до появи вкорочених мРНК.

Встановлено характер експресії ключових генів репарації ДНК рослин *Arabidopsis thaliana* у листках прикореневої розетки на межі вегетативної та генеративної фаз розвитку: експресія гена *AtRAD51* є радіаційно-індуцибельною, а гени *AtKu70* і *AtRad1* експресуються як конститутивно, так і радіаційно-індуцибельно.

Вперше отримана нелінійна двохпікова дозова залежність транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у тканинах розеткових листків рослин арабідопсису, опромінених сублетальними дозами рентгенівської радіації у інтервалі 3-21 Гр.

Вперше показано, що фракціоноване опромінення менш ефективно індукує експресію генів репарації ДНК *AtKu70* та *AtRAD51* у порівнянні з одноразовим опроміненням при сублетальних дозах 3 Гр та 21 Гр, але при інших дозах інтервалу 6-15 Гр ефективність повторюваного (фракціонованого) опромінення щодо індукції генів *AtKu70* та *AtRAD51* є співставною або вищою, ніж при одноразовому опроміненні у тій самій дозі. При режимі повторюваного опромінення виявлена більш висока статистично достовірна кореляція між активністю генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та морфометричними показниками у пострадіаційний період, ніж при одноразовому опроміненні.

Отримано нові дані на користь існування двох відмінних за радіочутливістю субпопуляцій рослинних клітин, які відіграють різну роль у пострадіаційному відновленні та радіаційній стимуляції, що зумовлює характерну двохпікову залежність «доза-ефект».

Показано, що за низкою біохімічних маркерів опромінення рідкоіонізуючою радіацією у сублетальній дозі 21 Гр призводить до прискореного старіння листків рослин. Зокрема, в листках зростає

співвідношення бета-структурних і альфа-спіральних доменів білків та зменшується їх загальний вміст, знижується питома концентрація нуклеїнових кислот та ліпідів, відбувається заміщення пектину та лігніну целюлозою й геміцелюлозою, відкладається крохмаль, відбувається модифікація складу жирних кислот кутину, руйнується хлорофіл і накопичуються пурпурово-фіолетові пігменти.

Запропонована пояснювальна модель регуляції ранньої транскрипційної відповіді ключових генів репарації ДНК на іонізуюче опромінення.

На основі отриманих результатів запропоновано використання підвищеного рівня активності гена *Rad1* (*UVH1*) в якості маркера радіаційно індукovanого арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *Ef1a* – як характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. В той же час показані обмеження застосування транскрипційної активності гена *RAD51* як маркера рівня пошкоджень ДНК у клітинах цілої рослини чи органу. Запропоновано додатковий індекс $I_{DDR} = (TA_D(AtKu70) - TA_D(AtRad1)) - (TA_0(AtKu70) - TA_0(AtRad1))$, де TA_D – транскрипційна активність відповідного гена при дозі опромінення D , TA_0 – транскрипційна активність відповідного гена за відсутності дії іонізуючого опромінення. Індекс I_{DDR} корелює із стимулюючим впливом рідкоіонізуючого опромінення у сублетальних дозах та відображає індукцію DDR відповіді.

Вперше встановлено, що змінена опроміненням у сублетальних дозах активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* може зберігатись у нащадків першого покоління, а модифікована активність гена *AtKu70* не успадковується. Успадкування зміненої активності генів репарації позначається на частці дочірніх рослин з морфологічними аномаліями.

Вперше показано, що мутанти *Atmsh2*^{-/-} є більш чутливими у порівнянні з рослинами генотипу *Atmsh2*^{+/+} до дії одноразового, але не повторюваного та хронічного іонізуючого опромінення у сублетальних дозах. Продемонстрована самотійна роль продукту гена *Atmsh2* у пострадіаційній репарації ДНК, а також його взаємодія з продуктами генів *AtRad1* та *AtRAD51*.

Практичне значення отриманих результатів. Експериментальні дані показали, що підбираючи режим та дозу іонізуючого опромінення можливо модулювати транскрипцію генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* з метою зміни їх експресії. Спрямована зміна патернів експресії генів підтримки цілісності геному дасть можливість модифікувати такі значущі характеристики рослин як рівень мутабільності та компетентність до генетичних маніпуляцій, зокрема, до трансгенної трансформації.

На основі отриманих результатів запропоновано використання підвищеного рівня експресії гена *Rad1* як маркера радіаційно індукованого арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *Ef1a* – в якості характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. Введено індекс I_{DDR} , що розраховується на основі співвідношення активності генів репарації ДНК *AtKu70* і *AtRad1* та відображає радіаційну індукцію DDR відповіді.

В перспективі результати можуть сприяти оптимізації протоколів культивування рослин в умовах космічних місій та програм.

Результати дисертаційної роботи можуть бути використані при викладанні навчальних дисциплін та спеціальних курсів у вищих навчальних закладах.

Особистий внесок здобувача. Здобувач здійснив самостійний аналіз літератури за темою дисертаційної роботи, оволодів необхідними методами, методиками, практичними навиками дослідження, планування та проведення експериментів, аналізу й обробки даних, підготовки до друку наукових робіт. Вибір об'єкту і напрямку досліджень проведено спільно з науковим керівником – д.б.н. Н. М. Рашидовим. Результати дисертаційної роботи отримані автором самостійно або спільно зі співробітниками ІКБГІ НАН України, які є співавторами публікацій. Особистий внесок дисертанта становить понад 75%.

Здобувач висловлює подяку співробітнику Національного Інституту Раку А.Ю.Перебуді, під керівництвом якого здійснювалось опромінення об'єктів

дослідження, н.с. Інституту геронтології імені Д.Ф.Чеботарьова НАМН України Т.І.Махній та н.с. Інституту геронтології імені Д.Ф.Чеботарьова НАМН України В.М.Кухарському за консультації щодо експлуатації FTIR-спектрометра, колегам з Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за конструктивну критику, слушні зауваження та пропозиції щодо написання й оформлення дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційного дослідження були представлені та обговорені на Міжнародній конференції молодих учених "Актуальні проблеми ботаніки та екології" (Умань, Україна, 2014 р.), VII З'їзді по радіаційним дослідженням (радіобіологія, радіоекологія, радіаційна безпека) (Москва, РФ, 2014 р.), Міжнародній конференції молодих учених «Today's challenges in molecular and cell biology» (CYS-2015) (Київ, Україна, 2015 р.), VI з'їзді Радіобіологічного товариства України (Київ, Україна, 2015 р.), на засіданні Київського відділення Біофізичного товариства України (Київ, Україна, 2016 р.), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм» (Долина, Україна, 2016 р.), XXIII-XXVI щорічних наукових конференціях Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, Україна, 2016-2019 рр.), X Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2016 р.), Міжнародній конференції молодих учених "Актуальні проблеми ботаніки та екології" (Херсон, Україна, 2016 р.), Науково-практичній конференції із міжнародною участю "Радіоекологія-2017" (Київ, Україна, 2017 р.), Третій конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, Україна, 2017 р.), Науково-практичному семінарі з міжнародною участю "Stress factors and secondary metabolites" (Київ, Україна, 2017 р.), Міжнародному симпозіумі по Євро-Азіатському біорізноманіттю SEAB 2018, (Київ, Україна, 2018 р.), на звітних і наукових семінарах відділу біофізики та радіобіології ІКБГІ НАН України.

Публікації. Результати проведених досліджень викладені у 25 наукових публікаціях, з них 7 статей у фахових журналах (2 в іноземних журналах), розділ колективної монографії, 17 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та всеукраїнських конференцій.

Структура і обсяг роботи. Робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, трьох розділів з описом результатів експериментальних досліджень, узагальнення, висновків, списку використаної літератури (202 найменування), з яких 168 англомовних. Дисертація викладена на 199 сторінках друкованого тексту (основного тексту 148 сторінок) й містить 32 рисунки і 16 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МОЛЕКУЛЯРНОГО ТА ОРГАНІЗМЕНОГО РІВНІВ ФОРМУВАННЯ ВІДПОВІДІ РОСЛИН НА ОПРОМІНЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Радіобіологічні ефекти з позицій системної біології

Перманентна адаптація до постійно мінливих умов середовища є однією з найважливіших властивостей живих організмів. Пристосувальні реакції спостерігаються на всіх структурно-функціональних рівнях живого від молекулярних систем клітини до цілісного організму. Між адаптивними процесами в структурних одиницях як одного і того ж, так і різних рівнів існує складна взаємодія і координація, які забезпечують системний характер відповіді на значущі відхилення середовища від оптимального [32;176;197]. Головною пристосувальною стратегією рослин і в значній мірі грибів, серед яких більшість видів представлено нерухомими формами, є фізіологічна адаптація [173;176;177;199]. Цим вони відрізняються від тварин, для яких не меншу, якщо не більшу роль відіграє активне переміщення в просторі, спрямоване на пошук ніш з оптимальними абіотичними та біотичними умовами. Властива рослинам фізіологічна адаптація забезпечує пристосування не тільки до непередбачуваних аперіодичних факторів, а й до періодичних впливів.

В основі фізіологічної адаптації лежить спрямована модифікація клітинного метаболізму і міжклітинних сигнальних комунікацій, тобто молекулярно-біологічні процеси [173]. Ці процеси реалізуються на рівні геному (хроматин, хромосоми, гени), транскриптому (різні види кодуючих і некодуючих РНК) і протеому (сукупність білків, що виконують певні біологічні функції). Адаптація роботи молекулярних механізмів досягається шляхом хімічних модифікацій макромолекул – метилування і деметилування нуклеотидів ДНК, ацетилювання/деацетилювання гістонів, посттрансляційних

модифікацій поліпептидів, фосфорилювання і дефосфорилювання білків і т.п. В кінцевому рахунку вся сукупність ініційованих впливами середовища молекулярних реакцій спрямована на модифікацію морфо-фізіологічної організації рослинного організму з метою забезпечення нормальної життєдіяльності, виживання та відтворення. Незважаючи на те, що в основі пристосувальних змін лежать молекулярні механізми, вони здійснюються на всіх рівнях організації складної живої системи, яку являє собою вища рослина.

Комплексне вивчення взаємодії та координації рівнів реакції на фактори середовища має велику наукову і практичну цінність, однак пов'язане з цілою низкою труднощів методичного характеру. Тому в сучасній молекулярній біології домінує редуccionістська методологія: кожен з рівнів або процесів за умовчанням розглядають як ізольований від інших чинник, що дає більший або менший внесок в суму пристосувальних реакцій, які проявляються в адаптації організму до певних умов середовища. З огляду на це велике значення набуває підхід, згідно з яким вивчають зв'язок між молекулярними та клітинними процесами і реакціями організменого рівня.

Дуже зручним інструментом може виступати методологія сучасної радіобіології, яка ґрунтується на засадах і принципах системної біології [32]. Індуковані пошкодження ДНК як один із основних ефектів іонізуючого опромінення дають можливість відстежити каскад подій від елементарних актів взаємодії квантів енергії з атомами живої речовини та молекулярних перетворень до цитогенетичних, цитологічних, тканинних, морфофункціональних змін, модифікацій фенотипу.

Системна парадигма у радіобіології рослин має глибоке коріння. Серед радянських та сучасних українських вчених в її річищі працювали Б.М.Тарусов, О.М.Кузін, І.М.Васильєв, В.М.Савін, Д.М.Гродзинський разом із своїми колегами та учнями І.М.Гудковим, К.Д.Коломієць, Ю.О.Кутлахмедовим, А.А.Булахом, О.П.Дмитрієвим, О.П.Кравець, О.М.Міхєєвим, Н.М.Рашидовим та іншими [173-177;193-195;197]. Головний здобуток цих досліджень полягає в тому, що в сучасній радіобіологічній науці утвердився принцип нерозривного

зв'язку та ієрархії рівнів реалізації реакції живої системи на дію опромінення. У відношенні до наукової проблеми даного дослідження це означає, що завдяки системним зворотним зв'язкам та ефекту підсилювача навіть нелетальні пошкодження ДНК обов'язково повинні реалізовуватись на вищих щаблях структурно-функціональної організації рослинного організму, в тому числі за рахунок механізмів їх розпізнавання та репарації як модифікаторів ефективності пострадіаційного відновлення росту, розвитку і розмноження.

Слід зазначити, що наповнення конкретним змістом формальних понять радіобіології, зокрема таких як «модифікатор», «зворотний зв'язок», «підсилювач» і т.п. є одним з найважливіших завдань наукового пошуку [201]. Ми вважаємо за потрібне звести теоретичні принципи системної радіобіології ефектів іонізуючого опромінення до низки постулатів, які ми будемо використовувати для інтерпретації та пояснення власних даних. Серед них можна виділити наступні положення:

1. Тригером радіобіологічних ефектів є первинні пошкодження біологічно значущих макромолекул та субклітинних структур. Внаслідок поглинання енергії іонізуючого випромінювання біологічними об'єктами виникає цілий спектр первинних пошкоджень, які можна описати розподілом Пуассона [186;201].
2. На різних щаблях структурно-функціональної організації радіація вражає різні мішені (критичні структури та процеси): на молекулярному рівні – ліпіди, ДНК, білки, на клітинному та тканинному – активні меристеми, на органному – радіочутливі органи, на організменому – механізми регуляції росту й розвитку, особливо на перехідних етапах онтогенезу [174].
3. Кожному рівню ієрархії біологічної системи відповідає власна адекватна міра радіобіологічного ефекту. Зв'язок між рівнями можна досліджувати шляхом вивчення зв'язків між показниками, що відображають стан об'єкту на відповідному структурно-функціональному рівні [174;175].
4. Картина ураження на кожному рівні розвивається на основі властивих йому структурних одиниць та виконуваних ними функцій, проте вона є

якісною реалізацією тих кількісних змін, які мали місце на нижчому рівні [175]. В основі зазначеної реалізації лежить механізм модифікації пошкоджень, зокрема так званий принцип посилювача.

5. Розвиток ураження та відновлення характеризується не тільки статичною величиною – рівнем чи ефективністю, але й власною динамікою, що характеризує перехід біологічної системи від одного метастабільного стану до іншого. Тому пострадіаційне відновлення – це завжди перехідний процес [177;195].
6. Існує глибока аналогія між процесами саморегуляції і відновлення біологічних систем та роботою технічних систем автоматичного регулювання. Тому по відношенню до них може бути застосований добре розроблений апарат понять та методів теорії надійності [193-195].
7. Рослина не є пасивним об'єктом, який зазнає радіаційних пошкоджень, вона активно реагує на дію іонізуючого опромінення, адаптуючись до шкідливої дії радіаційного чинника [173].
8. Рівні відповіді рослинного організму на іонізуючу радіацію являють собою ієрархічну інтегровану систему [174].

Застосування наведених принципів, на наш погляд, дозволяє найбільш повно й узгоджено описати дію опромінення на рослини та процеси їх пострадіаційного відновлення.

1.2. Дія радіації на організм рослин

1.2.1. Летальні та сублетальні дози опромінення

Від самого початку радіобіологічних досліджень стала зрозумілою ключова роль дози іонізуючого опромінення [40;172;174;199]. Розкриття механізмів первинної дії радіації на атоми та молекули в живих клітинах призвело до введення поняття поглинутої дози поряд із експозиційною дозою, яка характеризує іонізаційну здатність випромінювання [186]. Для

рідкоіонізуючої радіації поглинена доза за визначенням є еквівалентною дозою. У випадку тварин та людини біологічно ефективні дози опромінення прийнято оцінювати в одиницях еквівалентної дози, Зівертах (Зв) [174]. Проте щодо рослинних об'єктів така практика не є загальноприйнятою. Тому в подальшому ми будемо подавати всі дозові навантаження в одиницях експозиційної дози, маючи на увазі те, що у випадку рентгенівських променів і гамма-випромінювання 1 Гр поглинутої дози дорівнює 1 Зв еквівалентної дози.

Діапазон біологічно ефективних доз іонізуючої радіації поділяють на три інтервали: сублетальні, летальні та надлетальні дози [174]. При летальних дозах через різний час після опромінення, але завжди значно менший за тривалість життєвого циклу, настає загибель певної частки опромінених рослин, причому тим більшої, чим більшою є поглинута доза радіації. Виділяють дві форми загибелі. За менших летальних доз може наступати проліферативна загибель, коли рослини зберігають життєздатність, проте не ростуть і не розвиваються внаслідок інактивації меристем (γ -проростки) [172;174]. При більших дозах, що для більшості рослин складають від сотень до тисяч Гр реалізується сценарій справжньої або метаболічної загибелі [172]. Ще більші, надлетальні дозові навантаження також призводять до загибелі, але за більш короткий проміжок часу, аж до так званої «смерті під променем».

Проте найбільший інтерес з точки зору індукції різноманітних радіобіологічних ефектів являють сублетальні, тобто менші за летальні дози іонізуючої радіації. В діапазоні сублетальних дозових навантажень спостерігаються пригнічення та стимуляція життєвих процесів рослин, радіаційний мутагенез, радіоадаптація, радіосенсибілізація, радіаційно індукована нестабільність геному. Як вважається, в основі більшості цих ефектів прямо чи опосередковано лежить гено- і цитотоксична дія іонізуючого опромінення.

1.2.2. Генотоксичний ефект рідкоіонізуючої радіації

На радіаційно-хімічній стадії дії іонізуючого опромінення на живу клітину відбувається перетворення енергії іонізованих випромінюванням атомів та вільних електронів на хімічну енергію новоутворених зв'язків у структурі біологічно важливих молекул. Особливо значущими і тому вразливими для радіаційно-хімічних пошкоджень є унікальні матричні носії спадкової інформації – молекули ДНК та комплекси, до яких вони входять: нуклеосоми, хроматиди, хромосоми, хроматин ядра еукаріот [201].

До основних радіаційно-хімічних модифікацій ДНК відносять: радіоліз тиміну, цитозину, аденіну, гуаніну; утворення апуринових та апіримідинових сайтів (АП-сайтів); ДНК-аддукти; транзиції та трансверсії основ; одониткові та двониткові розриви ДНК; зшивки ДНК-ДНК і ДНК-білок. Більша частина пошкоджень ДНК має спонтанний, метаболічний характер. Відзначимо, що протягом доби в живих клітинах виникають десятки тисяч пошкоджень, спектр яких, проте, відрізняється від пошкоджень, індукованих іонізуючим опроміненням (переважають оксигенація основ, апуринізація та апіримідинізація, одониткові розриви у цукро-фосфатному остові молекули ДНК, утворення ДНК-аддуктів, деамінація цитозину) [19;28;39;174;201]. Існування живих організмів було б неможливе, якби ці пошкодження не детектували і не виправляли специфічні ферментативні системи репарації ДНК, відкриті Т.Ліндалем, П.Модричем і А.Санкаром [19;39]. Поклітинна репарація ДНК була описана для УФ-індукованих пошкоджень у 1948 р. А.Кельнером, а для пошкоджень, індукованих іонізуючим опроміненням – у 60-ті рр. ХХ ст. Е.Холлом, Л.Лайсою, Р. Хайнесом та незалежно від них В.І.Корогодіним [174].

В зв'язку з тим, що при невеликих дозах опромінення середній вихід пошкоджень ДНК менше спонтанного рівня, проте ці дози ефективно індукують хромосомні аберації, була висловлена гіпотеза про кластерний характер радіаційних пошкоджень ДНК. Суть її полягає в тому, що велика

кількість пошкоджень, сконцентрована у ділянці ДНК малої довжини (кластері) ускладнює або унеможлиблює відновлення нативної структури ДНК-дуплексу ферментативними системами репарації.

Виділяють первинні та вторинні пошкодження, які формуються внаслідок дії на ДНК радіотоксинів, зокрема продуктів ПОЛ. Іншим джерелом вторинних пошкоджень є знижена ефективність систем репарації ДНК, яка є наслідком неповної репарації (наприклад, після видалення пошкодженого нуклеотиду не відбувається матричний репаративний синтез або лігування кінців розриву), помилок точної репарації (нерівна гомологічна рекомбінація), активації мутагенних шляхів репарації (NHEJ, SSA, MMEJ, TLS) [4;6;11;14;20;28;37;58;59;63;65;70;93;95;120;121;140;149;150;159;170]. Варто зазначити, що з чотирьох відомих сьогодні помилкових шляхів репарації пошкоджень ДНК три – NHEJ, SSA, MMEJ беруть участь у відновленні цілісності хроматид в сайті дволанцюгового розриву [8;34;46;58;62;73;75;94;101;126;132;138].

За своїм значенням для виживання інтерфазної клітини індуковані пошкодження ДНК поділяють на сублетальні, потенційно летальні та летальні (нерепарабельні) пошкодження. Як сублетальні, так і потенційно летальні пошкодження можуть бути репаровані ферментними системами, проте якщо репарація виявилась неефективною, то до загибелі клітини призводять тільки летальні пошкодження, наприклад, розриви хромосом та нестійкі хромосомні аберації під час мітозу [179]. Основними сублетальними пошкодженнями ДНК, які виникають після дії опромінення з низькою ЛПЕ, є одноланцюгові розриви ДНК, а основними потенційно летальними пошкодженнями – дволанцюгові розриви. Ці розриви можуть бути первинними або вторинними, ензиматичними, тобто такими, що утворюються внаслідок активності репаративних ферментів, зокрема, ексцизійних ендонуклеаз.

Хімічна природа первинних пошкоджень не визначається інтервалом доз, під дією яких вони виникають. При всіх дозах рідко іонізуючого опромінення мають місце сублетальні пошкодження, яких набагато більше, ніж потенційно

летальних та летальних. Також при будь-якій сублетальній дозі існує імовірність виникнення потенційно летальних пошкоджень та їх перетворення на летальні в подальшому. При фракціонуванні дози і при хронічному опроміненні два незалежних близько розташованих у одній хроматиді сублетальних пошкодження можуть утворити одне потенційно летальне [174].

Завдяки своїй ролі бар'єру перетворення сублетальних пошкоджень на летальні системи репарації ДНК є високо консервативними серед усіх еукаріот. Проте механізми їх активації та регуляції активності специфічні, тому існують певні особливості, притаманні пострадіаційному відновленню ДНК рослинних клітин [16;19;26;131;143;147;153;165].

Оскільки розриви ДНК є основними індукованими іонізуючою радіацією пошкодженнями, які зумовлюють гено- й цитогенетичні ефекти, точна і своєчасна репарація саме цих типів пошкоджень визначає долю опромінених клітин [80]. Проте існує відносно небагато робіт, в яких розглядається значення активності систем репарації розривів ДНК для розвитку рослин після опромінення сублетальними дозами радіації [81;82;185;91;131].

1.2.3. Радіаційна стимуляція життєвих процесів

Після опромінення сублетальними дозами іонізуючої радіації, вищими за стимулюючі, спостерігається пригнічення росту та темпів розвитку рослин. При цьому основні метаболічні процеси є досить радіостійкими [172-174]. Крім того, пригнічення ростових процесів часто супроводжується активізацією накопичення сухої речовини в листках, підвищенням синтезу вторинних метаболітів і зростанням стійкості до відхилення зовнішніх умов від фізіологічного оптимуму [172;199]. Інгібування росту або розвитку може бути постійним або, частіше, тимчасовим. Причому останній випадок є досить поширеним навіть при невеликих дозах, якими опромінюють рослини на критичних стадіях розвитку, коли здійснюється детермінація та ініціація

меристем нових органів. Отже, клітинна диференціація й загалом морфогенез є радіочутливими процесами.

Внаслідок дії на рослини радіації в дозах, менших за інгібуючі, часто досягається тимчасова, іноді досить тривала стимуляція росту, цвітіння, морфогенезу, фотосинтезу, синтезу ДНК, РНК і білків [172;177;198;199]. Відзначимо відносний, частковий характер цієї стимуляції: в той час як певні процеси активізуються та прискорюються під впливом радіації, інші пригнічуються або уповільнюються. Іноді виділяють два типи радіостимуляції [177;198;199]:

- 1) Транзитивну, яка проявляється тільки на ранніх стадіях онтогенезу і полягає у прискореному розвитку до досягнення рослинами межі вегетативної фази. В наступний період ефект радіостимуляції не проявляється і наприкінці вегетації стимульовані рослини значуще не відрізняються від контрольних.
- 2) Термінальну (радіаційний гормезис), що зберігається протягом всього вегетаційного періоду та супроводжується загальним підвищенням продуктивності. Саме цей тип стимуляції має найбільше господарське значення та при цьому є найменш стабільним та відтворюваним, оскільки суттєво залежить від фізіологічного стану рослин на момент опромінення та від умов їх вирощування.

Щодо тотожності або відмінності механізмів, що зумовлюють названі типи стимуляції, надійних даних у сучасній радіобіології не існує. Натомість висунута ціла низка гіпотез, які пояснюють феномен радіостимуляції рослин рідкоіонізуючою радіацією. Серед них можна виділити гіпотезу «подразнюючої» дії невеликих доз радіації (І.М.Васильєв [172]), гіпотезу модифікації ендогенного фону радіорезистентності (Ю.Б.Кудряшов, О.М.Гончаренко [174]), гіпотезу компенсаторного посилення матричного синтезу під впливом тригер-ефекторів – хінонів, продуктів радіолізу поліфенолів (О.М.Кузін [172;174]), гіпотезу активізації клітинних поділів (Л.П.Бреславець [172;174]) та інші. Названі гіпотези можуть пояснювати

ефекти, рознесені в часі та локалізовані на різних рівнях структурно-функціональної організації рослини. До того ж, для різних таксономічних груп і видів рослин, навіть для різних стадій їх онтогенезу різні механізми можуть мати більшу чи меншу значущість [199]. Спільними моментами всіх гіпотез є визнання радіаційних пошкоджень тригером радіостимуляції, наголос на активному характері відповіді, яка проявляється у формі підвищення інтенсивності та/або швидкості життєвих процесів, а також явне або неявне припущення про дію «принципу посилювача».

Отже, основні гіпотези механізму радіостимулюючого впливу сублетальних доз іонізуючого опромінення відповідають положенням системного підходу, викладеним у підрозділі 1.1. Тому логічно розглядати їх як складові системної моделі радіостимуляції. Тоді можна уникнути дискусії про правильність лише однієї гіпотези механізму радіостимуляції та констатувати, що причиною «гормезисної» дії іонізуючої радіації у дозах, менших за інгібуючі, є її генотоксичні та цитотоксичні ефекти, які запускають певні сигнально-ефекторні шляхи клітинної, тканинної та організмової відповіді на пошкодження. Ця відповідь на певному етапі перехідного процесу в біологічній системі може набувати характеру гіперкомпенсаторної реакції чи «гіперадаптації» [177;198]. Стимуляція має місце за всіх доз, проте при високих дозових навантаженнях не проявляється через пригнічення поділу клітин та пластичного обміну. Імовірно, що у формування або прояв ефекту радіостимуляції на клітинному рівні може бути залучена індукція генів, серед яких і гени ферментів репарації ДНК.

Варто підкреслити, що радіостимуляція окремих життєвих процесів в організмі рослин не означає існування безпечного рівня дозових навантажень, адже ці дози є також ефективними індукторами нестабільності геному та стохастичних мутацій, які збільшують мутаційний та генетичний тягар популяції.

1.2.4. Радіоадаптація та радіаційно індукована нестабільність геному

Явище радіоадаптації або ж адаптивної відповіді на опромінення феноменологічно полягає у збільшенні стійкості біологічного об'єкту до великих (інгібуючих або летальних) доз опромінення, якщо за певний час до того він був опромінений меншою, як правило, сублетальною дозою радіації [173;174]. Здатність до радіоадаптації вперше була виявлена приблизно в один і той самий час у *Escherichia coli* та лімфоцитів людини в культурі *in vitro*. Пізніше була продемонстрована широка розповсюдженість явища радіоадаптації та універсальність механізму формування адаптивної відповіді клітин на дію радіації. Цим механізмом виявилась індукцйбельна репарація ДНК, яка активується у відповідь на потенційно летальні пошкодження.

Виявилось, що адаптивна реакція виникає не тільки на одноразову дію адаптуючої дози, але й на дію повторюваного, пролонгованого та хронічного опромінення [13].

Для всіх форм адаптивної відповіді характерні наступні особливості:

1. радіоадаптація не виявляється при дії випромінювання з високою ЛПЕ – альфа-часток, високоенергетичних протонів і ядер;
2. для виникнення радіоадаптації потрібна адаптуюча доза опромінення, яка не виходить за межі певного дозового інтервалу, який близький або тотожний інтервалу стимулюючих доз;
3. формування адаптивної відповіді потребує часу (декілька годин), її тривалість корелює з тривалістю збереження стимулюючого ефекту адаптуючої дози рідкоіонізуючої радіації.

Наведені властивості дають підстави для припущення про активацією експресії певних генів у відповідь на опромінення як молекулярного механізму формування адаптивної відповіді. В ході сучасних досліджень встановлено, що в еукаріот радіоадаптацію забезпечують системи відповіді клітин на пошкодження ДНК (DDR – DNA damage response) та толерантності до пошкоджень ДНК (DDT – DNA damage tolerance).

Зворотною стороною механізму формування адаптації до повторної дії опромінення слід вважати радіаційно індуковану нестабільність геному (РІНГ). Механізми РІНГ можна розглядати в якості втілення «принципу посилювача» щодо цитогенетичних пошкоджень. В основі індукованої опроміненням нестабільності геному може лежати активація швидких мутагенних шляхів репарації потенційно летальних дволанцюгових розривів ДНК поряд із одночасним (можливо, конкурентним) пригніченням шляхів безпомилкової, але повільної репарації, що призводить до мутацій, нестабільності теломер та експансії гіперваріабельних мікросателітних повторів. В контексті даної роботи явище РІНГ цікаве тим, що пояснює довгострокові негативні ефекти впливу іонізуючого опромінення на рослини, в тому числі і пов'язані з формуванням морфологічних аномалій.

Отже, на підставі вищезазначеного можна зробити висновок, що крім прямої індукції пошкоджень ДНК рідкоіонізуюча радіація здатна призводити як до адаптивної відповіді, так і до нестабільності геному опромінених рослин.

1.3. Індуковані радіацією пошкодження ДНК та подальша доля клітини

1.3.1. DDR-сигналінг в клітинах рослин

Як уже було відмічен, рослини в цілому є більш радіостійкими організмами в порівнянні з тваринами, однак їх чутливість до пролонгованого, повторюваного або хронічного іонізуючого опромінення значно менше відрізняється від радіочутливості тваринних організмів. Причини зазначених подібностей і відмінностей в біологічній дії радіації на рослинні і тваринні об'єкти залишається не зовсім зрозумілими, адже відповідно до сучасних уявлень основні білки і ферментативні шляхи репарації розривів ДНК є консервативними серед усіх еукаріот [165]. Виходячи з цього можна припустити, що модифікація радіочутливості рослинних клітин під дією

випромінювання хоча б частково може бути обумовлена особливостями регуляції транскрипційної активності генів підтримки цілісності геному, подібно до того, як це відбувається в клітинах ссавців [92;131;165].

Клітини, які зазнали дії іонізуючої радіації, здатні активно реагувати на індуковані нею пошкодження – розпізнавати їх та активувати ферменти, що забезпечують відновлення пошкоджених молекул, в першу чергу ДНК. Інтегральну біохімічну відповідь клітини на зміни нативної структури та хімічного складу ДНК, яка проявляється у зміні метаболізму та активації захисних білкових систем, в англомовній літературі називають DDR (DNA damage response). Складовими цієї відповіді є транскрипційна відповідь, зупинка клітинного циклу, програмована загибель клітини [27;92;165]. DDR, на відміну від конститутивних глобальної геномної репарації, репарації під час транскрипції, постреплікативної репарації, активується внаслідок появи особливого типу пошкоджень, які потенційно загрожують життєздатності клітини – розривів ДНК, в першу чергу двониткових.

В останні роки з'являються дані, які свідчать про суттєві та тривалі зміни протеому рослин, геном яких містить розриви ДНК, а також про здатність рослинних клітин до диференціації, дедиференціації та трансдиференціації [81;82;92;165]. Цитологічні дослідження вказують на зміну морфології живих клітин та субклітинних структур після впливу генотоксичних факторів [172;174-176]. Наявні дані демонструють, що DDR-відповідь призводить до появи клітин із зміненим фенотипом. Ця закономірність, притаманна клітинному рівню організації, відповідно до принципів системної радіобіології має проявлятися і на організменому рівні – тобто під впливом радіації у дозах, що викликають DDR, мають спостерігатись зміни нормальної морфології та фізіології цілої рослини.

Транскрипційна відповідь на генотоксичні пошкодження є однією з ключових ланок реакції клітин та цілих рослин на дію іонізуючого опромінення. При цьому транскрипційна активність ізольованих клітин, культури тканин і органів *in vitro* та клітин у складі органів нормально

функціонуючого рослинного організму можуть суттєво відрізнятися. Тому дослідження транскрипційної відповіді *in vivo* має важливе наукове значення. DDR-транскрипційна відповідь є ранньою реакцією, яка проявляється вже у часовому інтервалі 1-3 год після дії генотоксичного чинника [81]. В контексті наукової проблеми даної дисертаційної роботи важливо було вивчити саме ранню відповідь ключових генів підтримки стабільності геному на іонізуюче опромінення як складову DDR та фактор ефективного пострадіаційного відновлення нормальної життєдіяльності рослин, оскільки білки ранньої відповіді задіяні в елімінації індукованих радіацією потенційно летальних пошкоджень, які не можуть існувати в клітині довгий час, не викликавши її загибелі.

У бактерій за транскрипційну відповідь на пошкодження ДНК відповідає так звана репаративна SOS-система. Цей сигнально-ефекторний шлях ініціюється одонитковою ДНК, яка, взаємодіючи з рекомбіназою RecA (гомолог RAD51 у еукаріот), інактивує білок-репресор LexA. Останній дисоціює з промоторів генів основних ферментів SOS-репарації ДНК, тобто індукує відповідні ефекторні шляхи SOS-репаративної системи. До них належать гомологічна рекомбінація, ексцизійна репарація нуклеотидів, мутагенний транслейжн синтез.

DDR-транскрипційна відповідь еукаріот має як спільні риси, так і суттєві відмінності від SOS-системи прокаріотичних організмів. Так, ключовою ланкою, що визначає долю клітини ссавців з пошкодженою ДНК, є білок p53, який іноді називають «охоронцем геному» [64;162]. Цей білок контролює взаємодію з регулятором клітинного циклу p21, факторами апоптозу PUMA, NOXA, BAX, а також з компонентами систем ексцизійної репарації нуклеотидів (білки CSB, DDB2 та XPC), основ (APE1 і OGG1), ковалентних зшивок між ланцюгами ДНК (білок FANCC), репарації помилково спарених нуклеотидів нуклеотидів (MSH2, MLH1, PMS2) [39;103]. Крім того, p53 безпосередньо розпізнає місметчі та структури Холлідея, інгібуючи при цьому HR- і NHEJ-шляхи репарації [67]. Показано, що транскрипційна активація багатьох

важливих генів систем репарації дволанцюгових розривів, зокрема таких як *BRCA2*, *Rad51* та *Mre11*, здійснюється білками родини p53 – p63 та p73 [78].

У рослин замість гомолога p53 діє його функціональний аналог SOG1 [143;147]. Тому регуляція програмованої клітинної загибелі (ПКЗ) і зупинки клітинного циклу у відповідь на генотоксичні впливи, а також вибір між ПКЗ і репарацією пошкоджень ДНК в рослинних клітинах відрізняється від системи регуляції, яка існує в клітинах тварин. SOG1 є специфічним транскрипційним фактором, який активується ATM-, і ATR- залежною протеїнкіназою й регулює експресію важливих репаративних білків DDB2, XPC (ексцизійна репарація), MSH2 (репарація місметчів) та інших [92;165].

Фосфорилювання і активація SOG1 у відповідь на пошкодження ДНК здійснюється чекпойнт кіназою ATM і, меншою мірою, ATR. У свою чергу ATM як сенсор двониткових розривів ДНК приєднується до сайту ДР за допомогою MRN-комплексу, де зазнає автофосфорилювання і після цього активує білкові медіатори та ампліфікатори сигналу пошкодження ДНК [135;137;153]. Білок ATM є ключовим регулятором як Mre11-залежного процесингу кінців ДНК у сайті подвійного розриву, так і MMEJ-репарації [115].

1.3.2. Розриви ДНК як фактор індукції DDR-відповіді

SOG1 приймає участь у відповіді рослинних клітин на одноланцюгові та дволанцюгові пошкодження ДНК. Даний транскрипційний фактор активує білки шляхів репарації ДНК, зупинки клітинного циклу та програмованої клітинної загибелі – ключові ефектори DDR [92;153;165]. Проте SOG1-залежна транскрипційна активація всіх основних генів систем репарації ДНК відбувається тільки в клітинах, що містять дволанцюгові розриви, завдяки активації у сайтах ДР ДНК протеїнкінази ATM [183] (рис. 1.1). Водночас зупинка клітинного циклу та ПКЗ здійснюється після ATR-залежного фосфорилювання SOG1.

Одна з функцій транскрипційного фактора SOG1 – індукція транскрипції генів систем репарації ДНК. Доведено, що активація багатьох десятків репаративних генів є SOG1-залежною [92;165]. Серед них є декілька ключових генів, що забезпечують функціонування репарації розривів ДНК, а також шляхів, які генерують розриви та пробіли ДНК в якості інтермедіатів репарації, тобто тих пошкоджень, які ініціюють DDR. Зрозуміло, що саме активність зазначених генів визначає ефективність DDR-відповіді, а отже – відновлення нормального функціонування клітин і, можливо, органів та організму рослини в цілому. До цієї групи належать гени, що кодують критичні ферменти гомологічної рекомбінації, негомологічного з'єднання кінців, мутагенних шляхів репарації дволанцюгових розривів ДНК, ексцизійної репарації нуклеотидів, збереження стабільності теломер, забезпечення реплікації ДНК.

Серед багатьох протеїнів, задіяних в репарації ДНК, можна виділити еволюційно консервативні ферменти, критичні для функціонування генетичного апарату, які необхідні не тільки для відповіді на стресові генотоксичні впливи, а й для забезпечення нормального проходження клітин через контрольні точки циклу, підтримки стабільності теломер.

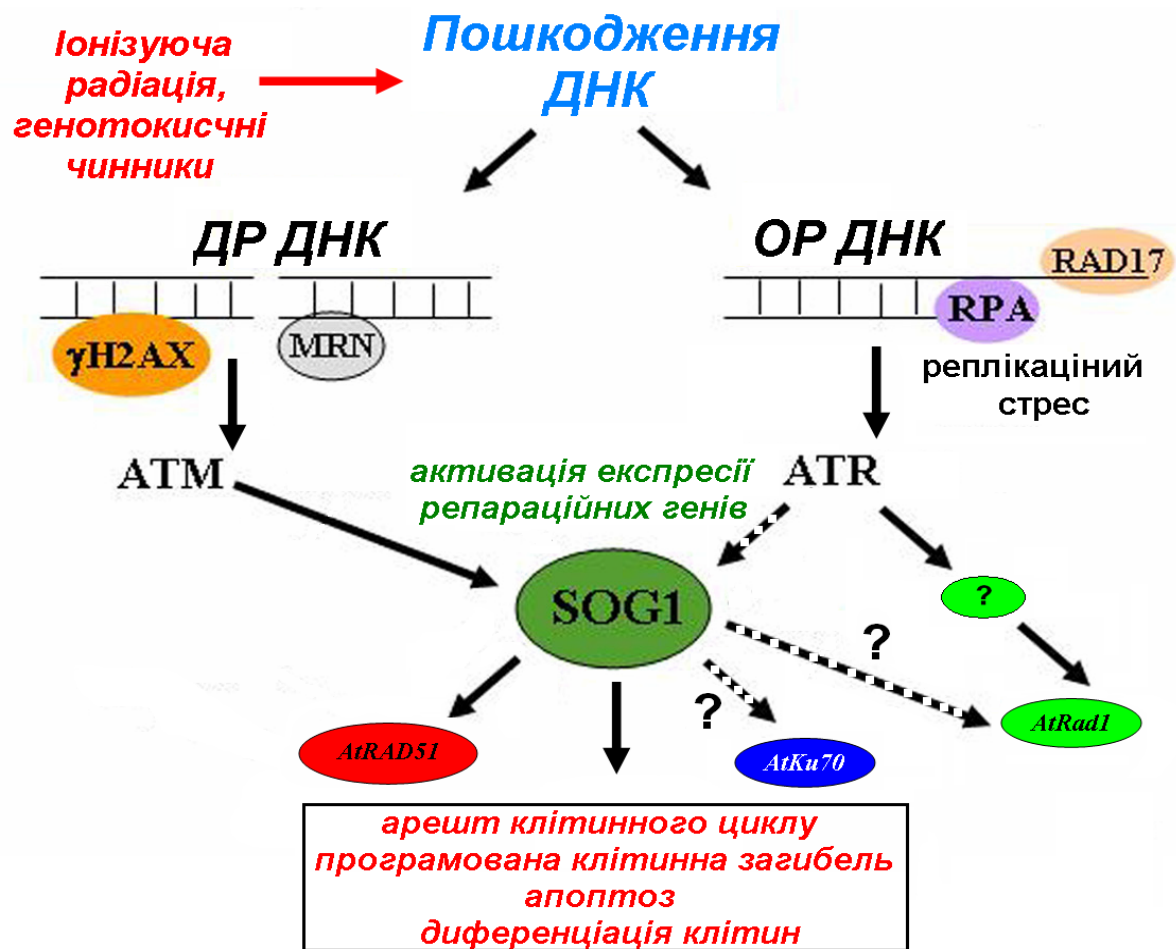


Рис. 1.1. Транскрипційна активація генів підтримки стабільності геному *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на пошкодження ДНК клітин *A.thaliana* іонізуючою радіацією як складова DDR-відповіді

Примітка. Схема узагальнює існуючі уявлення щодо індукції ключових генів індукованої репарації двониткових розривів ДНК еукаріот.

У всіх еукаріот до даного класу протеїнів можна віднести білки Ku70, Ku80, RAD51 і MSH2, які відіграють ключову роль у відновленні геномної ДНК, яка містить структурні пошкодження (рис. 1.2), зокрема у репарації потенційно летальних дволанцюгових розривів ДНК (таблиця 1.1). Крім того, рекомбіназа RAD51 репарує пробіли у ДНК, які виникають в результаті репаративної ексцизії пошкоджених нуклеотидів [87]. Подвійні делеційні мутанти за локусами *AtKu70* та *AtRAD51* мають знижену життєздатність і стерильні [65].

Велике значення в підтримці стабільності геному належить репаративній ендонуклеазі Rad1, задіяній у складі комплексу Rad10/RAD1 (гомологічний до комплексу ERCC1/XPF ссавців) в ексцизійній репарації нуклеотидів, але також необхідний для репарації одониткових розривів з хімічно модифікованими кінцями, зшивок ДНК-ДНК і ДНК-білок, для мутагенних SSA та MMEJ репарації двониткових розривів, для запобігання перебудовам теломер.

Таблиця 1.1

Ключові білки-маркери репарації пошкоджень структури геномної ДНК
еукаріот

Репаратив- ний білок	Локус	Функція	Молекулярні шляхи репарації ДНК	Субстрат	Посилання
AtKu70	<i>At1g16970</i>	Як складова гетеродимеру KU70/KU80 зв'язується з кінцями длДНК; захищає ДНК від екзонуклеаз; рекрутує репаративну машинерію NHEJ до сайту, що містить подвійний розрив ДНК	NHEJ; регуляція довжини теломер; індукція апоптозу	кінці длДНК по обидва боки подвійного розриву ДНК	[2; 3; 7; 15; 18; 19; 24; 33; 35; 36; 39; 43; 44; 52; 53; 55; 56; 57; 66; 69; 71; 76; 77; 80; 83; 88; 103; 107; 116; 118; 119; 128; 142; 143; 144; 147; 153; 154; 156; 163]
AtRAD51	<i>At5g20850</i>	Утворює філаменти на вільних 3'-кінцях олДНК у сайті подвійного розриву ДНК та забезпечує спарювання гомологічних хроматид	HR; репарація пропусків в ланцюгах ДНК; репарація подвійних розривів ДНК, що утворились внаслідок колапсу реплікаційної вилки; репарація міжланцюгових зшивок ДНК; репарація кластерних пошкоджень ДНК; мейотична рекомбінація; регуляція експресії генів та імунної відповіді рослин	3'-виступаючі кінці олДНК	[19; 26; 39; 55; 72; 74; 80; 87; 99; 103; 107; 110; 124; 133; 141; 143; 147; 153; 200]

Репаратив- ний білок	Локус	Функція	Молекулярні шляхи репарації ДНК	Субстрат	Посилання
AtRad1	<i>At5g41150</i>	Функціонує як 5'-репаративна ендонуклеаза	NER; SSA; MMEJ; Видалення некононічних структур ДНК в сайтах, які містять циклобутанові димери або піримідин-(6,4)-піримідинові фотопродукти; регуляція довжини теломер; репарація одониткових розривів; репарація внутрішньоланцюгових та міжланцюгових зшивок ДНК, зшивок ДНК-білок	5'-ланцюг на межі дволанцюгової та одноланцюгової ДНК	[9; 19; 31; 39; 54; 56; 61; 69; 86; 98; 103; 107; 116; 143; 146; 147; 153; 166; 168]
AtMSH2	<i>At3g18524</i>	Утворює гетеродимерну пару з AtMSH6 (комплекс MutS α) та AtMSH6 (комплекс MutS β)	Репарація помилково спарених та неспарених нуклеотидів; видалення некононічних структур ДНК, в т.ч. утворених пошкодженнями основ і нуклеотидів (BER, NER), хроматидними інсерціями, проковзуванням ДНК полімерази під час реплікації на матриці, яка містить тандемні повтори; запобігання нестабільності мікросателітів; кофактор відновлення цілісності ДНК у сайті ДР; участь у детекції міжланцюгових зшивок ДНК у складі сенсорного комплексу MutS α (MSH2–MSH6)	дволанцюгова ДНК, яка містить неспарені або помилково спарені нуклеотиди	[38; 39; 103; 143; 147; 153; 168]

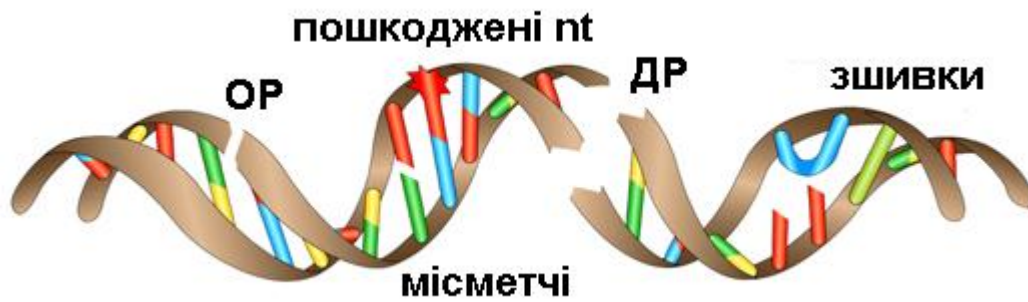


Рис. 1.2. Основні типи пошкоджень структури ДНК

Слід зазначити, що оскільки система ексцизійної репарації може видаляти з ДНК не тільки пошкоджені нуклеотиди, але також і пошкоджені основи, 5'-ендонуклеаза Rad1 здатна відновлювати пошкодження, які є субстратом для BER.

Мутантам *AtRad1*^{-/-} так само як і *AtKu70*^{-/-} та *AtRAD51*^{-/-} властива підвищена чутливість до іонізуючої радіації [19;65;143;153], яка індукує розриви ДНК. Крім того, рослини з генотипом *AtKu70*^{-/-} та *AtRAD51*^{-/-}, але не *AtRad1*^{-/-}, чутливі до хімічних агентів, що індукують розриви ДНК (переважно без модифікованих кінців), а мутанти по *AtRad1*^{-/-} – до ультрафіолетових променів. Разом узяті, ці дані показують, що кінці ланцюгів ДНК в сайті IP-індукованого розриву містять модифіковані нуклеотиди, які видаляє Rad1.

Відомо, що в результаті впливу іонізуючого випромінювання на геном утворюються первинні і вторинні (ензиматичні) одноланцюгові розриви та пробіли в молекулі ДНК. Репарація одониткових розривів здійснюється за PARP/XRCC1-залежним, а пробілів – за RAD51-залежним механізмом. Однак радіаційно-індуковані ОР-сайти часто містять хімічно модифіковані неспарені або неправильно спарені нуклеотиди, тому елімінація подібних ушкоджень вимагає участі репаративних ендонуклеаз й утворення ексцизійних пробілів в структурі ДНК. Не до кінця з'ясованою залишається роль білків місметч-репарації, зокрема MSH2, як кофактора елімінації кластерних радіаційно індукованих покоджень [168]. Виходячи з цього, зрозуміло, що дореплікативна репарація частини індукованих радіацією розривів хроматид може бути

інгібована хімічними модифікаціями ДНК в сайті розриву. Близько розташовані нерепаровані одониткові розриви і пробіли часто призводять до виникнення дволанцюгових розривів ДНК з виступаючими кінцями. Отже, дія іонізуючого випромінювання прямо чи опосередковано веде до утворення пробілів або дволанцюгових розривів ДНК.

У G_0 та G_1 -фазі клітинного циклу ДР ДНК репарує система, що включає канонічний і альтернативний NHEJ або MMEJ шляхи. Ці шляхи репарації часто призводять до хромосомних перебудов, в тому числі стійких. Нерепаровані дволанцюгові розриви індукують арешт клітинного циклу, а згодом програмовану клітинну загибель, що веде до порушення поділів клітин та особливо сильно позначається на стовбурових та меристематичних клітинах і тканинах, до складу яких вони входять. Відповідно, найбільш чутливими до радіації, яка індукує ДР ДНК, є організми, що знаходяться на ранніх стадіях розвитку (особливо ембріони), та на перехідних стадіях онтогенезу, коли закладаються нові органи.

Одноланцюгові розриви і неканонічні хімічні модифікації ДНК в ході реплікації перетворюються у потенційно летальні дволанцюгові розриви внаслідок колапсу реплікативної вилки, або ж призводять до мутацій в ході так званого транслейжн-синтезу за участю специфічних неточних ДНК-полімераз. Цей поширений тип пошкоджень ДНК може бути точно виправлений за допомогою механізму RAD51-залежної постреплікативної рекомбінації пошкодженої ділянки з гомологічною ділянкою сестринської хроматиди або шляхом SSA з утворенням масштабних делецій. Нерепаровані в S і G_2 фазі ДР ДНК активують чекпойнт, арешт клітинного циклу та програмовану клітинну загибель, але якщо клітина все ж вступає в мітоз, то дволанцюгові розриви, які залишились, призводять до хромосомних аберацій. Крім участі в репарації екзогенно індукованих розривів і пробілів в ДНК, RAD51 виконує важливу функцію забезпечення спарювання сестринських хроматид в мейозі.

Натомість у соматичних диференційованих клітинах більшості рослин і тварин основна роль у репарації ДР ДНК належить канонічному шляху

негомологічного з'єднання кінців NHEJ [39;42;100], для якого ключове значення має білок Ku70. Крім того, Ku70, як і Rad1 (XPF, UVH1) бере участь у стабілізації теломер.

Місметч-репарація є фактором генетичного гомеостазу активно проліферуючих клітин і тому протеїн MSH2 необхідний для нормального розвитку зародку, на ранніх етапах й у критичні періоди онтогенезу рослини, серед яких перехід від вегетативної до генеративної стадії. Як кофактор даний білок задіяний у репарації ДР ДНК – гомологічній рекомбінації (HR) та з'єднанні кінців, опосередкованому мікрогомологією (MMEJ). Залишається відкритим питання значущості MSH2 для ефективного пострадіаційного відновлення рослин при різних сублетальних дозах та режимах опромінення, що зумовлюють модифікацію експресії репаративних білків, з якими взаємодіє MSH2.

Проведений аналіз показує, що в якості основних шляхів, які захищають проліферативно активну меристематичну клітину рослини від пошкоджень хромосомного апарату, від хромосомної нестабільності, програмованої клітинної загибелі та мітотичної катастрофи слід розглядати Ku70-, RAD51- та Rad1-залежну репарацію. У багатьох роботах показано, що експресія гена *RAD51* в соматичних клітинах рослин є індукцибельною: для її активації необхідні дволанцюгові розриви ДНК, викликані генотоксичними факторами або колапсом реплікативної вилки [28;165]. ДР ДНК також можуть підвищувати рівень експресії *Ku70* в клітинах. В обох випадках сигнальний каскад ініціює протеїнкіназа ATM [161], а ймовірним транскрипційним фактором – регулятором експресії є SOG1. Що стосується *Rad1*, то його активність залежить від наявності вільних кінців одноланцюгової ДНК, які активують ATR-залежний сигналінг (див. схему на рис.1.1). Достеменно невідомо, регулює експресію *Rad1* білок SOG1 або якісь інші транскрипційні фактори.

Підсумовуючи, ще раз відзначимо, що сигналом для активації системи індукцибельної репарації ДНК еукаріот є первинні (індуковані та ендогенні) й

вторинні або ферментативні розриви ДНК. Одноланцюгові розриви призводять до зупинки клітинного циклу та активації генів білків, які репарують одноланцюгові пошкодження ДНК, дволанцюгові ж активують гени індукцибельної репарації ДР ДНК. Отже, DDR-відповідь на генотоксичні чинники в клітинах еукаріот (включаючи індукцибельну репарацію як складову цієї відповіді), подібно до SOS-відповіді прокаріот, забезпечує елімінацію розривів ДНК – сублетальних і потенційно летальних пошкоджень для клітин, що діляться.

Можна припустити, що активація АТМ-залежної DDR-відповіді відбувається, якщо в клітині залишається в середньому хоча б один нерепарований конститутивною репарацією дволанцюговий розрив ДНК. Доза опромінення, що викликає в середньому один нерепарований конститутивно ДР ДНК на геном, повинна мати стимулюючу дію, що сприяє підвищенню стабільності геному і цілісності хромосом в умовах як ендогенних, так і екзогенних генотоксичних впливів, але тільки за умови подальшої успішної репарації розриву молекули ДНК. Дози, що індукують менше одного ДР ДНК на геном, виявляються підпороговими щодо активації експресії генів репарації дволанцюгових розривів ДНК. Дози, що викликають в середньому більше одного нерепарованого конститутивно ДР ДНК на геном, є «надлишковими» щодо ефективної індукції відповідних генів і можуть навпаки негативно вплинути на здатність клітин до DDR.

Зроблені нами узагальнення в якості теоретичних гіпотез вимагають експериментальної перевірки, частиною якої є результати, представлені в даній дисертаційній роботі.

1.3.3. Індуковані опроміненням зміни експресії генів репарації ДНК

Протягом останніх років показано, що іонізуюче опромінення викликає значні зміни транскриптому клітин тварин, рослин і грибів, включаючи підвищення експресії генів систем антиоксидантного захисту, програмованої

клітинної загибелі, білків цитоскелету, теплового шоку, регуляції клітинного циклу та проліферації, стійкості до патогенів та пошкоджуючих абіотичних факторів, посттрансляційних модифікаторів білків, протеїнів, що беруть участь в транспорті низько та високомолекулярних біологічно активних сполук, мікроРНК [5;27;28;92;122;165]. Виключно важливе значення, як було зазначено вище, має активація генів репарації ДНК у відповідь на розриви, які виникають у її структурі внаслідок іонізуючої чи опосередкованої утворенням радикалів дії опромінення або активності репаративних ендонуклеаз. Транскрипційна активація генів, які кодують ключові фактори ефективного відновлення цілісності ланцюгів ДНК, є першим етапом індукцибельної репарації. З довгостроковими наслідками цього процесу пов'язують адаптацію або навпаки сенсибілізацію клітин до дії іонізуючої радіації, ультрафіолетового випромінювання, деяких інших фізичних та хімічних мутагенів; пролонговану нестабільність геному через тривалий час після закінчення дії генотоксичного чинника; хромосомні аберації, перебудови, делеції та інсерції, ампліфікацію генетичного матеріалу, що є наслідком мутагенної репарації пошкоджень ДНК.

Особливо актуальним і водночас малодослідженим питанням є вивчення регуляції та механізмів модифікації транскрипційної активності генів, які контролюють відновлення дволанцюгових розривів ДНК в геномі вищих рослин після дії генотоксичних факторів. Моделювати дію генотоксичних агентів можна за допомогою опромінення з низькою щільністю іонізації, рентгенівського, γ або β^- випромінювання. Даний підхід дозволяє кількісно оцінити дозові навантаження та побудувати залежність транскрипційної активності генів індукцибельної репарації ДНК, зокрема репарації ДР ДНК, від дози опромінення. Окрім вирішення суто радіобіологічних завдань така експериментальна система здатна пролити світло на природу і частоту первинних (важкодоступних для спостереження та реєстрації) молекулярних подій, які ініціюють активацію індукцибельної репарації ДНК.

Використання джерел іонізуючої радіації дозволяє вивчити відносну здатність хронічного, гострого одноразового, повторюваного, пролонгованого

опромінення індукувати транскрипційну відповідь генів, що беруть участь у репарації потенційно летальних пошкоджень. Тому у даному дисертаційному дослідженні нами було поставлено за мету вивчення відмінностей між різними режимами опромінення модельного об'єкту *Arabidopsis thaliana* рідкоіонізуючою радіацією у сублетальних дозах з точки зору індукції транскрипційної відповіді генів підтримки цілісності геному *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та у зв'язу з життєдіяльністю дослідних рослин після опромінення.

1.3.4. Репарація дволанцюгових розривів ДНК та пострадіаційне відновлення рослин

Ефективна репарація потенційно летальних пошкоджень є головною умовою збереження життєздатності клітин меристематичних тканин рослини. Відомо, що наявність нерепарованих розривів ДНК, як одноланцюгових, так і дволанцюгових, призводить до зупинки просування проліферуючих клітин по клітинному циклу. Це здійснюється у так званих «точках звірки» або чекпойнтах. Провідну роль в цьому відіграють протеїнкінази АТМ і АТР [28;115;137;161;162;165], які також є центральною ланкою активації індукцибельної репарації ДНК. Зупинка просування клітинним циклом потрібна для запобігання незворотним порушенням, до яких можуть призвести сублетальні та летальні пошкодження ДНК під час реплікації та мітозу. Арешт клітинного циклу забезпечує подовження інтервалу, коли можливе відновлення структурно-функціональної цілісності генетичного апарату клітини. Також чекпойнт-кінази Chk1 (АТР-залежна) та Chk2 (АТМ-залежна) запускають каскади сигнальних шляхів, взаємодія яких визначає подальшу долю клітини – тривалу або термінальну зупинку клітинного циклу, репарацію ДНК, ініціацію клітинної загибелі [28;80]. Крім того, в результаті активної реакції клітини на пошкодження ДНК можлива зміна патерна експресії сотень генів, в результаті чого змінюється клітинний фенотип, відбувається диференціація

недиференційованих меристематичних клітин або дедиференціація та трансдиференціація соматичних клітин [147;165].

Модифікація роботи ферментних систем індукбельної репарації ДНК, імовірно, зумовлює формування адаптації та сенсibilізації рослин до дії генотоксичних агентів, радіаційно індукованої нестабільності геному, хромосомних аберацій. Зокрема, підвищена частота аберацій після опромінення пов'язана не тільки з радіаційно індукованими пошкодженнями, а й з помилковою їх репарацією мутагенними шляхами NHEJ, MMEJ, SSA, неточної HR [2;7;8;11;49;56;61;62;73;75;132;138;151;161]. Експансія тандемних повторів сателітної ДНК та переміщення МГЕ є прикладами ендогенних джерел генетичної нестабільності, які знаходяться під контролем систем репарації ДНК клітини, а значить можуть активуватись внаслідок зміни балансу різних шляхів репарації – конститутивних та індукбельних, мутагенних і умовно точних [38;136]. Вказаний фактор є ключовим і для рекомбінації та інтеграції в геном екзогенної ДНК вірусної, плазмідної або іншої природи. Таким чином, наслідки деяких вірусних інфекцій, як і успішність трансгенної трансформації залежать від стану системи репарації ДНК рослинного організму, їх ефективність також може підвищуватись внаслідок змін у активності та балансі репаративних шляхів, індукованих іонізуючим опроміненням. Отримано дані про вищу частку природної агробактеріальної трансформації у зоні відчуження ЧАЕС [174].

Отже, подолання генотоксичних наслідків опромінення на клітинному рівні є передумовою збереження проліферативного потенціалу меристем, а значить здатності рослин відновлювати нормальну життєдіяльність після дії радіації у сублетальних дозах. Ключову роль в цьому відіграє злагоджена, ефективна робота системи репарації ДНК, в першу чергу потенційно летальних пошкоджень – дволанцюгових розривів ДНК. Принцип системної реакції організму на пошкодження в даному випадку реалізується, зокрема, завдяки зкоординованій взаємодії шляхів репарації ДР ДНК.

Так, у низці робіт показана кооперація та конкуренція основних шляхів репарації дволанцюгових розривів ДНК [21-23;47;50;60;67;84;89;96;105;108;112;113;123;129;130;148;158;159;167].

Основою для вибору клітиною шляху відновлення розриву є його доступність для репаративних ферментів, одиничний або кластерний характер пошкодження, неканонічні хімічні модифікації у сайті розриву, активність індукцибельних репаративних механізмів. Відповідно, «перемикання» того чи іншого шляху відновлення цілісності молекули ДНК відбувається внаслідок ферментативної резекції кінців у сайті дволанцюгового розриву або захисту кінців від резекції внаслідок зв'язування з ними гетеродимеру Ku70/Ku80 [80;106;111;152] (рис. 1.3).

Вірогідним є існування й інших механізмів регуляції та корегуляції репарації пошкоджень геному, починаючи з базового молекулярного рівня – транскрипції ключових генів репаративних білків (принципова схема регуляції репарації ДР ДНК арабідопсису на основі прямого та конкурентного інгібування одних ферментативних шляхів іншими подана на рис. 1.4). Ці механізми забезпечують чутливість і гнучкість системи репарації пошкоджень ДНК, що уможлиблює успішну детекцію та корекцію порушень нативної функціональної структури геному в мінливих умовах внутрішнього та зовнішнього середовища організму.

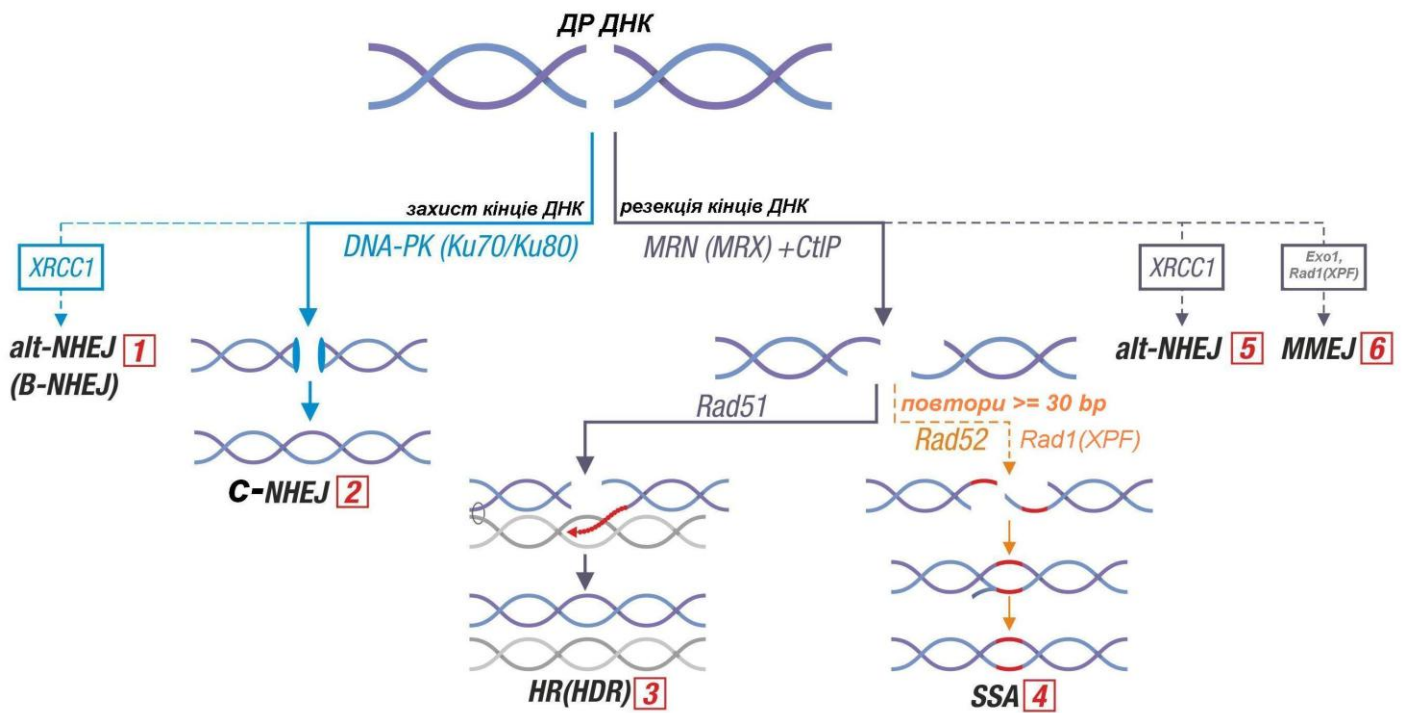


Рис. 1.3. Шляхи репарації дволанцюгових розривів ДНК в клітинах еукаріот

1 – alt-NHEJ (B-NHEJ), запасний шлях негомологічного з'єднання кінців ДНК у сайті ДР. Субстратом для шляху alt-NHEJ можуть бути як резектовані (власне alt-NHEJ), так і не резектовані кінці ДНК (B-NHEJ); **2** – C-NHEJ (D-NHEJ), канонічний шлях негомологічного з'єднання кінців ДНК; **3** – HR (DHR), пряма гомологічна рекомбінація; **4** – SSA, одонитковий відпал; **5** – alt-NHEJ (A-NHEJ), альтернативний шлях MRN-CtIP-залежного негомологічного з'єднання кінців ДНК; **6** – MMEJ, опосередковане мікрогомологією з'єднання кінців ДНК. Примітка. Неперервними стрілками позначені так звані канонічні шляхи, переривчастими – неканонічні.

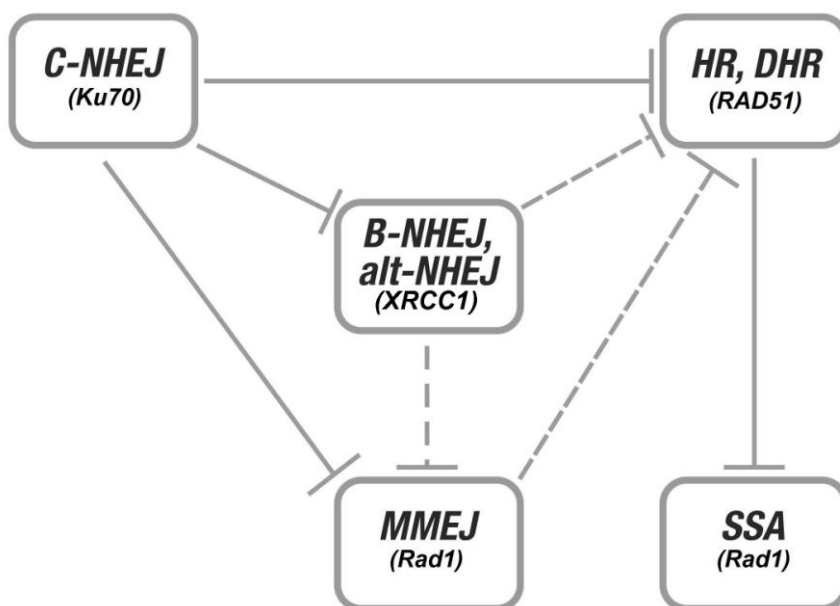


Рис. 1.4. Взаємодія основних шляхів репарації дволанцюгових розривів ДНК *A.thaliana* (за Charbonnel, 2011 [23])

Розглянуте вище відновлення на клітинному рівні, в основі якого лежить елімінація сублетальних і потенційно летальних пошкоджень ДНК, є першою ланкою багаторівневого процесу, завдяки якому зберігається проліферативна активність меристематичних тканин, що забезпечує подолання наслідків опромінення на рівні цілісного рослинного організму. Вивчення зв'язку між індукцією репарації дволанцюгових розривів ДНК та віддаленими ефектами опромінення рослин становить суттєвий інтерес для сучасної радіобіології.

1.4. Висновки до розділу 1

Підводячи підсумки огляду основних доступних джерел за обраною темою дослідження слід наголосити, що підґрунтям вивчення радіобіологічних ефектів сьогодні є системний підхід. Методологічним стрижнем даного підходу є наголос на багаторівневій ієрархічній будові живого організму. Кожному рівню властиві специфічні прояви радіобіологічного ефекту. Проте оскільки рівні взаємопов'язані, то має існувати зв'язок між молекулярним рівнем, найнижчим з тих, де проявляються відмінності живого та неживого, і рівнем цілісного організму. Вивчення такого роду зв'язку між зміною активності генів

репарації ДНК та морфометричними характеристиками рослин, що були опромінені у сублетальних дозах, становить зміст даного дисертаційного дослідження.

Згідно з наявними в сучасній радіобіології даними значна частина ефектів радіації організменого рівня в інтервалі сублетальних доз може бути зумовлена активацією індукбельної системи репарації ДНК. Це стосується явищ радіостимуляції (гормезису), радіоадаптації та радіосенсибілізації, радіаційно індукованої нестабільності геному. Пострадіаційне відновлення рослин відповідно до принципу закономірного зв'язку ієрархічних рівнів живого зазнає впливу модифікованої активності систем репарації ДНК, особливо тих, що беруть участь у підтримці структурної цілісності геному. Репарація потенційно летальних радіаційно індукованих пошкоджень – дволанцюгових розривів ДНК – підтримує проліферацію меристематичних клітин, що забезпечує нормальний онтогенез, формування властивого певному виду та екотипу рослин фенотипу, репопуляційне відновлення твірних тканин.

Реалізація змін у транскрипції ключових генів-маркерів і кофакторів відновлення ДР ДНК на рівні змін морфометричних параметрів рослин відображає відомий у класичній радіобіології принцип посилювача. На основі порівняльного аналізу сучасних даних щодо індукбельної репарації в клітинах еукаріот нами були виділені наступні ключові гени ферментів репарації ДР ДНК модельної рослини *Arabidopsis thaliana*: *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* і *Atmsh2* в якості кофактора – модифікатора ефективності відновлення.

Незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених репарації ДР ДНК, недостатньо вивченими залишаються питання радіаційно індукованої модифікації активності генів репарації ДР ДНК рослин у інтервалі сублетальних доз рідкоіонізуючого опромінення; взаємодії основних ферментативних шляхів; впливу їх ефективності на онтогенез, метаболізм і морфологію після опромінення у середньостроковий та віддалений період. Наші дослідження спрямовані на прояснення цих важливих радіобіологічних проблем.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика об'єктів дослідження

Різушка Таля (гусимка звичайна) або *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – вид роду різушки (*Arabidopsis*) родини капустяні (*Brassicaceae*). Це однорічна або дворічна рослина, стебло частіше одне, висотою від 4,5 до 70 см, тонке, пряме, листки довгасто-ланцетні. Прикореневі листки, вкриті одноклітинними волосками-трихомами, зібрані у розетку. Квітки білі, 2-4 мм в діаметрі з архітектурою квітки, типовою для капустяних. Плід – стручок 10-20 мм завдовжки, містить 20-30 насінин. *Arabidopsis thaliana* зазвичай є самозапильною рослиною. Має багато екотипів по всьому світу.

Різушка Таля має невеликий хромосомний набір – всього 5 пар. Її геном є одним з найменших серед квіткових рослин.

Арабідопсис може пройти повний цикл розвитку за 6-10 тижнів і належить до типових ефемерів. Через малі розміри, короткий термін вегетації, можливість отримання великої кількості насіння, повністю секвенований геном і наявність великих колекцій мутантів за цільовими генами арабідопсис широко використовується як модельний організм в біологічних дослідженнях на Землі і в космічному просторі.

Різушка Таля як об'єкт генетичних досліджень привернула увагу біологів після робіт Ф. Лайбаха (Frederick Laibach), професора ботаніки університету Франкфурта-на-Майні. Надалі вивчення арабідопсиса продовжили його учениця Е. Райнхольц (Erna Reinholz) у Німеччині та Д. Лангріджем (J. Langridgem) у Австралії.

У своїх дослідках ми використовували насіння *Arabidopsis thaliana* стандартного лабораторного екотипу *Columbia-0* двох ліній: дикого типу *wt* та *SALK_002708* – гомозиготного інсерційно-делеційного мутанта за геном *Atmsh2*, який отримано шляхом інтеграції) вектора *pROK2* у кодуючу

послідовність гена *At3g18524* (*Atmsh2*, в результаті чого відбулось заміщення екзонів з 8 по 12, включаючи фрагменти 7 і 13 екзонів, на послідовність векторної Т-ДНК (рис. 2.1). Насіння обох ліній отримано нами з колекцій Ноттінгемського центру зразків арабідопсису (Nottingham Arabidopsis Stock Center, NASC), Велика Британія [38].

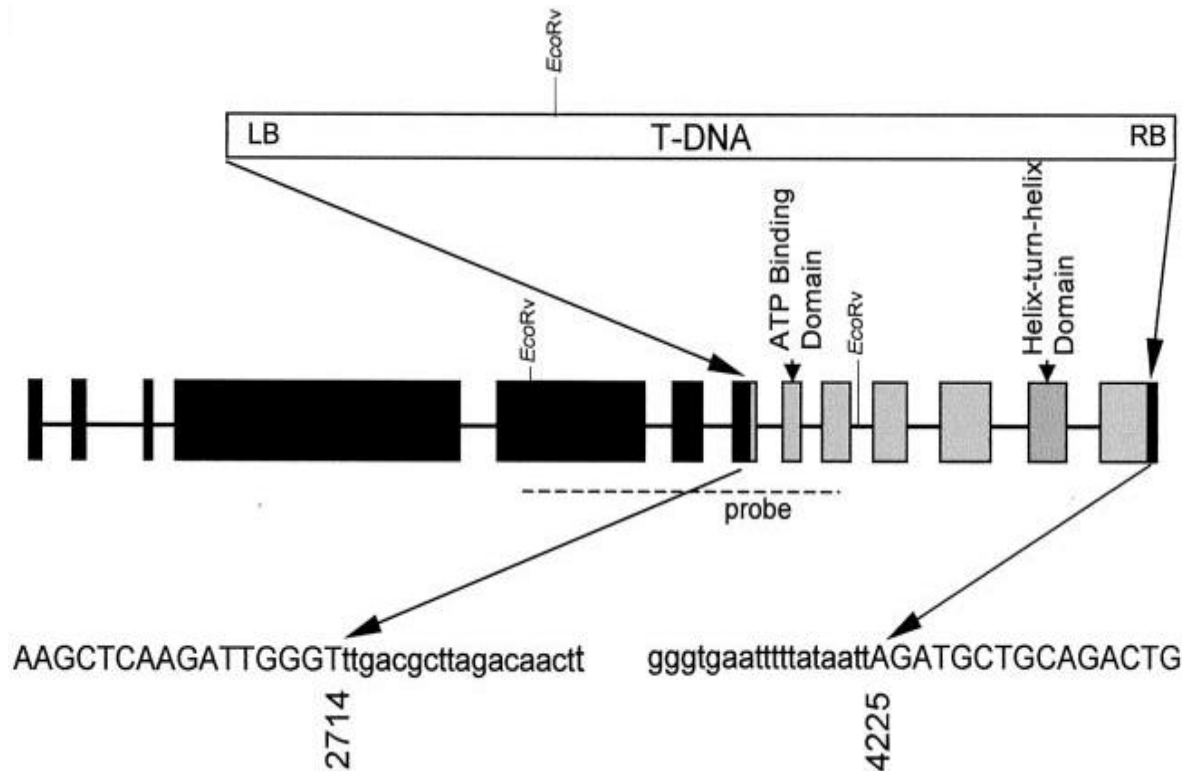


Рис. 2.1. Структура Т-ДНК опосередкованої інсерції-делеції у локусі *At3g18524* мутантної лінії *SALK_002708* [38]

Для лінії *SALK_002708* характерна висока частота перебудов мікросателітної ДНК – у 60 разів вище контрольного рівня, що підтверджує вже відому роль продукту гена *Atmsh2* як фактора запобігання мікросателітній нестабільності ДНК (див. табл. 1.1 огляду літератури).

2.2. Опис та основні методичні принципи дослідження

2.2.1. Етапи дослідження

Дослідження проводили в три етапи.

На **першому етапі** хронічно опромінювали насіння та проростки. Опромінення проводили у радіальному радіаційному полі скляної пробірки з хлоридом радіоактивного ізотопу ^{137}Cs (Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, м. Київ). За неопромінений контроль приймали рослини, закриті від джерела випромінювання екраном із свинцевих блоків, причому потужність дози за екраном значуще не відрізнялася від фонові (див. рис. 2.2). Сумарні дози склали 30 сГр, потужність дози 0,45 мГр/год (опромінення насіння рослин дикого типу); 3 сГр, потужність дози 0,18 мГр/год (опромінення проростків дикого типу від проростання до 7-ої доби вегетації); 20 сГр, потужність дози 0,24 мГр/год (опромінення проростків дикого типу та проростків мутанту *Atmsh2 SALK_002708* від проростання до 35-ої доби вегетації). Дозові навантаження хронічного опромінення були визначені виходячи з мети роботи як такі, що завідомо не перевищують верхню межу малих доз за критеріями, прийнятим UNSCEAR і МАГАТЕ [10;85].

На **другому етапі** 35-денні рослини обох ліній (стадія 5.50-5.60 за сучасною класифікацією етапів онтогенезу по Boyes et al., 2001) піддавали гострому одноразовому та повторюваному опроміненню (3 рівні фракції з інтервалом у 24 години) в інтервалі доз 3 Гр – 21 Гр. Загальна схема дослідів приведена на рис. 2.3.



Рис. 2.2. Радіальне радіаційне поле для хронічного опромінення

Д – джерело опромінення, Е – захисний свинцевий екран (пояснення в тексті).

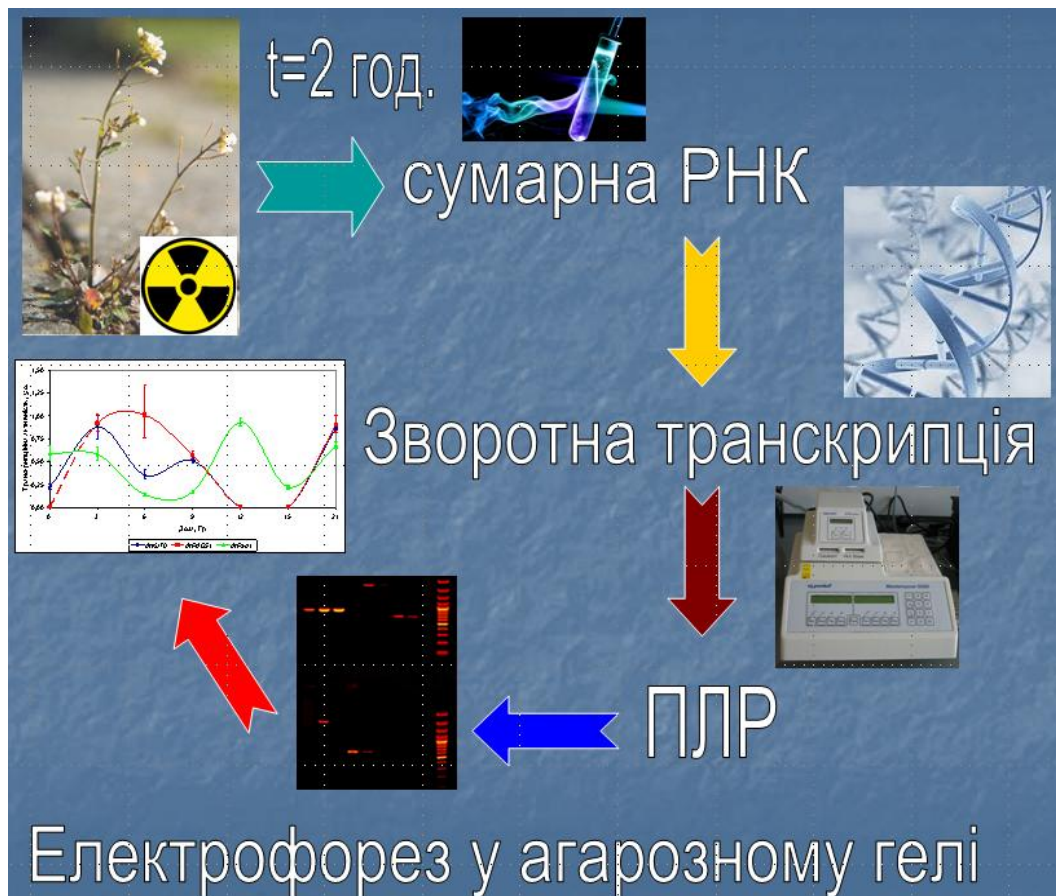


Рис. 2.3. Принципова схема дослідів другого етапу дослідження

На **третьому етапі** вивчали ефекти, які проявляються у неопромінених нащадків першого покоління опромінених на другому етапі рослин.

Дози радіації обрали, виходячи з літературних даних та власних попередніх оціночних дослідів. Було встановлено, що для обраних об'єктів в критичний період переходу від вегетативної до генеративної стадії розвитку верхня межа доз, які достовірно не підвищують частку загиблих протягом 30 діб після опромінення рослин, складає 23-25 Гр. Водночас, при опроміненні рослин в дозі менше 3 Гр опромінення викликало протилежні за знаком ефекти у різних рослин дослідного варіанту. При дозах більше 3 Гр у більшій частини опромінених рослин проявлялись ефекти, однакові за знаком. Таким чином, дози 3-21 Гр можна вважати сублетальними для рослин *Arabidopsis thaliana*, які досягли межі генеративної стадії розвитку.

Використані нами дозові навантаження відображені у таблиці 2.1. Експериментальним шляхом визначено, що перехід від вегетативної до генеративної стадії, коли на 50% рослин з'являються бутони, для використаних нами ліній арабідопсису при описаних нижче умовах культивації здійснюється приблизно на 35-у добу вегетації. Саме в цей день одноразово опромінювали рослини на установці РУМ-17 (рис. 2.4) Національного інституту раку (м. Київ, Україна) рентгенівськими променями з енергією квантів 180 кеВ. Повторюване (фракціоноване) опромінювали проводили, розбиваючи дозу на три рівні частини з інтервалом у 24 години – на 35-й, 36-й і 37-й день вегетації. Потужність дози опромінення на РУМ-17 складала 89 сГр/хв (53,4 Гр/год).

Таблиця 2.1

Дози одноразового та повторюваного (фракціонованого) опромінення рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу та мутантної лінії *Atmsh2 SALK_002708*

Дози одноразового опромінення	Дози повторюваного (фракціонованого) опромінення з інтервалом між фракціями 24 години
3 Гр	1 Гр + 1 Гр + 1 Гр
6 Гр	2 Гр + 2 Гр + 2 Гр
9 Гр	3 Гр + 3 Гр + 3 Гр
12 Гр	4 Гр + 4 Гр + 4 Гр
15 Гр	5 Гр + 5 Гр + 5 Гр
21 Гр	7 Гр + 7 Гр + 7 Гр



Рис. 2.4. Рентгенівський апарат РУМ-17, змонтований в дослідницькій лабораторії Національного інституту раку (м. Київ, Україна)

2.2.2. Обґрунтування схеми повторюваного опромінення та особливостей визначення активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*

Для моделювання дії повторюваного опромінення обрана схема з розбиттям фракцій на рівні частини, проміжок між якими дорівнює 24 години (таблиця 2.1). Зазначена схема має низку переваг:

по-перше, у клітинах опромінених об'єктів в інтервалі часу між фракціями модифікація активності генів репарації реалізується на рівні зміни

ефективності ферментативних репаративних систем. При фракціонуванні дози успішність пострадіаційного відновлення визначається індукцибельною системою репарації (2/3 поглинутої дози рослина отримує після активації даної системи першою фракцією), на відміну від одноразового опромінення в тій самій дозі, коли більшість пошкоджень виправляють конститутивні системи репарації ДНК;

по-друге, під час 24-годинного проміжку між фракціями клітини елімінують переважну більшість репарабельних пошкоджень. Це ще більше підвищує залежність ефекту опромінення від транскрипційної відповіді генів репарації ДР ДНК, а не від величини сублетальної дози як такої;

по-третє, протягом 24 годин після першої фракції опромінення ініціюється процес репопуляції (стимуляції) апікальних меристем. Відповідно, другу та третю фракції поглинають радіочутливі меристематичні клітини, що активно проліферують. Тим самим обрана схема розподілу доз блокує репопуляцію, що дозволяє завдяки порівнянню з наслідками одноразового опромінення оцінити її значення для пострадіаційного відновлення рослин.

Через 2 години після завершення опромінення 35-денних рослин (або на 35-у добу розвитку рослин, отриманих з неопроміненого насіння опромінених рослин) визначали рівень транскрипційної активності генів *AtE1a*, *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*. Виключення становили рослини, вирощені з опроміненого насіння, які аналізували на 35-у добу культивування, тобто через 35 днів після завершення хронічного опромінення. Ранній вимір транскрипційної активності в даному випадку не мав сенсу, оскільки транскрипція генів систем репарації ДНК суттєву залежить від стадії розвитку, на якій знаходяться рослини [16;131]. Крім того, транскрипційні зміни на початку вегетації рослин, одержаних з опроміненого насіння, могли бути артефактом процедури стерилізації та пересадки.

Проміжок у 2 години є стандартним для виявлення індукованих стресовими факторами ранніх змін експресії, адже активація індукцибельної системи репарації ДР ДНК – досить швидка реакція на викликані опроміненням

розриви. Відносну активність цільових генів визначали у розеткових листках, у той час як опромінювали цілі рослини. Зміни рівня транскрипційної активності генів *AtEf1a*, *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у розеткових листках опромінених рослин розглядали в якості маркеру аналогічних змін в середньому у всьому рослинному організмі. Це пов'язано з тим, що молекулярний механізм активації індукцйбельної репарації ДНК однаковий в усіх клітинах (див. схему на рис. 1.1 та пояснення до неї у підрозділі 1.3.2). Крім того, листок є органом, який містить тканини, присутні й в інших частинах рослинного організму, зокрема, покривну тканину, мезенхіму та паренхіму, судинні пучки, меристеми.

2.2.3. Вибірка та повторюваність дослідів

У лабораторних умовах культивували 100 рослин кожного з варіантів. Повторність дослідів трикратна. Морфометричні параметри вимірювали для всіх рослин варіанту. Для проведення інфрачервоної Фур'є-спектроскопії та гель-денситометричної оцінки відносної транскрипційної активності генів використовували 2-3 різних за розміром листка з прикореневої розетки 25 рослин, відібраних випадковим чином.

2.3. Підготовка насіннєвого матеріалу та культивація рослин

На першому етапі дослідження насіння стерилізували протягом 5-7 хвилин розчинами 70% етанолу і 5% перекису водню у співвідношенні 1:1 [196]. На другому та третьому етапі насіння не стерилізували. Проростки вирощували в асептичній культурі у чашках Петрі 100 × 20 мм на середовищі Мурасіге-Скуга з половинним вмістом макро- і мікроелементів (MS 1/2). 10-денні проростки й насіння по 3-5 шт. висаджували у поліпропіленові стакани V=200 мл або V=500 мл на поверхню ґрунтової суміші на основі універсального субстрату «Поліський» (pH 5,5-6,5) та просіяного

автоклавованого піску (1 частина піску на 2 частини субстрату). За 2 доби до висадки проростків і насіння ґрунтову суміш стерилізували 1% розчином KMnO_4 .

Умови культивування рослин:

а) на хронічному опроміненні в радіальному полі джерела на основі ^{137}Cs (рис. 2.2) – освітленість від люмінесцентних ламп денного світла 8 клк ($108 \text{ мкмоль фотонів м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), світловий день 16 год, температура $21\text{--}23^\circ \text{C}$;



А



Б



В



Г

Рис. 2.5. Основне обладнання, яке використовували під час дослідження:

А – лабораторна культивувальна установка; **Б** – спектрометр Nicolet FTIR IS50 (Thermo Fisher Scientific, США). Фото взяте за посиланням <http://uhaweb.hartford.edu/chemistry/facilities1.html>; **В** – обладнання для оцінки активності цільових генів: ампліфікатор GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США), камера для горизонтального фореу SE-1 з блоком живлення «Ельф 4», міні центрифуга та вортекс; **Г** – візуалізація електрофореу ДНК у агарозному гелі за допомогою транслюмінатора

б) проростки, зняті з хронічного опромінення та перенесені у відкриту лабораторну культивацийну установку (рис. 2.5 А) – освітленість від люмінесцентних ламп денного світла 4 клк ($54 \text{ мкмоль фотонів м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), світловий день 16 год, температура $22\text{-}25^{\circ} \text{C}$;

в) рослини, вирощувані у лабораторній культивацийній установці, які гостро одноразово та повторювано опромінювали на 35-й день вегетації, а також рослини, отримані з їх насіння – освітленість від люмінесцентних ламп денного світла 5.9 клк ($80 \text{ мкмоль фотонів м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), світловий день 16 год, температура $22\text{-}25^{\circ} \text{C}$.

2.4. Морфометричний аналіз

Оскільки іонізуюче опромінення навіть у сублетальних дозах призводить до пошкоджень ДНК, порушення поділу клітин та окремих життєвих процесів, що неминуче позначається на рості та формуванні органів опромінених рослин, ми розглядали відмінність їх морфометричних показників від аналогічних параметрів контрольного варіанту в якості критерію ефективності пострадіаційного відновлення. На другому та третьому етапі дослідження більшість морфометричних характеристик вимірювали через 30 діб після дії радіації, коли відновлювальні процеси досягали піку. На першому етапі рослини опромінювали на початкових стадіях онтогенезу, тому морфометричні виміри проводили в більш короткі терміни після зняття з опромінення – на 7 добу після початку хронічного опромінення.

Виходячи із специфіки об'єктів та завдань кожного з дослідницьких етапів були підібрані наступні морфометричні маркери пострадіаційного відновлення *Arabidopsis thaliana*:

I. Перший етап (рослини з хронічно опроміненого насіння та опромінені проростки) –

1. енергія проростання насіння (% пророслого насіння);
2. довжина гіпокотилу;
3. частка проростків з зеленими сім'ядолями;
4. частка проростків з розеткою

двох перших справжніх листків; 5. кількість листків в розетці на момент початку активного росту головного стебла; 6. довжина і швидкість росту стебла; 7. час появи першого першої розкритої квітки на пагоні (тиждень); 8. середня кількість стручків на рослині; 9. кількість рослин із затримкою росту та розвитку; 10. частка рослин з морфологічними аномаліями; 11. тривалість вегетації до загибелі; 12. маса повітряно-сухої надземної частини пагона після завершення вегетації.

Виміри проводили на масштабованих цифрових знімках стандартними засобами пакету Image J2x (National Institutes of Health, США).

II. Другий та третій етапи (другий етап – гостро опромінені одноразово та повторювано рослини; третій етап – неопромінені рослини з насіння опромінених рослин) –

1. схожість насіння, отриманого у поколінні F_0 , тобто схожість насіння рослин, опромінених на другому етапі дослідження; 2. тижневий приріст стебла (в середньому за 30 діб після опромінення); 3. сумарна кількість стручків, зібрана протягом 30 діб після опромінення (в середньому на рослину); 4. частка рослин з морфологічними аномаліями; 5. частка рослин із затримкою розвитку після опромінення («growth arrest» у англомовних джерелах); 6. кількість живих листків у прикореневій розетці через 30 діб після опромінення; 7. частка рослин, на яких є розкриті квітки через 2 тижні після опромінення; 8. середня кількість квіток на 100 мм довжини стебла; 9. маса повітряно-сухої надземної частини пагона наприкінці вегетації; 10. маса повітряно-сухої надземної частини пагона наприкінці вегетації у перерахунку на 100 мм довжини стебла; 11. тривалість вегетації від опромінення до загибелі рослини; 12. частка рослин, у яких спостерігалось кушіння пагона; 13. частка рослин, які мали Г-подібний або сигмоподібний злам стебла; 14. середня кількість галузень стебла другого та вищого порядку на одну рослину.

2.5. Інфрачервона Фур'є-спектроскопія

Як було зазначено вище, максимальна використана нами доза рентгенівського опромінення 21 Гр належить до інтервалу доз, вище яких проявляється летальний вплив радіації на рослини *Arabidopsis thaliana*, що знаходяться наприкінці вегетативної фази розвитку (при опроміненні в дозах 23-25 Гр частка загиблих протягом 30 діб рослин достовірно перевищує відповідний показник контрольної групи). У попередніх дослідках спостерігали зменшення кількості живих листків у прикореневій розетці опромінених у дозі 21 Гр рослин у 1,5 рази порівняно з неопроміненим контролем. В контексті вивчення процесу пострадіаційного відновлення було поставлено завдання з'ясувати, які саме метаболічні процеси відбуваються у листках опромінених рослин. Дозу 21 Гр було використано в якості тест-фактора, після дії якого можна зафіксувати біохімічні зміни, що при більших дозах проявляються у пригніченні життєдіяльності та зниженні життєздатності.

З метою аналізу змін біохімічного складу листків використали метод інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (FTIR). Перевагами даного методу є швидкість, простота, надійність та відтворюваність результатів, можливість одночасного вимірювання вмісту найбільш життєво важливих біохімічних компонентів клітин без порушення цілісності об'єкту, тобто із збереженням властивого живій системі зв'язку між просторовими компартментами та макромолекулами біологічно важливих сполук [90;97;104;109;125;155;157;160;169].

Спектри поглинання середньої інфрачервоної області ($400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$) були отримані з використанням спектрометра Nicolet FTIR IS50 (Thermo Fisher Scientific, США) лабораторії епігенетики Державної установи «Інститут геронтології ім. Д.Ф.Чеботарьова НАМН України» (рис. 2.5 Б). Всі спектри вимірювали з роздільною здатністю 4 см^{-1} . Для аналізу відбирали по 2-3 різних за розміром листка з прикореневої розетки на 30 добу після опромінення (65 доба вегетації). Зрізані цільні листки ліофільно висушували. На кожному з

листіків було обрано 2-3 поля для спектрометрії: в центрі, біля зовнішнього краю листової пластинки та в зоні черешка.

Аналіз ІЧ-спектрів проводили у програмному пакеті Thermo Scientific OMNIC (Thermo Fisher Scientific, США). Спектри отримували усередненням 32 сканувань одного і того самого поля з фільтрацією за фоновим спектром. Первинні спектрограми вирівнювали по базовій лінії та згладжували за допомогою функції Савіцького-Голя з метою елімінації спектрального шуму. Відносну концентрацію біохімічних сполук оцінювали за площею відповідних піків оптичної густини (центр піку $\pm 6 \text{ см}^{-1}$) на спектрограмі спектру поглинання з урахуванням вирівнювання по базовій лінії.

2.6. Визначення відносної транскрипційної активності цільових генів

2.6.1. Екстракція РНК та зворотна транскрипція

Для виявлення відмінностей у транскрипційній активності генів використали полімеразну ланцюгову реакцію на матриці продуктів зворотної транскрипції сумарної РНК (ЗТ-ПЛР), виділеної із свіжих листків рослин [17;181]. Екстракцію здійснювали через 2 години після опромінення. Сумарну РНК виділяли з 2-3-х розеткових листків 25 випадково відібраних рослин варіанту, загальна маса наважки 500 мг. Листки заморожували рідким азотом та ретельно розтирали у фарфорових ступках, з отриманої маси екстрагували РНК за допомогою набору RIBO-Sorb (AmpliSens, РФ). Зворотна транскрипція сумарної РНК для отримання кДНК проводилась з використанням набору REVERTA-L (AmpliSens, РФ), який містить зворотну транскриптазу M-MLV і випадкові нуклеотидні гексамери в якості праймерів. Всі маніпуляції здійснювали відповідно до протоколу виробника.

2.6.2. Ампліфікація цільових послідовностей кДНК

ПЛР на матриці кДНК, отриманої шляхом зворотної транскрипції сумарної РНК, проводили на ампліфікаторі GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США) – рис. 2.5 В. Об'єм суміші для кожної реакції 20 мкл, включаючи: 5 мкл кДНК матриці, 9,8 мкл ddH₂O, 2 мкл 10 мМ суміші dNTP (Thermo Fisher Scientific, США), 0,2 мкл Taq ДНК-полімерази (Thermo Fisher Scientific, США), 2 мкл буферу для ДНК Taq полімерази, 0,5 мкл кожного з двох праймерів, прямого і зворотного, в робочій концентрації 10 мкг/л.

Умови ПЛР були наступними:

1. нагрівання до 95 °С протягом 4 хв;
2. 35 циклів нагрівання до 95 °С протягом 45 с, 63 °С протягом 45 с, 72 °С протягом 60 с;
3. фінальна елонгація одноланцюжкових фрагментів протягом 10 хв при температурі 72 °С.

Цільові кДНК до пре-мРНК відповідних генів ампліфікували за допомогою олігонуклеотидних праймерів з послідовностями, які наведені у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Послідовності прямого (Fw) та зворотного (Rev) праймерів, використаних для ампліфікації кДНК цільових генів та референсного гена *AtEF1α*

Ген <i>Arabidopsis thaliana</i>	Fw праймер	Rev праймер	Довжина продукту ампліфікації, н.п.
<i>AtKu70</i> (<i>At1g16970</i>)	5'-TCCGTCCGGCTATTCCTGGC-3'	5'-TGCGTCACCGGCTTTTCGCT-3'	2277
<i>AtRAD51</i> (<i>At5g20850</i>)	5'-ACCCAGCACGGACCTTTCCC-3'	5'-ATCGAGCTTCCGCTTCTGGC-3'	2002
<i>AtRad1</i> (<i>At5g41150</i>)	5'-AAGCCAATGCTGTTCGCCCC-3'	5'-TCTTCCGCCTGCTTTTCGGG-3'	660
<i>AtEF1α</i> (<i>At1g07940</i>)	5'-AGCCCCTTCGTCTCCCACTT-3'	5'-GCCAAGTACCTCCGCCACCT-3'	826

Пари праймерів підбирали та оптимізували за допомогою програми з відкритим доступом NCBI Primer-BLAST (National Institutes of Health, США). Вони підбрані таким чином, щоб мати змогу аналізувати активність генів на базовому рівні – рівні транскрипції пре-мРНК, комплементарних нуклеотидній послідовності відповідних локусів.

Для виключення хибно позитивних результатів через контамінацію геномною ДНК ставили наступні негативні контролю: 1. ПЛР з продуктами зворотної транскрипції без додавання до реакційної суміші зворотної транскриптази M-MLV; 2. ПЛР з ddH₂O замість кДНК матриці.

2.6.3. Гель денситометрія продуктів ампліфікації кДНК

Гель денситометрія кДНК досі залишається одним з поширених, простих та дешевих методів оцінки транскрипційної активності генів [17]. Тому відмінності у відносному рівні транскрипції генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* визначали за допомогою кількісної денситометрії за цифровим зображенням флуоресценції продуктів ген-специфічної ампліфікації кДНК після електрофорезу в 1% агарозному гелі з вмістом 0,005% EtBr. Цифрові фотографії отримані за допомогою камери Cannon PowerShot G5. Інтенсивність флуоресценції ДНК визначали як добуток кількості пікселів флуоресцуючої смуги в гелі на середню яскравість флуоресценції, збудженої УФ-випромінюванням трансільюмінатора з довжиною хвилі 312 нм (рис. 2.5 Г). Квантифікацію цифрових зображень здійснювали у програмі Image J2x (National Institutes of Health, США). Відносну концентрацію ДНК оцінювали, порівнюючи інтенсивність флуоресценції ДНК смуги з інтенсивністю флуоресценції смуги 500 bp маркера молекулярної ваги GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific, США) у стандартній концентрації 115 нг/0,5 мкг.

Рівень транскрипційної активності визначали відносно референсного гена з конститутивною експресією гена *AtEF1α*, що кодує найбільш поширений білок у еукаріотичній клітині – субодиницю альфа фактора елонгації трансляції

1, який відповідає за доставку аміноацил тРНК у рибосому. Показаний прямий зв'язок між експресією даного гена та загальним рівнем транскрипції у життєздатних клітинах рослин.

В якості міри транскрипційної активності гена була використана концентрація продукту ампліфікації суміші кДНК із специфічними до послідовності даного гена праймерами, нормована по концентрації продукту ампліфікації кДНК з ген-специфічними праймерами *AtEF1 α* . Результати виражали в у.о. інтенсивності флуоресценції ПЦР продукту ампліфікації кДНК *AtEF1 α* . У кожній з трьох повторностей досліду за результат денситометрії приймали середні значення двох повторюваних реакцій ПЛР на кожний варіант.

2.7. Статистичний аналіз даних

Для обробки й аналізу даних використовували стандартні методи математичної статистики та біометрії [134], а також програмні засоби пакетів Microsoft Excel 2003 (Microsoft, США) і SPSS 17.0 (IBM, США). Морфометричні показники та FTIR-оцінки біохімічних параметрів, подані в тексті роботи, є результатом усереднення трьох повторностей дослідів. Як міру точності оцінок використовували стандартну похибку та стандартне відхилення.

Величини відносної транскрипційної активності генів розраховували як вибіркові оцінки з похибками оцінювання, що відповідають стандартним відхиленням нормально розподілених статистик, проте не є симетричними внаслідок логарифмічно-експоненційного перетворення первинних даних. Зокрема, дані повторних оцінок транскрипційної активності логарифмували, усереднювали натуральні логарифми вимірів, а потім здійснювали обернене експоненційне перетворення результату, що дозволило зменшити дисперсію математичного очікування оцінки середнього. Статистичну достовірність відмінностей між варіантами перевіряли за допомогою непараметричних тестів

Манна-Уїтні та Краскела-Волліса (метод Монте-Карло, 10000 ітерацій) при рівні довірчої імовірності $P > 0,95$.

Зв'язок між рівнями активності досліджуваних генів і між транскрипційною активністю генів та морфометричними показниками характеризували значенням коефіцієнтів повної та часткової кореляції Пірсона. Коваріацію морфометричних змінних описували за допомогою факторного аналізу (метод головних компонент). Для перевірки результатів кореляційного аналізу застосовували стандартні моделі регресійного аналізу.

РОЗДІЛ 3

РАННЯ ТРАНСКРИПЦІЙНА ВІДПОВІДЬ ГЕНІВ *ATKu70*, *ATRAD51*, *ATRAD1* НА ДІЮ РІДКОІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ У СУБЛЕТАЛЬНИХ ДОЗАХ

3.1. Залежність змін рівня транскрипції генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* від дози опромінення в інтервалі 3-21 Гр

Режим та доза опромінення достовірно позначалися на рівні транскрипційної активності досліджуваних генів підтримки стабільності геному *Arabidopsis thaliana*. Це стосується як загального рівня конститутивної транскрипції, про яку можна судити за активністю гена *AtEF1 α* , так і експресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*.

Вивчення транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* показало відсутність статистично достовірних відмінностей між рослинами дикого типу та мутанту *Atmsh2*^{-/-}. Тому при подальшому викладі результатів ми наводимо дані, отримані для рослин дикого типу.

Виявлена залежність концентрації транскриптів від дози є нелінійною, має декілька піків, причому поведінка функції «доза-ефект» суттєво відрізняється у інтервалі доз 3-9 Гр та 12-21 Гр (рис. 3.1).

У клітинах листків неопромінених рослин транскрибувалися гени *AtRad1* та *AtKu70*, водночас транскрипційна активність *AtRAD51* знаходилася нижче порога детекції методом гель-денситометрії. При цьому як одноразове, так і повторюване (фракціоноване) опромінення викликало підвищення транскрипційної активності генів *AtKu70* і *AtRAD51* при дозах 3 Гр, 6 Гр, 9 Гр, 21 Гр. Проте одноразове опромінення справляло сильніший стимулюючий вплив на експресію цих генів як при найменшій (3 Гр), так і при найбільшій (21 Гр) дозі досліджуваного інтервалу сублетальних доз. Дози 3-6 Гр та 21 Гр обумовлювали максимальний ефект активації сумарної транскрипції генів *AtKu70* та *AtRAD51* при обох застосованих режимах опромінення. (рис. 3.1, рис. 3.3).

Примітно, що при дії доз одноразового опромінення 3-9 Гр, які стимулювали експресію генів *AtKu70* і *AtRAD51*, у 1,6-3 рази знижувалася експресія гена фактора елонгації трансляції *AtEF1α* (рис. 3.3), що відображає зниження рівня загальної транскрипції після опромінення та, відповідно до функцій білка *AtEF1α*, і білкового синтезу. Аналіз змін транскрипційної активності гена *AtEF1α* (див. рис. 3.3 Г) засвідчує, що зниження конститутивної транскрипції відбувалося при дозах 3-9 Гр, які стимулювали експресію генів індукцйбельної репарації *AtKu70* та *AtRAD51*. Даний ефект виражений при одноразовому опроміненні, але не при повторюваному, що свідчить про його короткостроковість.

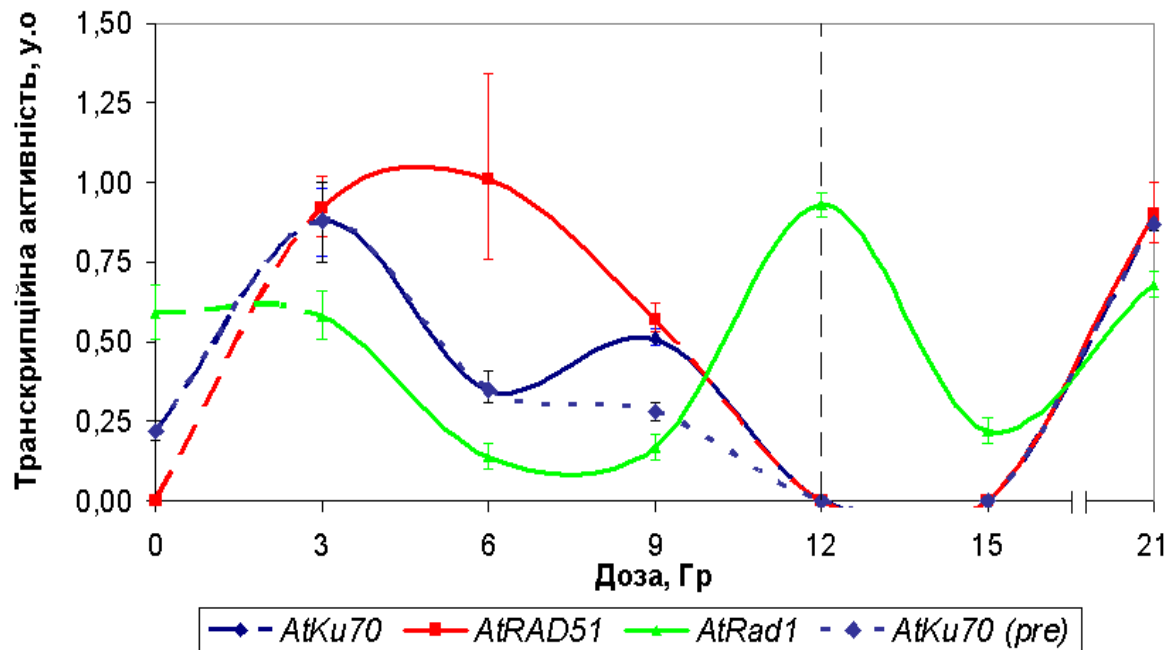
Таким чином, в інтервалі менших сублетальних доз одноразового опромінення активація генів репарації ДР ДНК супроводжувалася зниженням загального рівня транскрипції та білкового синтезу, що може бути складовою DDR-відповіді клітин. При повторюваній дії радіації координація репресії конститутивної транскрипції та активації індукцйбельної репарації порушувалася.

Дози одноразового опромінення 12 Гр і 15 Гр, на відміну від менших доз, не індукували транскрипцію гена *AtRAD51*, а експресія гена *AtKu70* при цих дозових навантаженнях навіть пригнічувалася (рис. 3.3 А, Б). Проте при одноразовому опроміненні в дозі 21 Гр знов спостерігалось підвищення активності генів *AtKu70*, *AtRAD51* та *AtRad1*.

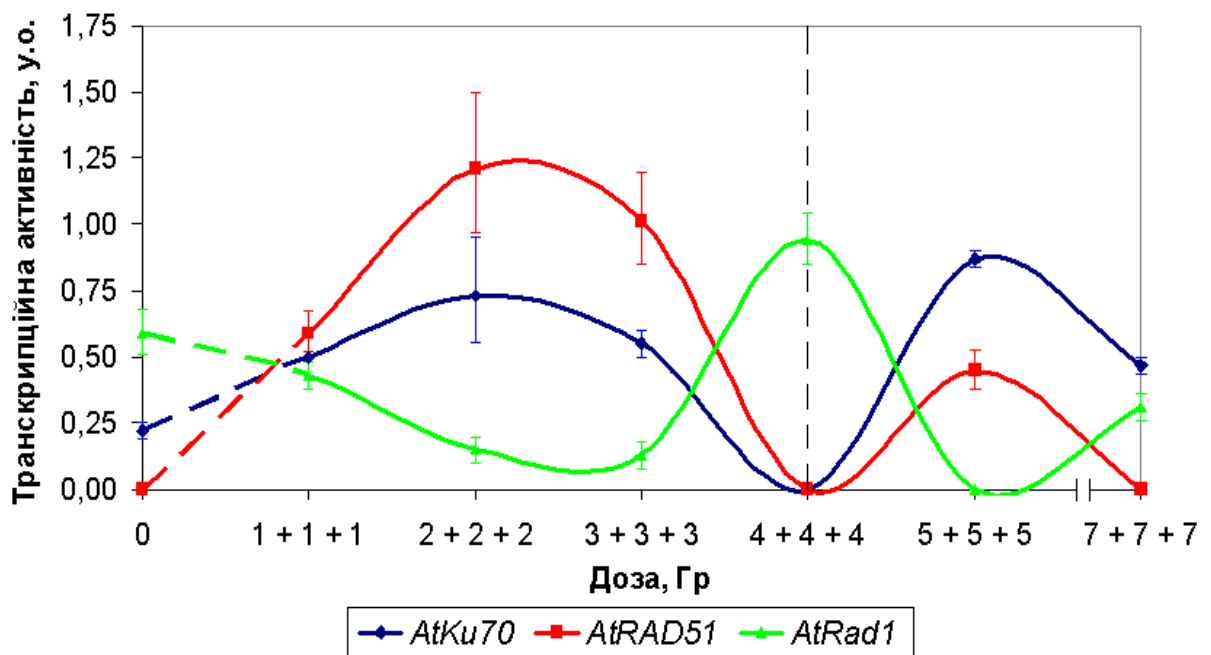
У випадку фракціонування ефект стимуляції або пригнічення достовірно відрізнявся від ефекту одноразового опромінення при дозах 3 Гр, 15 Гр, 21 Гр (див. рис. 3.3). Фракціоноване опромінення менш ефективно індукувало активність генів *AtKu70* і *AtRAD51* у порівнянні з одноразовим при дозах 3 Гр і 21 Гр, проте було більш ефективним при дозі 15 Гр.

Також сумарні дози 5 Гр + 5 Гр + 5 Гр і 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр фракціонованого опромінення призводили до більш високої активності гена *AtKu70* порівняно з *AtRAD51*. За всіх інших доз та режимів опромінення, крім

неопроміненого контролю, транскрипційна активність *AtRAD51* була не менша, ніж активність *AtKu70*.



А



Б

Рис. 3.1. Залежність рівня транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* від дози опромінення

А – одноразове, Б – повторюване (фракціоноване) опромінення. Пунктиром позначено поділ інтервалу тестованих доз на два субінтервали: 6-9 Гр та 12-21 Гр, що відображає зміну характеру дозової залежності.

Це суттєвий фактор, який впливає на відновлення пошкоджень ДНК при повторному опроміненні. Адже відомо, що білок Ku70 приймає участь у швидкій, проте неточній репарації дволанцюгових розривів ДНК, що має призводити до накопичення мутацій внаслідок помилкової NHEJ-репарації радіаційно індукованих пошкоджень. Ще більш мутагенним є шлях MMEJ, маркером якого є активність гена *AtRad1*. Через те, що між шляхами репарації дволанцюгових розривів існує конкуренція (див. розділ 1, рис. 1.4), найбільший внесок мутагенної репарації у відновлення ДНК слід очікувати тоді, коли не відбувається індукція найбільш точної RAD51-залежної гомологічної рекомбінації. Це спостерігається при опроміненні дозами 12 Гр, 15 Гр, 4 Гр + 4 Гр + 4 Гр, 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр. Варто очікувати, що мутагенна репарація має позначитись на ефективності відновлення при дозах 12 Гр, 4 Гр + 4 Гр + 4 Гр та 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр, коли помилкова *AtRad1*-залежна репарація більш активна, ніж як правило безпомилкова *AtRAD51*-залежна гомологічна рекомбінації ДНК (рис. 3.1, рис. 3.3).

Відомо, що білок Rad1 забезпечує виправлення пошкоджень ДНК під час транскрипції (transcription-coupled repair). Коли при дозах опромінення 9 Гр та 5 Гр + 5 Гр + 5 Гр максимально знижувалася транскрипція гена *AtRad1*, могла бути заблокована система репарації пошкоджених ДНК-матриць, внаслідок чого могли утворюватись вкорочені мРНК. Дійсно, у деяких дослідах фіксували ампліфікацію вкорочених кДНК (див. рис. 3.2) – додаткового амплікону *AtKu70* довжиною 845 п.н. (доза опромінення 9 Гр) та додатковий амплікон *AtEF1α* довжиною 419 п.н. (доза 5 Гр + 5 Гр + 5 Гр). Ми також припускаємо, що додатковий амплікон *AtEF1α* при повторюваному опроміненні в дозі 5 Гр + 5 Гр + 5 Гр міг з'явитись внаслідок РНК-інтерференції між мРНК *AtEF1α* та міРНК *Ath_wt_00191*, що має 100% гомології з мРНК *AtEF1α*. Поява цієї міРНК зафіксована в умовах сольового стресу.

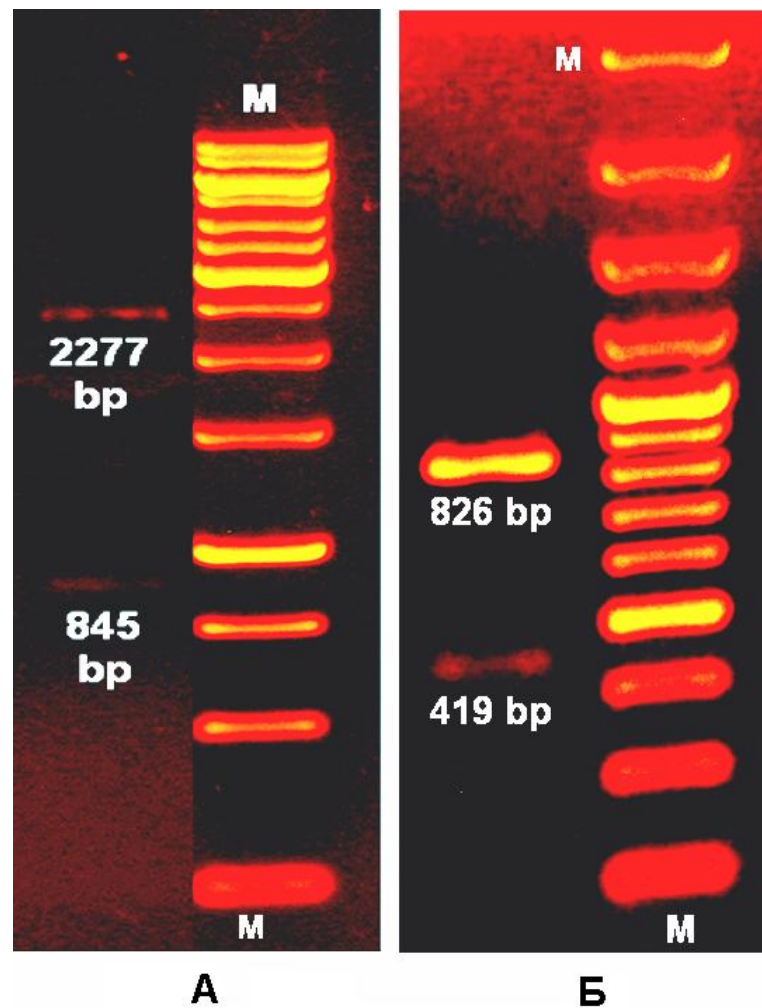
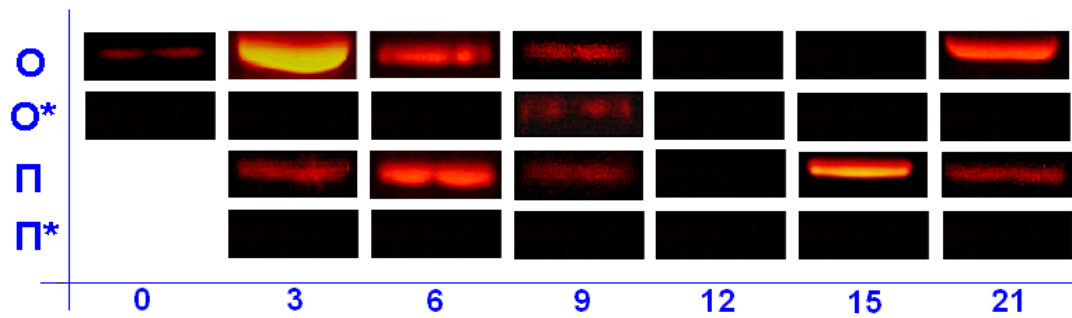
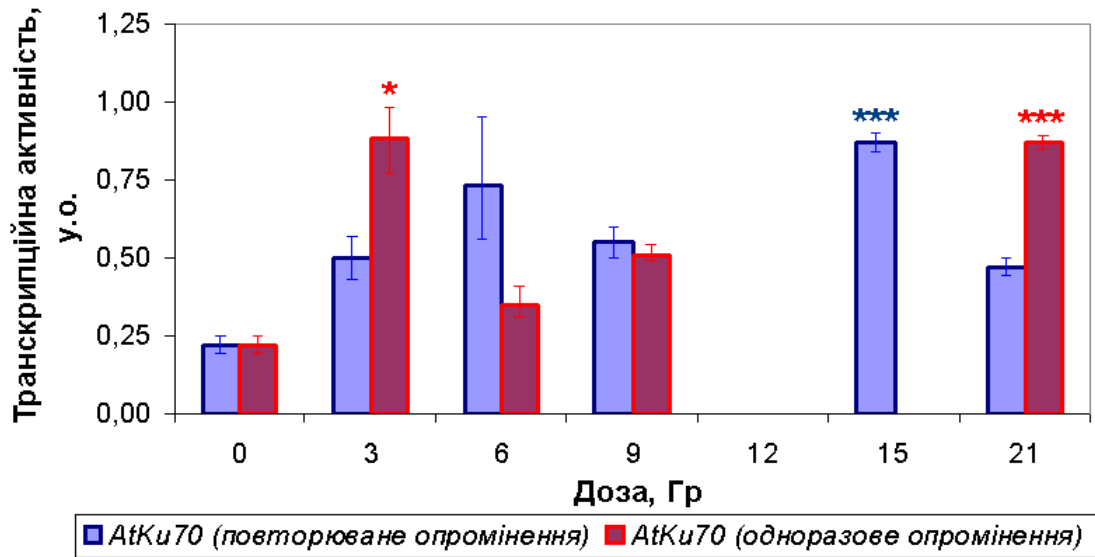


Рис. 3.2. Додаткові амплікони на електрофореграмах

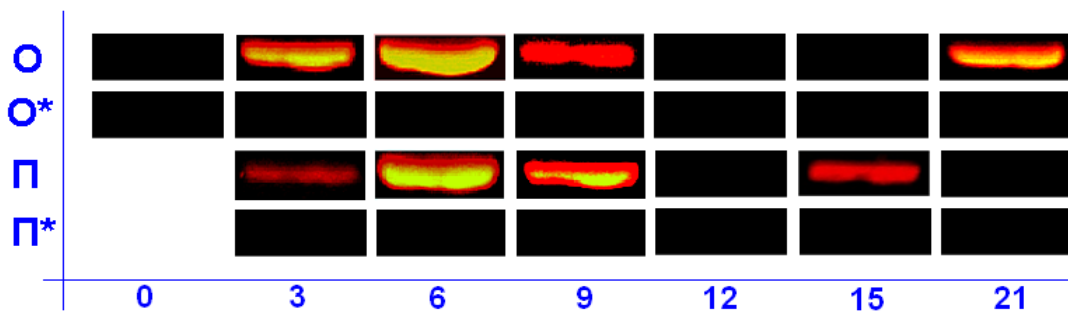
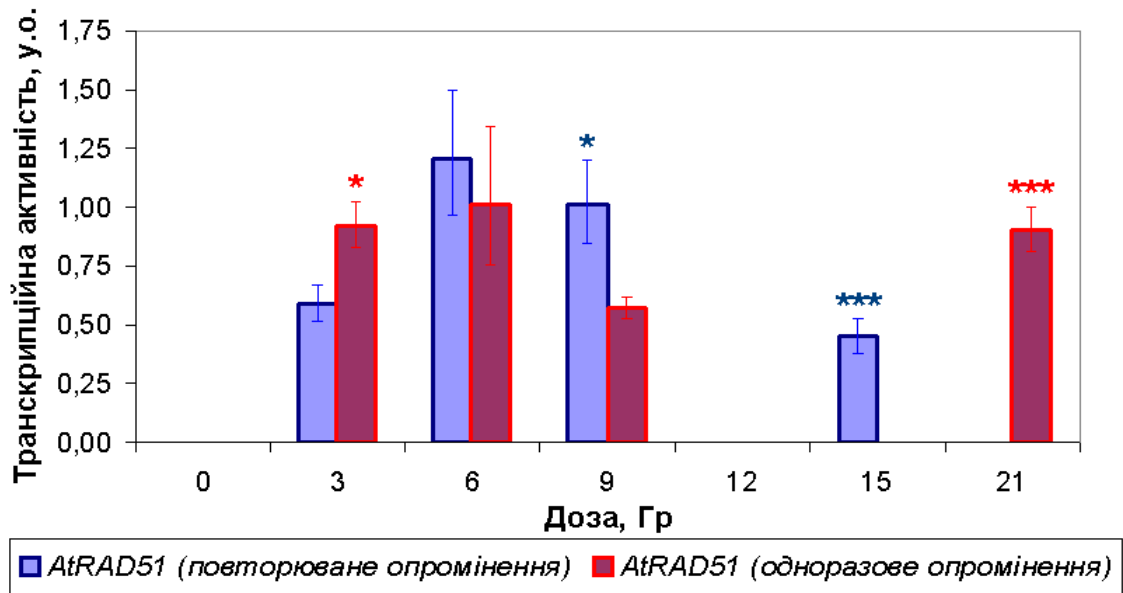
А – *AtKu70*, 9 Gy (основний амплікон довжиною 2277 п.н., додатковий ~845 п.н.); **Б** – *AtEF1α*, 5 Гр + 5 Гр + 5 Гр (основний амплікон довжиною 826 п.н., додатковий ~419 п.н.).

М – маркери молекулярної маси: **А** – GeneRuler 1 kb DNA Ladder, **Б** – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

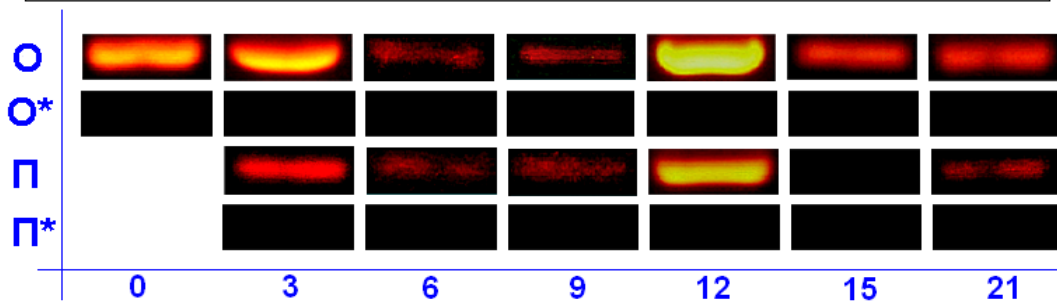
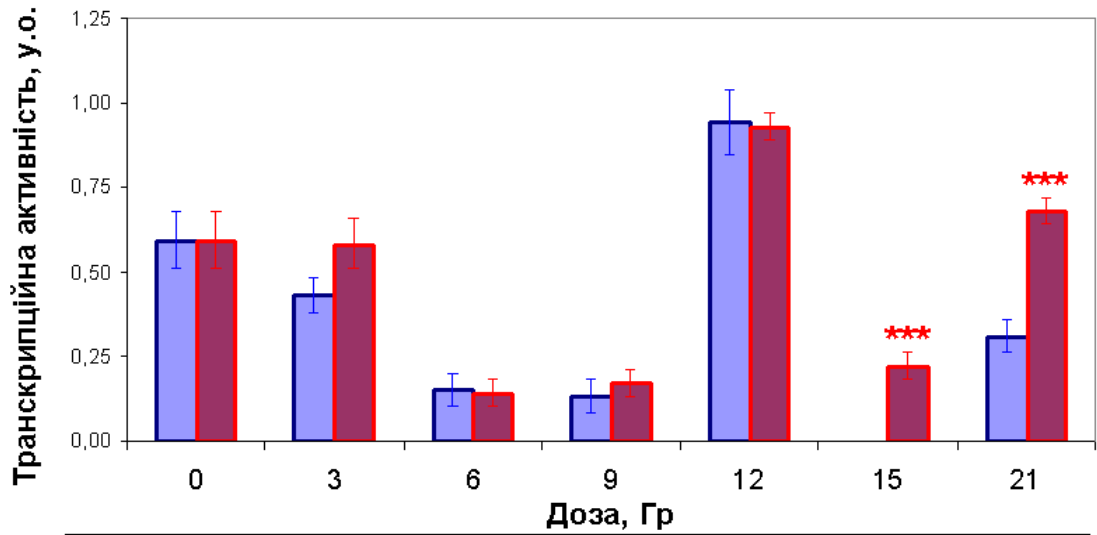
Примітка. Приблизна довжина додаткових фрагментів була розрахована за допомогою логарифмічної функції залежності відстані, яку проходять у гелі фрагменти маркера, від їх молекулярної маси.



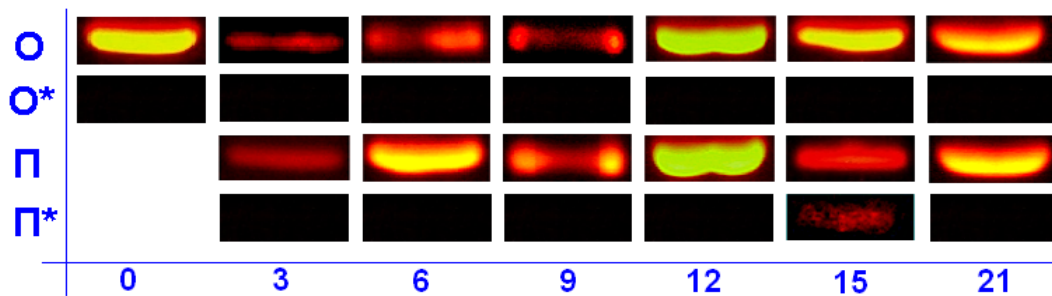
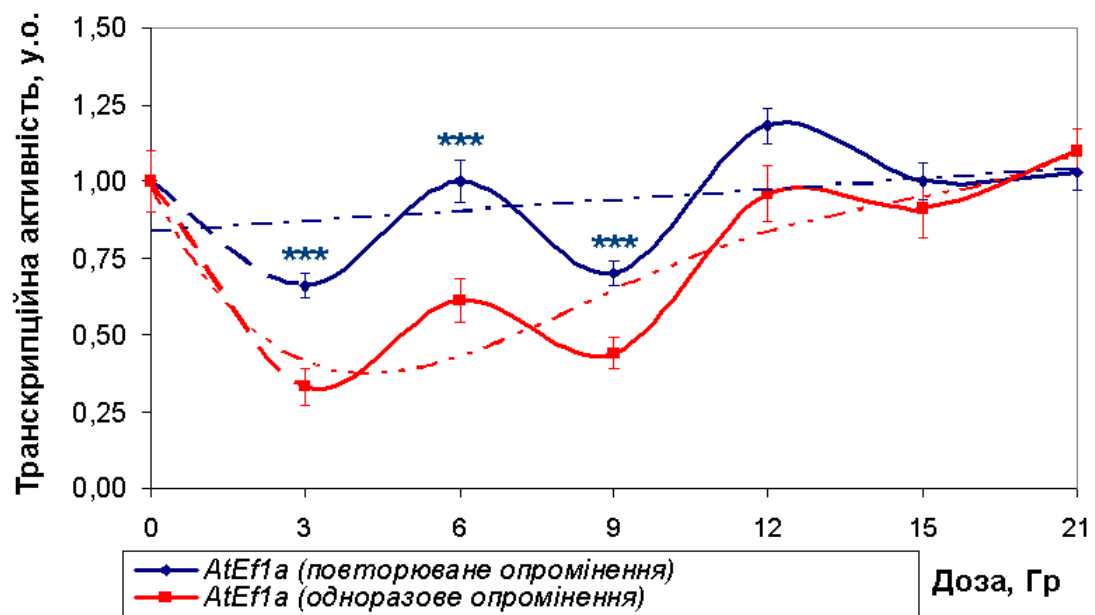
А



Б



В



Г

Рис. 3.3. Рівень транскрипційної активності генів *AtKu70* (А), *AtRAD51* (Б), *AtRad1* (В), *AtEF1α* (Г) при одноразовому і повторюваному (фракціонованому) опроміненні. Пунктиром позначено тренди дозових залежностей (секція Г), апроксимація здійснена за допомогою поліноміальної функції.

Електрофореграми – *O*: одноразове опромінення, основний амплікон; *O**: одноразове опромінення, додатковий амплікон; *П*: повторюване (фракціоноване) опромінення, основний амплікон; *П**: повторюване (фракціоноване) опромінення, додатковий амплікон. Відсутність амплікона є показником рівня активності гена нижче порогу виявлення специфічної кДНК за допомогою гель-денситометрії.

Статистична достовірність відмінностей між варіантами: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Єдиний режим, при якому забезпечувалося домінування NHEJ-репарації за рахунок більш високої активності гена *AtKu70* – це повторюване опромінення 5 Гр + 5 Гр + 5 Гр (рис. 3.1). Водночас, при опроміненні рослин в сумарних дозах 3-9 Гр одноразово та повторювано, а також при опроміненні в дозі 21 Гр одноразово досягалося домінування *AtRAD51*-залежної гомологічної рекомбінації над іншими шляхами репарації.

Неочікуваною знахідкою стала репресія транскрипції гена, що кодує фактор негомологічного з'єднання кінців дволанцюгових розривів ДНК *Ku70* у варіанті, коли рослини опромінювали у дозі 4 Гр + 4 Гр + 4 Гр або одноразово в дозі 15 Гр. Це супроводжувалось активацією експресії гена *AtRad1* (рис. 3.3 А, 3.3 В).

Сумарна експресія генів *AtKu70*, *AtRAD51* та *AtRad1* знижувалась до мінімального значення в умовах одноразового опромінення в дозі 15 Гр (див. рис. 3.4). Також це єдина доза досліджуваного інтервалу, при якій сумарна транскрипційна активність зазначених генів була значно вищою у випадку фракціонування дози.

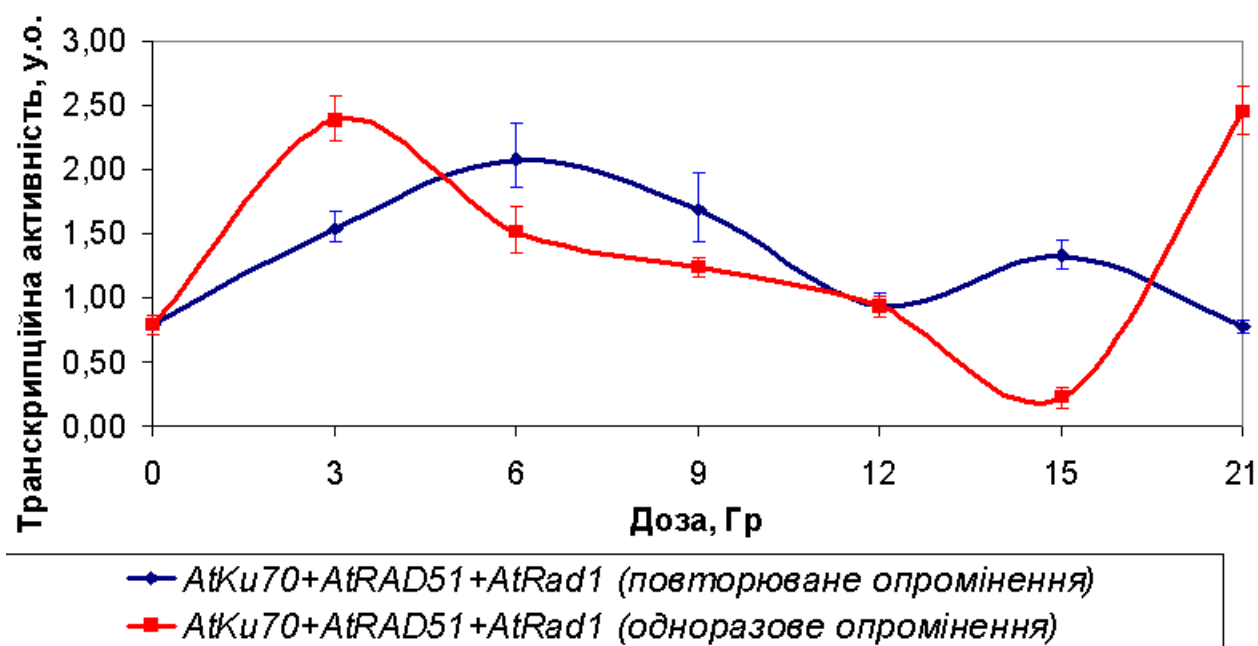
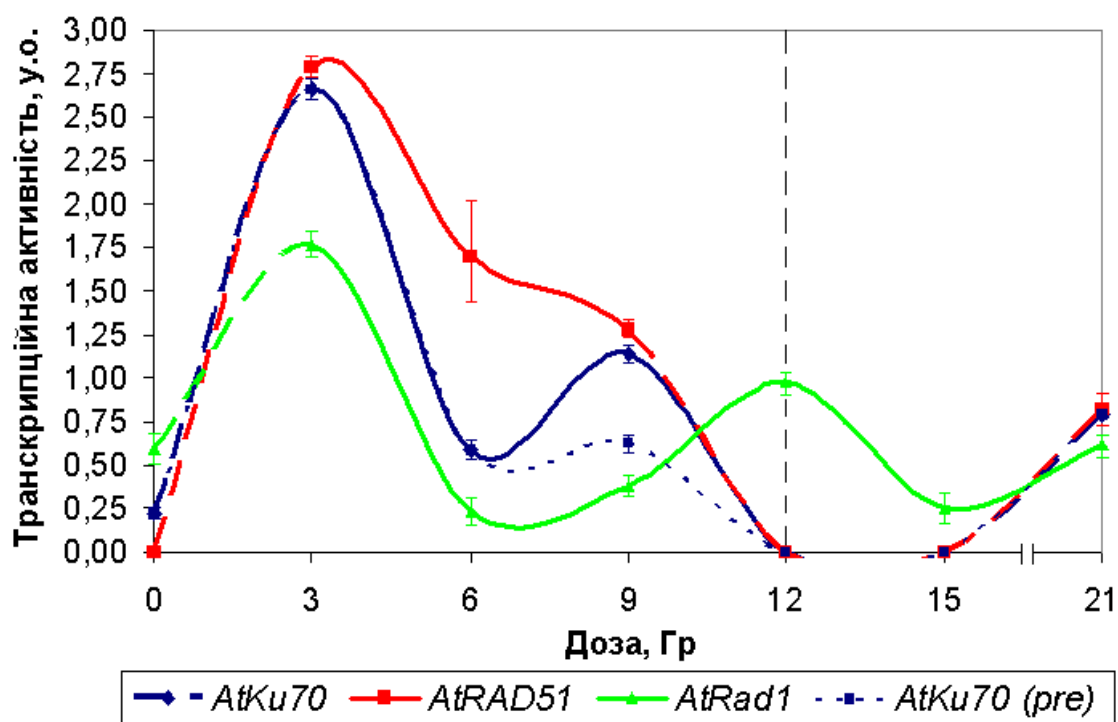


Рис. 3.4. Сумарная транскрипційна активність генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* при опроміненні рослин *A. thaliana* в дозах 3-21 Гр

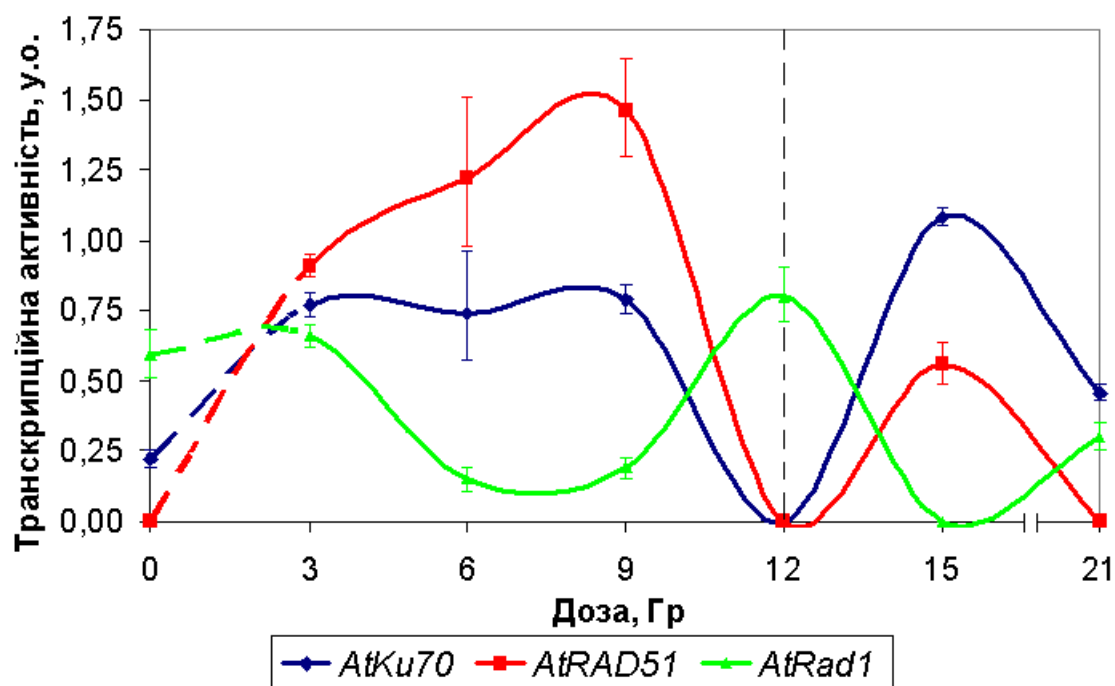
Максимум сумарної експресії досліджуваних генів білків репарації пошкоджень ДНК *A. thaliana* досягався при дозах 3 Гр і 21 Гр при одноразовому опроміненні та 6 Гр і 15 Гр при повторюваному опроміненні. При дозах 6-12 Гр режим опромінення не впливав на рівень сумарної транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51* та *AtRad1*.

3.2. Зміна характеру транскрипційної відповіді в критичних точках дозової залежності

Важливою характеристикою залежності експресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* від дози опромінення була наявність критичних точок (локальних екстремумів) дозових залежностей, тобто таких доз одноразового або повторюваного опромінення, при яких якісно змінювалося співвідношення транскрипційної активності основних факторів репарації структурних пошкоджень ДНК *A. thaliana*.



А



Б

Рис. 3.5. Залежність транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* від дози опромінення в умовних одиницях транскрипційної активності гена *AtEF1α* при даній дозі опромінення

А – одноразове, Б – повторюване (фракціоноване) опромінення.

Згідно з отриманими даними критичними точками залежностей були дози 12 Гр та 15 Гр. При дозі 12 Гр і вище характер дозових залежностей різко змінювався (рис. 3.1).

Різні патерни транскрипційної активності досліджуваних репаративних генів у інтервалах 3-9 Гр та 12-15 Гр добре помітні, якщо транскрипційну активність *AtKu70*, *AtRAD51* й *AtRad1* виразити в одиницях активності *AtEF1α* при відповідній дозі, а не при 0 Гр (рис. 3.5). Такий тип залежностей відображає співвідношення індукцибельної та конститутивної транскрипції у клітинах листків опромінених рослин при різних дозах опромінення.

На наш погляд критичні точки є наслідком наявності двох різних за радіочутливістю субпопуляцій клітин листків арабідопсису. Існування таких субпопуляцій у меристемах рослин як складової механізму резервування клітинних потоків показане у роботах академіка Д.М.Гродзинського та його співробітників [51;175;176].

Отримані залежності можна пояснити тим, що в нормі активною є радіочутлива субпопуляція, в якій при сублетальних дозах опромінення 3-9 Гр ініціюється індукцибельна репарація ДНК. Активність клітин радіостійкої популяції репресується активністю клітин радіочутливої популяції. Дози вище 12 Гр інактивували пригнічення радіочутливою субпопуляцією клітин радіорезистентної популяції, у яких при дозах 15 Гр та 21 Гр також спостерігалася індукція генів репарації ДНК. При пороговій дозі 12 Гр активність радіочутливої популяції низька, але достатня для підтримання радіорезистентної популяції у неактивному стані. Тому при цій дозі відмічалася найнижча активність репаративних генів. При такому механізмі відповіді на дію радіації у сублетальних дозах режим фракціонування з інтервалом у 24 години є достатнім для активації здатних до активного поділу клітин резервних меристем, що водночас має призводити до більшого у порівнянні з одноразовим опроміненням рівня пошкоджень на клітинному та тканинному рівнях за рахунок підвищення загальної радіочутливості меристем, відповідно, і до менш ефективного пострадіаційного відновлення на організменому рівні.

Результати перевірки цього припущення наведені у наступному розділі дисертації.

3.3. Патерн активності досліджуваних генів репарації ДНК при хронічному низькодозовому опроміненні *A.thaliana*

Окремим і важливим питанням є характер експресії ключових генів репарації структурних пошкоджень ДНК рослин при хронічному опроміненні з низькою потужністю сублетальними малими дозами радіації. Даний режим опромінення характерний для територій, які зазнали радіоактивного забруднення внаслідок господарської та військово-технічної діяльності людини, після техногенних катастроф, в регіонах з аномально високою природною радіоактивністю, підчас космічних польотів за межами магнітосфери Землі.

У сучасній радіобіології проблема малих доз займає особливе місце. Питання безпосередніх і віддалених наслідків опромінення біологічних об'єктів в малих дозах має велике значення для фундаментальної науки, а також у зв'язку з прикладними аспектами розробки та використання тест-систем. Наявні дані щодо впливу малих доз суперечливі: встановлений як їх пригнічувальний, так і стимулюючий вплив на різні процеси, що протікають в живих організмах різних таксономічних груп. Досі до кінця не зрозумілі й механізми виникнення, розвитку та згасання радіобіологічних ефектів малих доз.

Показано, що при малих поглинених дозах ключову роль грає розподіл мікродоз по відношенню до внутрішньоклітинних структур – мікродозиметричні параметри опромінення, а також вплив опромінених клітин, компартментів клітин або тканин на неопромінені [178;186;201]. Тому вплив хронічного опромінення малої потужності більшою мірою визначається фізіологічним станом об'єкту, а не поглиненою дозою радіації. Також вважається доведеним, що наслідки опромінення живих організмів в малих дозах пов'язані з переважанням немішених ефектів над мішеними [171;174;180]. При цьому на даний момент не вироблено навіть

загальноприйняте уявлення про критерії «малості». Наприклад, експерти МАГАТЕ вважають малими поглинені дози до 250 мГр, а малими потужностями – випромінювання 90 мГр/год і нижче [85]. У доповіді UNSCEAR за 2012 р. верхня межа малих доз встановлена на рівні 100 мЗв, а за параметром потужності 6 мГр/год [10].

Зрозуміло, що інтервал малих доз для різних видів, як і для окремих стадій онтогенезу одного організму, буде різним. Слід також врахувати, що в разі хронічного опромінення об'єктів, клітини яких активно проліферують, ефективну поглинену дозу в інтервалі малих доз слід розраховувати не на основі експозиційної дози, а виходячи з параметра добового дозового навантаження. Це пов'язано з тим, що більша частина первинних клітинних ушкоджень, індукованих радіацією, в процесі мітозу не передається дочірнім клітинам. Тривалість же мітотичного циклу більшості клітин багатоклітинних організмів синхронізується циркадними ритмами.

Виходячи з наведених вище міркувань для дослідження впливу хронічного опромінення на *Arabidopsis thaliana* нами були обрані дози, які не перевищують або близькі до верхньої межі малих доз за критеріями, прийнятими UNSCEAR і МАГАТЕ [79].

Змішаним γ/β^- випромінюванням від пробірки з розчином хлориду ^{137}Cs опромінювали два типи об'єктів – сухе насіння і проростки (докладніше див. розділ 2). Потужність доз опромінення у наших дослідах також була значно нижче оцінок порогу потужності низькодозового опромінення. Сумарні дози склали 30 сГр (насіння рослин дикого типу), потужність дози 0,45 мГр/год та 3 сГр (проростки дикого типу від проростання до 7 доби вегетації), потужність дози 0,18 мГр/год; 20 сГр (проростки дикого типу та *Atmsh2 SALK_002708* від проростання неопроміненого насіння до 35-ої доби вегетації, потужність дози 0,24 мГр/год).

Виявилось, що як у випадку рослин, знятих з опромінення за 2 години перед екстракцією РНК, так і у випадку рослин, які були вирощені з опроміненого насіння, активність досліджуваних нами генів репарації ДНК була

змінена відносно контролю (рис. 3.6, рис. 3.7). У листках рослин дикого типу і мутанту *Atmsh2*^{-/-} підвищувалась активність генів *AtRAD51* та *AtRad1*, але транскрипційна активність *AtKu70* не змінювалась. Наші дані кореспондують з результатами інших досліджень, у яких показано підвищення рівня експресії вказаних генів рослин в умовах хронічного іонізуючого опромінення (Danchenko, 2018). При опроміненні насіння в дозі 30 сГр (0,45 мГр/год) активність гена *AtRad1* зростала дещо більше, ніж при опроміненні проростків у дозі 20 сГр (0,24 мГр/год) – у 1,5 рази та у 1,4 рази по відношенню до неопроміненого контролю відповідно.

В цілому отримані результати демонструють здатність малих доз хронічного іонізуючого опромінення з низькою потужністю індукувати пошкодження геному, а також клітинну відповідь на ці пошкодження – DDR (див. розділ 1). Зростання транскрипційної активності гена *AtRad1*, як було зазначено у розділі 1, свідчить про появу в клітинах вільної одноланцюгової ДНК внаслідок ендонуклеазної активності у сайтах одноланцюгових пошкоджень, що в свою чергу активує ATR-залежний сигнальний каскад, одним з ефекторних компонентів якого є активація експресії *AtRad1*.

Водночас активація експресії гена *AtRAD51* відбувається за участю ATM-протеїнкінази, яка є клітинним сенсором-медіатором дволанцюгових розривів ДНК. Індукція експресії гена *AtRAD51* вважається маркером ДР ДНК, які, таким чином, мають виникати у клітинах арабідопсису внаслідок дії навіть малих доз рідкоіонізуючої радіації. Імовірно, механізм появи такого роду пошкоджень є немішеним. Можна припустити, що в його основі лежить перетворення у дволанцюгові розриви одноланцюгових пошкоджень ДНК (маркером виникнення яких є підвищення транскрипційної активності *AtRad1*), що здатні передаватись через мітотичний бар'єр і персистувати у поколіннях неопромінених клітин, які виникли внаслідок поділу клітин опроміненого об'єкту. ДР ДНК можуть виникати з пробілів у ДНК та нерепарованих ОР ДНК підчас реплікації у ранній S-фазі клітинного циклу [28;87]. Даний механізм пояснює наявність DDR-відповіді на подвійні розриви ДНК у рослин з

опроміненого насіння через тривалий час (35 діб) після припинення дії радіаційного чинника.

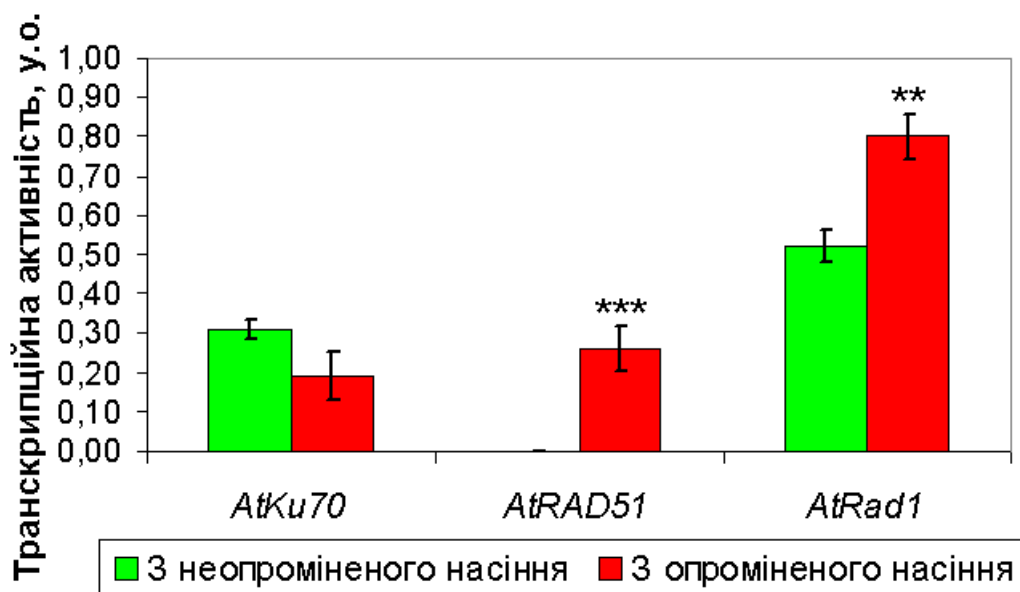


Рис. 3.6. Транскрипційна активність генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у розеткових листках 35-добових рослин *A.thaliana* з хронічно опроміненого насіння. Статистична достовірність відмінностей між варіантами опромінених та неопромінених рослин: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

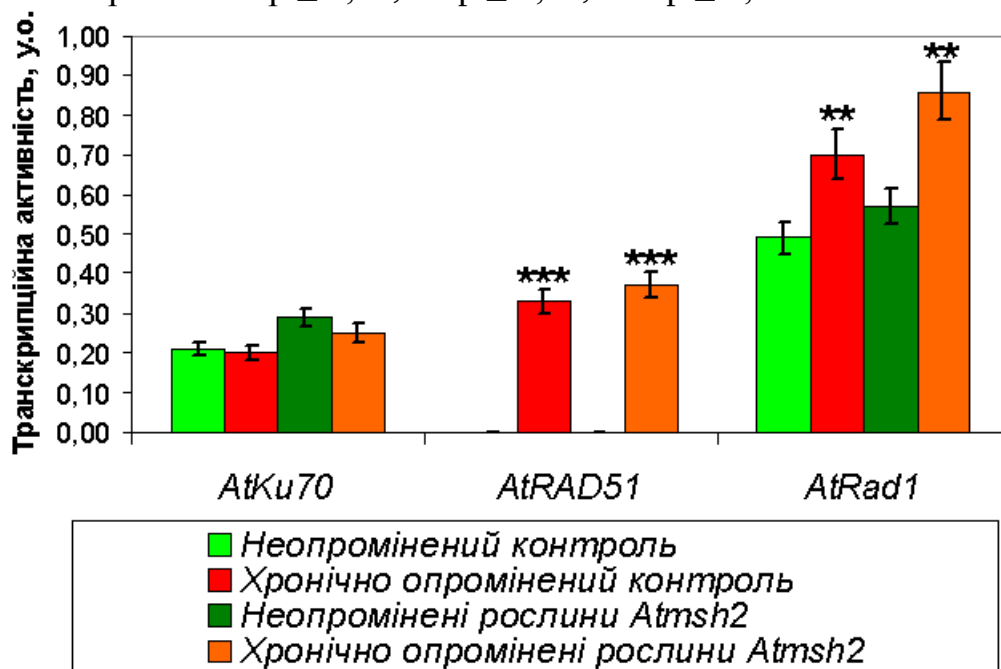


Рис. 3.7. Транскрипційна активність генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у розеткових листках 35-добових рослин *A.thaliana* ліній дикого типу та мутанта *Atmsh2* SALK_002708, хронічно опромінюваних від початку проростання до 35-ї доби вегетації. Статистична достовірність відмінностей між варіантами опромінених та неопромінених рослин: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.



Рис. 3.8. Гіпотетичний механізм активації ATR-залежної DDR-відповіді та нестабільності геному еукаріот після індукції критичної кількості нерепарованих одноланцюгових пошкоджень ДНК

Особливості функціональної активності та експресії ендонуклеази Rad1, відзначені у розділі 1, дають підстави вважати цей білок та відповідний ген потенційним посилювачем нестабільності геному у випадку великої кількості індукованих опроміненням пошкоджень ДНК, які не встигає репарувати система ексцизійної репарації або, у випадку їх кластерного характеру, – гомологічна рекомбінація (рис. 3.8). Ознакою активації даного механізму в клітинах *A. thaliana* можна вважати суттєве зростання транскрипційної активності гена *AtRad1*, яке, як ми показали, спостерігалось при одноразовому та повторюваному опроміненні в дозі 12 Гр.

3.4. Трансгенераційне збереження радіаційно модифікованої експресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*

Протягом останніх 30 років активно вивчаються механізми модифікації стабільності геному живих організмів під впливом таких стресових факторів, як дія хімічних мутагенів, важких металів, ультрафіолетового та іонізуючого випромінювання, екстремальних кліматичних змін. На роль одного з механізмів радіаційно індукованої нестабільності геному пропонують передачу "пам'яті" про радіаційне опромінення через мітотичний та мейотичний бар'єр [82;185]. В

світлі даних, отриманих нами на рослинах, вирощених з хронічно опроміненого насіння, в яких через 35 діб після опромінення був зафіксований підвищений рівень експресії генів *AtRAD51* та *AtRad1*, постало питання, чи зберігається цей патерн у наступному поколінні.

З метою вивчення такої можливості ми дослідили транскрипційну активність генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у листках неопромінених рослин покоління F_1 , вирощених з насіння опромінених рослин покоління F_0 . Досліди проводили на нащадках рослин, опромінення яких призводило до суттєвих змін у експресії досліджуваних генів у поколінні F_0 при дозах: 3 Гр; 1 Гр + 1 Гр + 1 Гр; 12 Гр; 4 Гр + 4 Гр + 4 Гр; 15 Гр; 5 Гр + 5 Гр + 5 Гр; 21 Гр; 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр.

Отримані результати підтвердили, що патерни експресії генів *AtRAD51* та *AtRad1* можуть успадковуватись трансгенераційно, а патерни експресії гена *AtKu70* – ні. Простежується аналогія із зміненими патернами експресії відповідних генів при дії малих доз хронічної радіації на проростки, коли теж спостерігалась транскрипційна активація *AtRAD51* та *AtRad1* без активації *AtKu70* (розділ 3.4). Успадкування патерна експресії *AtRAD51* мало місце при дозах 3 Гр та 12 Гр, частково при 15 Гр, але не відмічалось при дозі опромінення 21 Гр (рис. 3.9, таблиця 3.1). Таким чином, імовірність успадкування зміненого патерна експресії даного гена знижується разом із зростанням сумарної дози.

Рівень транскрипційної активності гена *AtRad1* у поколінні F_1 при всіх досліджених дозах одноразового та повторюваного (фракціонованого) опромінення перевищував відповідний показник у поколінні F_0 .

Аналіз таблиці 3.1 демонструє, що знижена активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* не успадковувалася. Показово, що у листках рослин неопроміненого покоління F_1 рівень їх експресії, як правило, вищий у порівнянні з опроміненим поколінням F_0 . Особливо це стосується *AtRad1*.

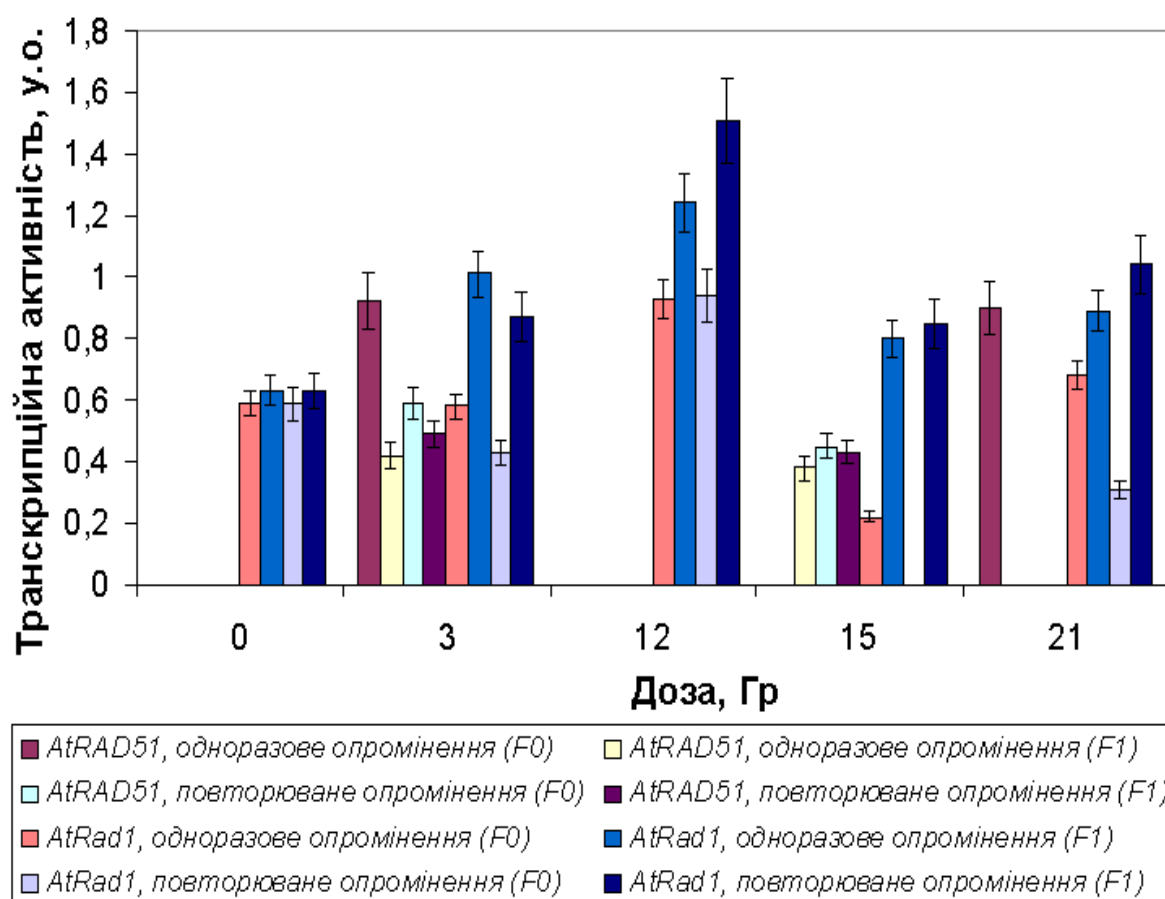


Рис. 3.9. Транскрипційна активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* у поколінні F_0 (опромінені рослини) та F_1 (неопромінені рослини з насіння рослин, опромінених у відповідній дозі)

Отримані результати дають підстави пояснити феномен збереження у першому поколінні нащадків опромінених рослин підвищеної транскрипційної активності генів *AtRAD51* та *AtRad1* трансгенераційною передачею нерепарованих або неправильно репарованих одноланцюгових пошкоджень ДНК. Подібно до того, як ці пошкодження, імовірно, долають мітотичний бар'єр у випадку з рослинами, вирощеними з хронічно опроміненого насіння, персистуючі пошкодження ДНК можуть конвертуватись у ДР ДНК під час реплікації, зумовлювати нестабільність геному, призводити до накопичення генетичного вантажу в популяції нащадків опромінених рослин.

Таблиця 3.1

Збереження патернів еспресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у поколінні F_1 (неопромінені нащадки опроміненних рослин)

F_1/F_0	<i>AtKu70</i>	<i>AtRAD51</i>	<i>AtRad1</i>
3 Гр	≠	=>	↑
1 Гр + 1 Гр + 1 Гр, інтервал 24 год.	≠	=>	↑
12 Гр	≠	<>	=>
4 Гр + 4 Гр + 4 Гр, інтервал 24 год.	≠	<>	=>
15 Гр	≠	↑	↑
5 Гр + 5 Гр + 5 Гр, інтервал 24 год.	≠	=>	↑
21 Гр	≠	≠	↑
7 Гр + 7 Гр + 7 Гр, інтервал 24 год.	≠	<>	↑

Умовні позначення у таблиці 3.1:

=> Зберігається підвищений рівень експресії

≠ Змінений рівень експресії не зберігається

<> Рівень експресії значуще не змінюється як в поколінні опроміненних рослин, так і в першому поколінні, отриманому з насіння цих рослин

↑ Експресія гена в клітинах опроміненних рослин не змінюється або знижується, а в клітинах нащадків першого покоління зростає

Персистуючі латентні пошкодження ДНК можуть становити значну частину генетичного вантажу опроміненних організмів, впливати на активність систем репарації ДНК. Вони здатні призводити до епігенетичних змін, що викликають дерегуляцію генної експресії [185] та індукують програмоване клітинне старіння [28]. Таким чином, довгострокова модифікація активності генів репарації ДНК після опромінення може впливати не тільки на

пострадіаційне відновлення, але й на онто- та філогенетичну адаптацію рослин, як і інших еукаріот.

3.5. Корегуляція ранньої транскрипційної відповіді ключових генів репарації розривів ДНК *Arabidopsis thaliana* як частина механізму DDR

Значну роль у відновленні рослин, особливо після фракціонованого опромінення, відіграє коекспресія генів. Наявність регуляторних механізмів такої коекспресії підтвержують високі статистично достовірні коефіцієнти парної та часткової кореляції Пірсона між рівнями транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtEF1 α* при різних сублетальних дозах іонізуючого опромінення в інтервалі 3-21 Гр (див. таблицю 3.2 та рис. 3.10).

Таблиця 3.2

Коефіцієнти парної кореляції Пірсона між рівнями транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtEF1 α* при опроміненні у дозах 3-21 Гр

Одноразове опромінення / повторюване опромінення	<i>AtKu70</i>	<i>AtRAD51</i>	<i>AtRad1</i>	<i>AtEF1α</i>
<i>AtKu70</i>		0,82**/0,64*	0,04/-0,96***	-0,39/-0,35
<i>AtRAD51</i>	0,82**/0,64*		-0,26/-0,64*	-0,51/-0,53
<i>AtRad1</i>	0,04/-0,96***	-0,26/-0,64*		0,46/0,41
<i>AtEF1α</i>	-0,39/-0,35	-0,51/-0,53	0,46/0,41	

Статистична достовірність відмінності коефіцієнтів кореляції від 0: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Примітка. Ліворуч від знаку «/» подано коефіцієнти парної кореляції при одноразовому, праворуч – при повторюваному опроміненні.

Оскільки, як було зазначено раніше (розділ 1), транскрипційний контроль індукбельної експресії *AtRAD51* здійснюється транскрипційним фактором SOG1, наявність сильної достовірної кореляції між експресією *AtRAD51* та *AtKu70* як при одноразовому ($r = 0,82$), так і при повторюваному ($r = 0,64$)

опроміненні показує, що SOG1 може стимулювати також і транскрипційну активність *AtKu70*.

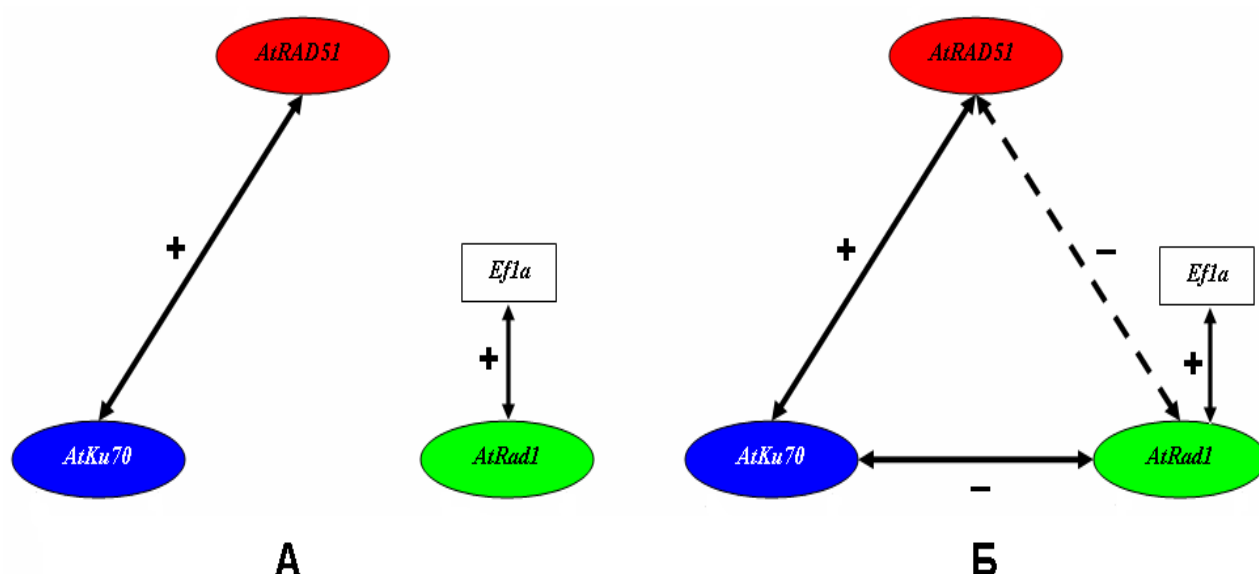


Рис. 3.10. Корегуляція експресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtEF1α* після одноразового (А) та повторюваного опромінення (Б)
Неперервні двосторонні стрілки позначають статистично часткову кореляцію між рівнями транскрипційної активності відповідних пар генів: “+”: позитивна кореляція, “-”: негативна кореляція. Пунктирна стрілка відповідає так званій хибній парній кореляції між рівнями експресії *AtRAD51* та *AtRad1*, зумовленій парними кореляціями *AtKu70* – *AtRAD51* і *AtKu70* – *AtRad1*.

Зменшення парного коефіцієнту кореляції експресії *AtRAD51* та *AtKu70* при фракціонуванні дози дозволяє припустити, що при даному режимі опромінення відбуваються зміни у регуляції SOG1-залежної транскрипційної відповіді на пошкодження ДНК. Щодо *AtRad1*, то статистично недостовірні часткові коефіцієнти кореляції з транскрипцією *AtRAD51* ($r = -0,41$ при одноразовому та $r = 0,03$ при повторюваному опроміненні) свідчать на користь регуляції його експресії за АТМ-незалежним механізмом. Стимуляція експресії даного гена є АТМ-залежною.

Аналіз даних щодо коваріації транскрипційної активності досліджуваних генів за умов одноразового та повторюваного (фракціонованого) опромінення дає підстави припустити існування механізму негативної корегуляції експресії генів *AtRad1* і *AtKu70*, що відповідає даним, отриманим на *Saccharomyces*

cerevisiae [36], й підтверджує еволюційну консервативність цього механізму серед еукаріот. Коефіцієнт кореляції Пірсона між експресією *AtRad1* та *AtKu70* статистично значуще не відрізнявся від -1, отже має місце обернено пропорційна залежність.

Слід відзначити, що сильна негативна кореляція між рівнями транскрипції генів *AtRad1* і *AtKu70* спостерігалася тільки при фракціонуванні дози з інтервалом у 24 години. Ми інтерпретуємо ці дані з точки зору наявності тривалих часових проміжків між фракціями повторного опромінення, під час яких зміни транскрипційної активності позначаються на рівні змін концентрації білків. Тобто негативна регуляція відбувається за рахунок активності не генів, а їх білкових продуктів. Враховуючи те, що при фракціонованому опроміненні у дозах 3-12 Гр транскрипційна активність гена *AtRad1* достовірно не відрізнялася від активності при одноразовому опроміненні, а для *AtKu70* такі відмінності мали місце, можна припустити, що саме ендонуклеаза Rad1 або фактор, який активує ген *AtRad1*, є потенційним негативним регулятором транскрипції *AtKu70*. Виходячи з сучасного рівня уявлень про механізми DDR (див. схему на рис. 1.1 у розділі 1) таким регулятором може бути протеїнкіназа ATR. Молекулярна природа негативної регуляції активності *AtKu70* потребує подальшого вивчення.

3.6. Висновки до розділу 3

Встановлено, що режим та доза опромінення достовірно позначаються на рівні транскрипційної активності досліджуваних генів підтримки стабільності геному *Arabidopsis thaliana*. Вивчення транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* показало відсутність статистично достовірних відмінностей між рослинами дикого типу та мутанту *Atmsh2 SALK_002708*.

У клітинах листків неопромінених рослин присутні мРНК білків *AtRad1* та *AtKu70*, але не *AtRAD51*. Як одноразове, так і повторюване (фракціоноване) опромінення викликало підвищення транскрипційної активності генів *AtKu70* і

AtRAD51 при дозах 3 Гр, 6 Гр, 9 Гр, 21 Гр. Дози 3 Гр та 21 Гр обумовлювали максимальний ефект активації сумарної транскрипції генів *AtKu70* та *AtRAD51* при одноразовому опроміненні, а дози 6 Гр та 15 Гр – при повторюваному опроміненні.

При фракціонованому опроміненні у дозі 12 Гр, а також одноразово у дозі 15 Гр спостерігалась транскрипційна репресія гена, що кодує фактор негомологічного з'єднання кінців дволанцюгових розривів ДНК *AtKu70*. Це поєднувалось з активацією експресії гена *AtRad1*. Таким чином, іонізуюче опромінення у сублетальних дозах здатне як активувати, так і пригнічувати експресію ключових генів репарації структурних пошкоджень ДНК рослин.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що гени *AtRad1* та *AtKu70* у тканинах листків арабідопсису напередодні переходу рослин до цвітіння експресуються конститутивно та індукцибельно, а ген *AtRAD51* – тільки індукцибельно.

Отримані нелінійні залежності транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* від дози опромінення з критичною точкою 12 Гр можна пояснити тим, що в нормі активною є радіочутлива субпопуляція, в якій при сублетальних дозах опромінення 3-9 Гр активується індукцибельна репарація ДНК. Дози вище 12 Гр інактивують клітини радіочутливої популяції та активують клітини радіорезистентної популяції, у яких при дозах 15 Гр та 21 Гр відбувається індукція генів репарації ДНК.

Аналіз змін транскрипційної активності гена *AtEF1 α* засвідчує, що зменшення активності конститутивної транскрипції відбувалося при дозах 3-9 Гр, які стимулюють активацію індукцибельної репарації. Даний ефект виражений при одноразовому опроміненні, але не при повторюваному, що свідчить про його короткостроковість. Отримані дані відображають DDR-відповідь клітин на індуковані радіацією пошкодження ДНК в інтервалі сублетальних доз опромінення. При повторюваній дії радіації координація репресії конститутивної транскрипції та активації індукцибельної репарації порушується.

У листках хронічно опромінених рослин дикого типу та мутанту *Atmsh2 SALK_002708* підвищувалась активність генів *AtRAD51* і *AtRad1*, але транскрипційна активність *AtKu70* при цьому не змінювалась.

Патерни експресії генів *AtRAD51* та *AtRad1* можуть успадковуватись трансгенераційно, а патерни експресії гена *AtKu70* – ні. У листках рослин неопроміненого покоління F_1 рівень експресії *AtRAD51* і *AtRad1*, як правило, був вище у порівнянні з опроміненим поколінням F_0 . Знижена активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* не успадковувалася.

Аналіз дозових залежностей демонструє наявність сильної достовірної кореляції між експресією генів *AtRAD51* та *AtKu70* при одноразовому і повторюваному опроміненні, що свідчить про SOG1-залежну індукційну активацію як *AtRAD51*, так і *AtKu70* як складову DDR-відповіді. Зменшення парного коефіцієнту кореляції експресії *AtRAD51* та *AtKu70* при фракціонуванні дози дозволяє припустити зниження ефективності SOG1-залежного сигнального каскаду при повторюваному опроміненні, можливо, в результаті сильнішого пошкодження клітин. Щодо *AtRad1*, то незначущі часткові коефіцієнти кореляції з транскрипцією *AtRAD51* показують, що регуляція його експресії здійснюється за АТМ-незалежним механізмом. Експресія даного гена, імовірно, є АТР-залежною.

Коваріація транскрипційної активності досліджуваних генів за умов одноразового та фракціонованого опромінення дає підстави припустити існування механізму негативної корегуляції експресії генів *AtRad1* і *AtKu70*.

Загалом, отримані результати вказують: 1. на значну модифікацію патернів експресії ключових генів репарації структурних пошкоджень ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в діапазоні сублетальних доз іонізуючого опромінення 0,2 Гр – 21 Гр; 2. на успадкування підвищеного рівня транскрипції генів *AtRad1* та *AtRAD51* неопроміненим поколінням нащадків опромінених рослин; 3. на наявність злагодженої системи координації активності репаративних генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*.

РОЗДІЛ 4

ДІЯ ХРОНІЧНОГО НИЗЬКОДОЗОВОГО ОПРОМІНЕННЯ НА НАСІННЯ ТА ПРОРОСТКИ РОСЛИН *A. THALIANA*

4.1. Вплив хронічного низькодозового опромінення насіння та проростків рідкоіонізуючою радіацією на ріст та розвиток *A.thaliana*

Проблема впливу хронічного іонізуючого випромінювання на онтогенез і морфогенез живих організмів є однією з ключових в рамках системної парадигми в сучасній радіобіології. Дані щодо дії малих доз суперечливі: встановлено як їх пригнічувальний, так і стимулюючий вплив на різні процеси, що протікають в живих організмах [25;45;48;91;117;174;182;187-189;191]. Досі не зрозумілий і механізм (механізми) виникнення, розвитку та згасання радіобіологічних ефектів малих доз.

У попередньому розділі (розділ 3.3) були наведені дані, які свідчать, що хронічне опромінення як насіння, так і проростків призводить до підвищення транскрипційної активності генів ферментів репарації ДНК *AtRad1* і *AtRAD51*, але не гена *AtKu70*. Причому проростки мутанта *Atmsh2 SALK_002708*, нокаутні за геном фактору місметч-репарації MSH2, не відрізнялися від хронічно опромінених рослин дикого типу за рівнем експресії *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*.

Оскільки накопичені дози рідкоіонізуючої радіації в наших дослідах з хронічним опроміненням малі в порівнянні з інтервалом напівлетальних доз (0,2 Гр для проростків і 0,3 Гр для насіння), то частина спостережуваних ефектів радіаційного впливу можуть бути віднесені на рахунок зміни активності основних генів відновлення пошкоджень структури ДНК, а не самих первинних пошкоджень. Так, наші досліді показали значущий вплив хронічного опромінення в малих дозах на ріст і розвиток рослин *Arabidopsis thaliana*. Енергія проростання насіння на 7-му добу хронічного опромінення проростків з потужністю дози 0,18 мГр/год на 19% перевершувала контрольний

показник ($p < 0,01$). Водночас проростки, отримані з опроміненого сухого насіння, не демонстрували подібних відмінностей (рис. 4.1 А).

У опромінюваних проростків раніше у порівнянні з контрольним варіантом з'являлися перші два справжніх листка (рис. 4.1 Б). Також слід зазначити прискорений ріст гіпокотилу у рослин дослідного варіанту (рис. 4.1 В). Причому міжгрупові відмінності за темпом росту гіпокотилу статистично недостовірні для проростків обох варіантів однієї стадії розвитку – сім'ядоль або утворення первинної розетки з двох справжніх листків (рис. 4.1 Г). Цей висновок підтверджується тим, що дослідний і контрольний варіанти проростків у фазі зелених сім'ядоль та первинної розетки гомогенні як за середнім значенням, так і за дисперсією довжини гіпокотилу. Проте, ми зафіксували значущі відмінності між контрольним і дослідним варіантами за абсолютним значенням даного показника у ранній період розвитку проростків. Отже, виявлені відмінності обумовлені прискореним переходом опромінюваних проростків на стадію первинної розетки (рис. 4.1 Б, В, Г). Після формування розетки з двох справжніх листків коефіцієнт варіації довжини гіпокотилу у обох варіантах зменшується у порівнянні з високими значеннями, характерними для попередньої стадії.

Відзначимо, що рослини дослідного та контрольного варіантів практично не відрізнялися за довжиною корінців, хоча візуально і спостерігалось помітне викривлення коренів опромінених проростків, що, на наш погляд, свідчить про певні порушення у апікальній меристемі (дискоординацію поділів клітин).

Після зняття проростків з опромінення відмінності між дослідним і контрольним варіантами швидко згладжувалися. Між хронічно опроміненими в дозі 3 сГр дорослими рослинами розбіжностей за морфологічними параметрами та фенотипом не спостерігалось. Таким чином, хронічне опромінення проростаючого насіння і проростків призводило до вираженої, але короткочасної модифікації ростових процесів, пов'язаної з прискореним розвитком. У наших дослідях знайшов прояв транзитивний характер впливу іонізуючого опромінення в малих дозах.

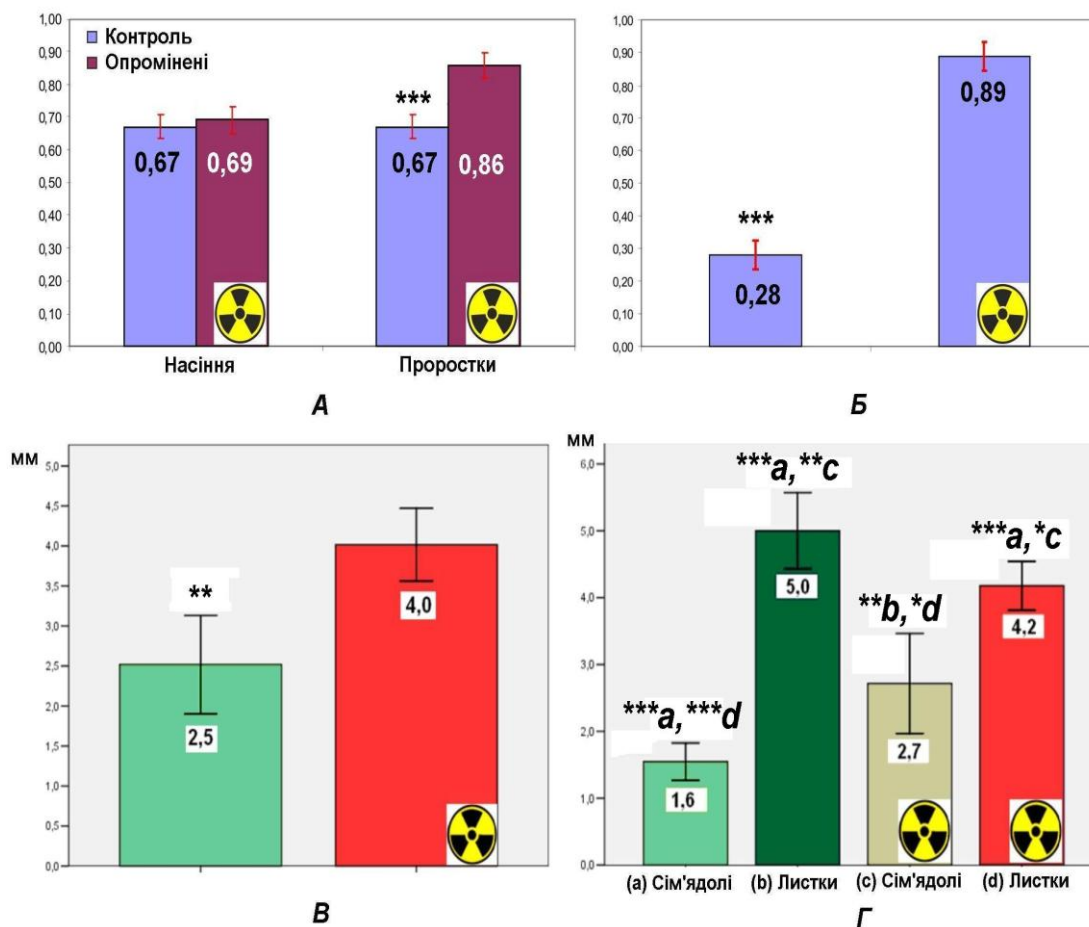


Рис. 4.1. Вплив хронічного опромінення на проростки *A.thaliana* (7-й день вегетації)

Насіння – потужність дози 0,45 мГр/год, накопичена доза 30 сГр. Проростки – потужність дози 0,18 мГр/год, накопичена доза 3 сГр.

А – Енергія проростання насіння в у.о., 7 доба пророщування. За одиницю прийнято проростання 100% об'єктів; **Б** – Частка проростків у фазі первинної розетки серед опромінених об'єктів та в контролі. За одиницю прийнято 100% рослин; **В** – Середня довжина гіпокотіля у мм; **Г** – Середня довжина гіпокотіля у мм в залежності від наявності у проростків листків первинної розетки або тільки сім'ядолі;

Статистична достовірність відмінностей між варіантами: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Примітка. На графіках показані середньоквадратичні відхилення показників.

Після опромінення насіння відмінності у рості та швидкості розвитку рослин проявлялися не відразу, а пізніше, найбільшою мірою – у період переходу від вегетативної фази розвитку до генеративної. Зокрема, рослини з опроміненого насіння зацвітали раніше на 1-2 тижні (рис. 4.2).

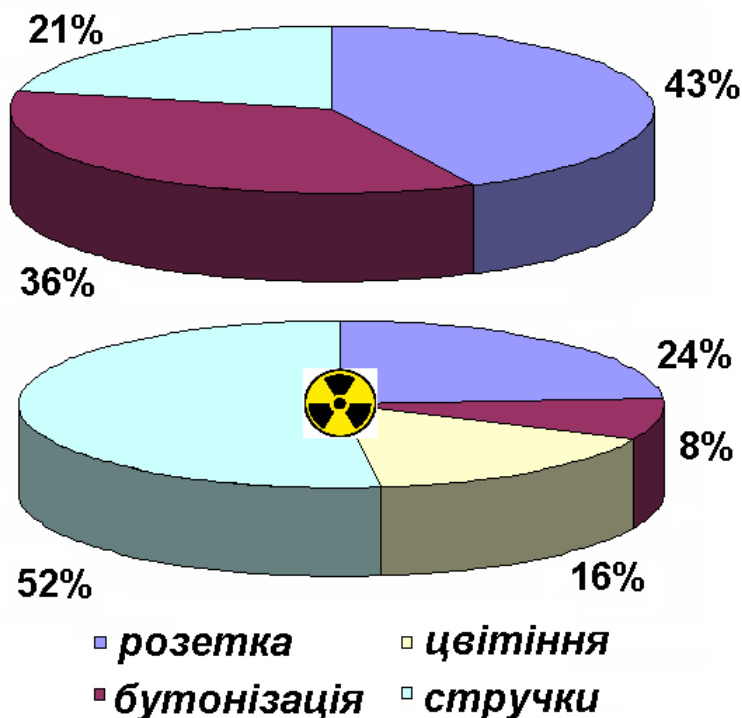


Рис. 4.2. Частка рослин *A.thaliana*, які знаходились на тій чи іншій стадії онтогенезу, 42 доба вегетації рослин, вирощених з хронічно опроміненого насіння

Невдовзі після переходу до цвітіння на рослинах дослідного варіанту утворювалися стручки. На кінець 7-го тижня на стеблах *A.thaliana* з опроміненого насіння дозріло в середньому у 2 рази більше стручків, ніж на неопромінених рослинах (13 і 6 стручків на рослину відповідно, $p < 0,01$). Однак коефіцієнт варіації даного показника в дослідній групі є вищим – 105% (63% в контролі).

На рубежі стадій вегетативного і генеративного розвитку (5-й тиждень вегетації), відмінності за темпами росту і довжиною головного стебла досягали максимального значення (рис. 4.3 А, Б, В).

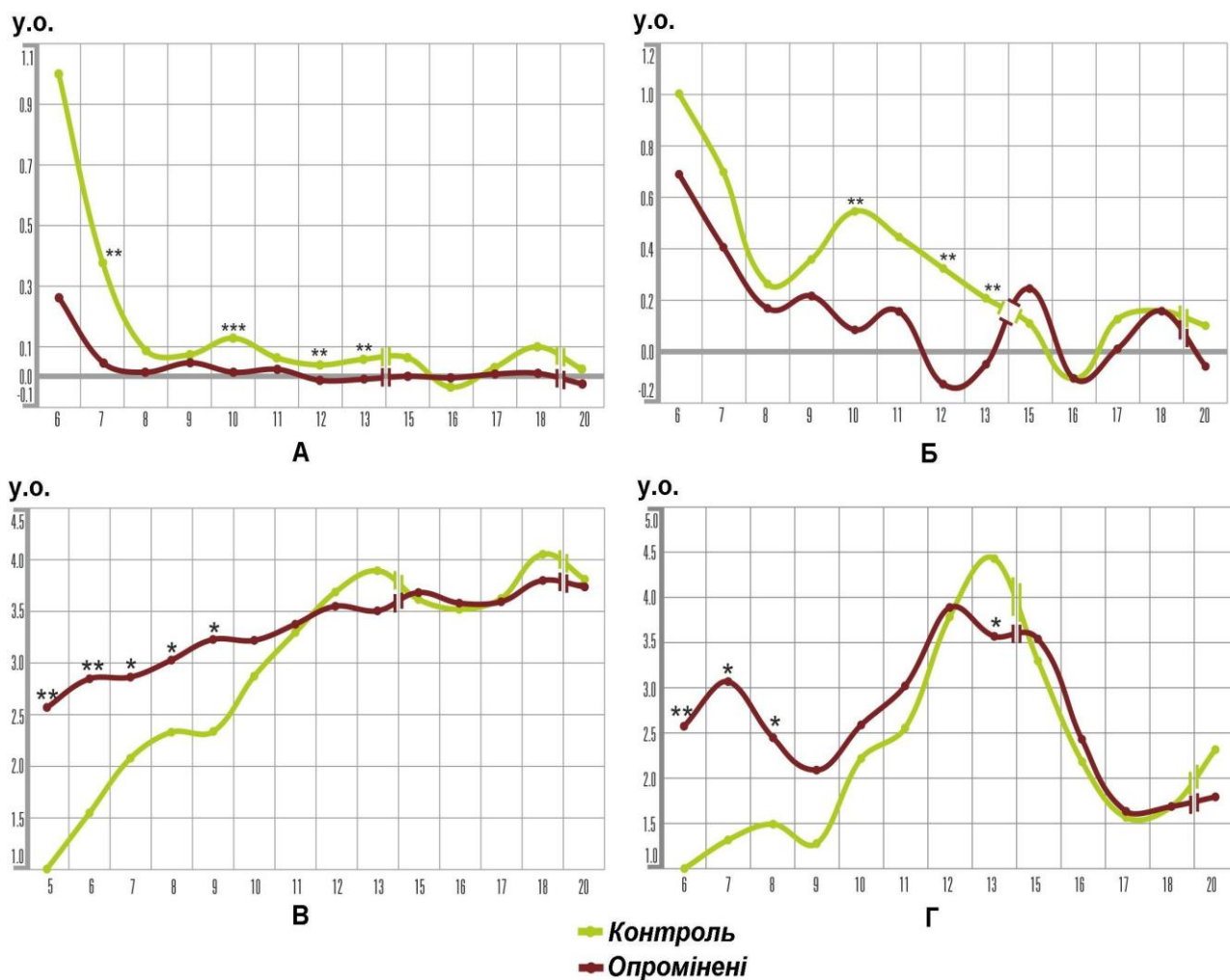


Рис. 4.3. Вплив хронічного опромінення насіння *A.thaliana* на швидкість росту головного стебла рослин і дозрівання стручків

Вісь абсцис на всіх графіках – тиждень вегетації.

А – Динаміка абсолютної швидкості росту стебла рослин в у.о. За одиницю прийнята швидкість росту стебла у контрольному варіанті на 6-му тижні вегетації; **Б** – Динаміка відносного приросту стебла рослин. За одиницю прийнятий відносний приріст стебла у контрольному варіанті на 6-му тижні вегетації; **В** – Динаміка довжини стебла рослин. За одиницю прийнята середня довжина стебла рослин у контрольному варіанті на 5-му тижні вегетації; **Г** – Динаміка середньої кількості дозрілих стручків на рослині. За одиницю прийнята середня кількість дозрілих стручків на рослину у контрольному варіанті на 6-му тижні вегетації.

Статистична достовірність відмінностей між контрольним та дослідним варіантами: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Примітка 1. Від'ємні величини швидкості росту та відносного приросту обумовлені зниженням тургору тканин стебла та, відповідно, ступеню розтягнення клітин.

Примітка 2. На 14-й і 19-й тижні вегетації вимірювання не проводилися.

Середня довжина стебла в дослідному варіанті була 135 мм, в той час як в контролі тільки 55 мм ($p < 0,001$). З 6-го тижня розвитку і до кінця спостережень ми відзначали тенденцію до постійного зниження середньої швидкості росту стебла рослин обох варіантів і паралельне зменшення відмінностей між ними. В цілому, достовірна диференціація за швидкістю ростових процесів спостерігалася в період між 2-м і 5-м тижнями вегетації, коли рослини з дослідного варіанту різко випереджали контрольні, та з 10-го по 13-й тиждень, коли навпаки більш висока швидкість росту була зафіксована у контрольному варіанті.

Переломний період припадав на 11-12-й тиждень вегетації, коли в дослідному варіанті з'являлися зав'язі рослини. Звідси можна зробити висновок, що не контрольні рослини починали випереджати дослідні за швидкістю росту, а дослідні відставали від контрольних. На це вказує різке зниження темпів росту в дослідному варіанті на 11-12 тиждень вегетації (рис. 4.3 Б).

Аналіз динаміки абсолютної довжини стебла та дозрівання стручків за повний вегетаційний період дозволяє зробити висновок, що виявлена тенденція не є випадковою (рис. 4.3 Б, В). Обидва показники в дослідному варіанті з 6-го по 9-й тиждень вегетації перевищували контрольні значення. З 10-го по 13-й тиждень середня довжина стебла в обох варіантах збільшувалася (але вже разом із зниженням швидкості росту), а після 13-го тижня досягала максимуму.

У період з 10-го по 13-й тиждень вегетації зростала й кількість дозрілих на пагонах стручків, потім до кінця дослідів спостерігалось зниження цього показника за рахунок опадів (перша хвиля опадів припадала на 8-9-й тиждень вегетації). Також слід зазначити наявність першого піку раннього цвітіння і дозрівання стручків на рослинах дослідного варіанту (7-й тиждень вегетації).

Таким чином, до 9-го тижня рослини з опроміненого насіння випереджали у розвитку контрольні, з 10-го по 13-й тижні ці відмінності згладжувалися, а починаючи з 14-го тижня і до кінця вегетації повністю нівелювалися (рис. 4.3 В). Звідси можна зробити висновок, що рослини з

опроміненого насіння швидше розвиваються з початку вегетативної фази до досягнення кульмінації генеративної фази розвитку, коли досягається пік активності апікальної меристеми. Як тільки падає активність меристематичних тканин відмінності згладжуються. Отже хронічне низькодозове рідкоіонізуюче опромінення рослин *A.thaliana* на ранніх стадіях онтогенезу здатне стимулювати активність апікальної меристеми.

Незважаючи на те, що морфометричні показники контрольного та дослідного варіантів у другій половині вегетативного циклу достовірно не відрізнялися, ефект впливу радіації в цей період не зникав повністю. Так, тривалість вегетації від моменту проростання до загибелі неоднакова для рослин з порівнюваних варіантів. Контрольні рослини в середньому вегетували довше. Середня тривалість вегетації рослин контрольного варіанту – 19 тижнів (медіанна 19,5), дослідного – 14,9 тижнів (медіанна 16,0).

Що стосується інтегральних морфометричних показників, то статистично достовірні відмінності спостерігалися тільки між тими опроміненими й неопроміненими рослинами, які завершили вегетативний цикл раніше, ніж інші. Для рослин, що загинули раніше медіанного терміну вегетації, характерна менша маса висушеної надземної частини в дослідному варіанті у порівнянні з контролем (23 мг і 50 мг відповідно, $p < 0,01$). Опромінені рослини також демонстрували нижчий середній приріст маси на добу (0,22 мг проти 0,43 мг в контролі, $p < 0,01$). Ці дані свідчать про пригнічення асиміляційних процесів у рослин з опроміненого насіння поряд з більшою активністю апікальної меристеми (швидший ріст та розвиток, більш ранній початок цвітіння, імовірно, за рахунок інтенсифікації клітинних поділів). Раніше за інші засихали рослини з морфологічними аномаліями.

Скорочення середньої тривалості вегетації рослин з опроміненого насіння разом із зменшенням середньої накопиченої біомаси можна пояснити наступним чином. У контрольній лабораторній популяції є субпопуляція рослин, які швидше ростуть і розвиваються, раніше зацвітають, раніше завершують вегетацію, накопичуючи відносно меншу біомасу (субпопуляція

C1). Є також інша субпопуляція, до якої належать рослини з повільнішими темпами росту та розвитку, з більшою тривалістю вегетації та, відповідно, більшою накопиченою біомасою (субпопуляція C2). Очевидно, у природі такий розподіл забезпечує краще пристосування до кліматичних умов, які змінюються з року в рік, та гарантує виживання популяції. Крім того, в контролі є і феніти, які, зазвичай, є стерильними. Очевидно, що репродуктивна елімінація таких рослин також підвищує пристосованість популяції та, ймовірно, знижує її генетичний тягар. Хронічне низькодозове опромінення може збільшувати чисельність субпопуляції C1. Подібну картину спостерігали А.П.Кравець та Д.О.Соколова у дослідях з пророщуванням опроміненого насіння злакових культур [185]. Також хронічне рідкоіонізуюче опромінення в малих дозах призводить до зростання кількості стерильних фенітів, більша частина яких належать до описаного вище R-фенотипу. Ми вважаємо, що зупинка розвитку таких рослин у вегетативній фазі є проявом фенітозу та пов'язана з DDR-реакцією меристематичних клітин.

4.2. Радіаційно індуковані морфологічні аномалії та морфози

За критерієм врожайності – загальною кількістю стручків, дозрілих за час вегетації, статистично достовірні відмінності між дослідним і контрольним варіантами були відсутні. Але було б неправильно стверджувати, що опромінення насіння в малих дозах зовсім не впливає на репродуктивну сферу. По-перше, як вже вказувалося, рослини в дослідному варіанті зацвітають і починають утворювати стручки раніше, ніж в контролі. По-друге, на деяких з них ми виявили квітки зміненої форми з аномаліями оцвітності (рис. 4.4 А). На рослинах з опроміненого насіння утворювалось до 10% стерильних або частково стерильних стручків (рис. 4.4 Б, В). При цьому в контролі стерильні менше 5% стручків.

Крім досить поширених аномалій стручків у дослідному варіанті зафіксовано 6% рослин із зміненим фенотипом (у контролі близько 2%).

Характерна особливість значної частини фенodeвіантів, отриманих з хронічно опроміненого насіння – порушення росту та формування органів, що відрізняє їх від рослин контрольного варіанту з затримкою розвитку. Основні відмічені нами особливості фенodeвіантів дослідного варіанта наступні (див. рис. 4.5):

1) модифікація ростових параметрів – довжина головного стебла нижче не тільки контрольного показника, але і менше середньої довжини стебла нормальних рослин опроміненого варіанту. У ряді випадків це проявляється як карликовість або ж повна відсутність стебла (рис. 4.5 В, К);

2) листки прикореневої розетки менші за площею, темніші, ніж зазвичай, часто мають фіолетовий або антоціановий відтінок, форма листків також часто змінена – вони вигнуті або скручені, мають гіперторофовані трихоми (рис. 4.5 Б, І, К);

3) аномалії у вигляді гіпо- або навпаки гіперплазії листків прикореневої розетки (рис. 4.5 Б, Г);

4) тимчасова або термінальна зупинка росту і розвитку, т.зв. «growth arrest» (рис. 4.5 Б, К);

5) зняття апікального домінування, активний ріст стебел другого порядку (симподій), причому часто ці стебла помітно тонші, ніж у контролі, особливо ближче до верхівки пагона; утворення нових розеток у міжвузлях (рис. 4.5 Ж, З);

6) головне стебло тонше або навпаки істотно товстіше норми, сильніше вигинається, переломлюється в міжвузлях, утворюючи Г- та сигмоподібні структури (рис. 4.5 Є); у хронічно опромінених проростків викривлюється головний корінець;

7) асиметрія плану будови пагона в цілому і його окремих частин-метамерів, яка зберігається на всіх етапах розвитку (рис. 4.5 А, Д).

Всі виявлені рослини із зміненим фенотипом можна умовно поділити на дві групи: фенodeвінти з комплексом ознак пунктів 1-4 (ознаки 1 і 2 завжди зустрічалися у них разом) і фенodeвіанти з окремими ознаками 1-7. Всі

фенодевіанти першої групи на відміну від рослин другої групи виявилися стерильними за рахунок того, що вони не переходять до цвітіння. Ті рослини, на яких все ж розпускається 1-2 квітки, не утворюють нормальних стручків.

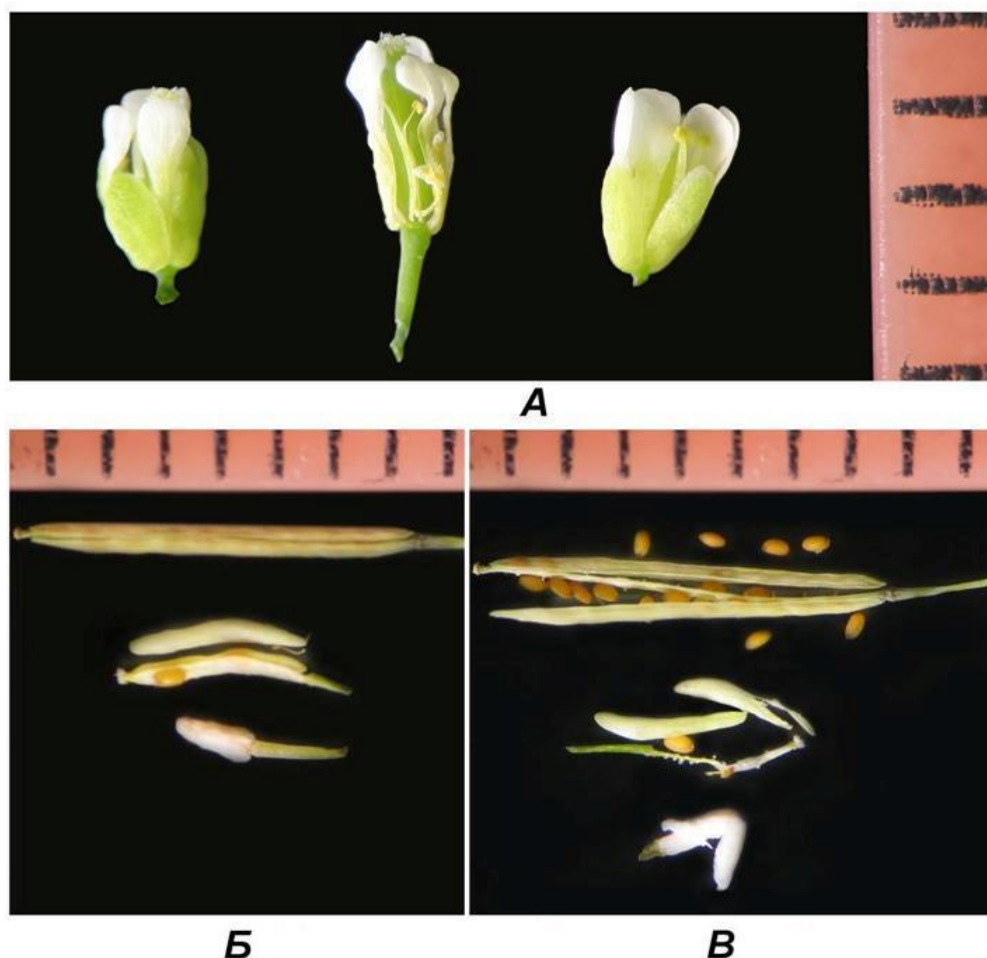


Рис. 4.4. Аномалії генеративних органів *A. thaliana*, які зустрічаються у рослин з опроміненого насіння

А – посередині морфологічно змінена квітка рослини з дослідного варіанту, ліворуч і праворуч – контроль. Аномальна квітка довша, у неї відсутні чашолистки, спотворені пелюстки та окремі пестики; **Б, В** – вгорі нормальний стручок, нижче вкорочені стручки рослин, вирощених з опроміненого насіння, які характеризуються недорозвиненими насіннєвими зачатками, малою кількістю зрілого насіння або його відсутністю (часткова або повна стерильність).

Кожна з ознак 1-7 була в тій чи іншій мірі притаманна і деяким нормальним рослинам дослідного варіанту, які лише незначно відрізнялися від контролю за одним із зазначених параметрів. Таким чином, є підстави говорити про окремий фенотип тільки по відношенню до характерних для опроміненого варіанту фенотипів із вкороченим стеблом і листками прикореневої розетки зміненого кольору, які зупинились на вегетативній стадії онтогенезу. Ми назвали цей фенотип редукованим фенотипом або R-фенотипом (від англ. "reduced").

У дослідях з опроміненням рослин сублетальними дозами рентгенівських променів 3-21 Гр також спостерігали появу описаних вище морфологічних відхилень від норми (переважно у рослин, які на момент опромінення мали менші показники довжини стебла та площі листків прикореневої розетки).

Зрідка R-фенотип зустрічається і у неопроміненних рослин, причому у мутантів *Atmsh2*— частіше, ніж у рослин дикого типу *Atmsh2*+/+. В зв'язку з чим можна зробити висновок, що R-фенотип є наслідком пошкоджень ДНК, які виникають при зберіганні насіння та гірше репаруються у рослин, дефектних за білком MSH2, який бере участь у кількох шляхах репарації ДНК. Рослини, які вирости з насіння з певним критичним рівнем пошкоджень, набувають характерних ознак R-фенотипу внаслідок порушення поділу та диференціації клітин меристем.

У зв'язку з зазначеним є підстави вважати появу рослин з R-фенотипом загальною закономірністю впливу сублетальних доз радіації. На наш погляд R-фенотип є формою репродуктивної загибелі, а репродуктивна загибель — стратегією очищення популяції від нестійких до дії несприятливих факторів організмів, які, до того ж, можуть бути носіями генетичного тягаря. Використані дози опромінення надто малі, щоб індукувати критичні ураження на рівні ДНК чи інших біологічно важливих молекул. Проте певні пошкодження все ж індукуються, про що свідчить підвищення транскрипційної активності маркерних генів *AtRAD51* і *AtRad1* (див. розділ 3.3).



Рис. 4.5. Основні типи морфологічних аномалій, що спостерігаються у рослин *A. thaliana*, опромінених рідкоіонізуючою радіацією у сублетальних дозах

Л – нормальні рослини на 5 тижні вегетації; А, Д – порушення апікального домінування, загального плану будови, форми та розміру листків; А, Б, Д, І, К – антоціанове забарвлення листків прикореневої розетки, яке є ознакою руйнування хлорофілу та накопичення антоціанових пігментів; Б, К – гіперплазія трихом на поверхні розеткових листків; Б, Г – гіперплазія прикореневої розетки; В – R-фенотип; І, К – затримка росту та розвитку стебла, інгібування верхівкової бруньки («growth arrest» на стадії розетки); Є – Г-подібний або сигмоїдний (подвійний) злам стебла на ділянці міжвузля; Ж, З – поява додаткових листових розеток у міжвузлях стебла.

Отже, елімінація особин, в клітинах яких залишились нерепаровані пошкодження ДНК, може бути пов'язана з DDR-відповіддю у меристематичних тканинах, внаслідок чого відбувалась зупинка індивідуального розвитку у онтогенетичних чекпойнтах, тобто на критичних стадіях онтогенезу, таких як проростання насіння, формування первинної розетки, активація верхівкової бруньки стебла, перехід від вегетативної до генеративної фази розвитку (утворення бутонів та квіток), дозрівання стручків та насіння. Така елімінація може розглядатись як приклад фенптозу – програмованої загибелі цілого організму (Скулачѳв, 1999), в даному випадку репродуктивної.

Узагальнення даних по основним типам радіаційно індукованих морфологічних аномалій різушки Таля дозволяє припустити, що їх формування пов'язане з пострадіаційним пригніченням апікальної меристеми верхівкової бруньки рослин з високою індивідуальною радіочутливістю та супроводжується стимуляцією меристем бічних і сплячих бруньок, як і інтеркалярних меристем міжвузлів стебла і розеткових листків. Також вирогідним видається зміна патернів експресії генів, які регулюють розвиток і органогенез. Загалом при сублетальних дозах опромінення великий вплив на радіобіологічний ефект мають відмінності у індивідуальній радіочутливості. Мабуть, це і є основною причиною появи радіоморфозів, що виникають після дії стимулюючих доз опромінення: меристеми більш радіочутливих рослин пригнічуються дозами, які на основну масу інших рослин мають стимулюючу дію. Це пояснює зафіксований нами факт появи морфометричних аномалій у опромінених на 35-ту добу вегетації рослин, які на момент опромінення відстають за темпами росту та розвитку від інших рослин дослідного варіанту. Проте при малих дозах опромінення від декількох до десятків сГр, що не призводять до серйозних пошкоджень меристем арабідопсиса, основним фактором розвитку R-фенотипу має бути якийсь ендогенний механізм, який діє за принципом посилювача. Вище ми вже висловили припущення, що таким механізмом може бути програмована репродуктивна загибель (фенптоз) як

прояв DDR-відповіді на організаційному рівні. В наступному розділі буде розглянуто питання потенційної ролі в цьому індукції генів *AtRAD51* та *AtRad1*, яка підтримується тривалий час після припинення опромінення рослин *Arabidopsis thaliana*.

4.3. Особливості радіобіологічних реакцій мутанта *Atmsh2* SALK_002708 в інтервалі малих доз хронічного рідкоіонізуючого опромінення

В зв'язку з тим, що встановлена роль іонізуючої радіації у підвищенні нестабільності мікросателітної ДНК клітин дріжджів і ссавців [127], вивчали вплив опромінення на проростки та вегетуючі рослини мутанта різущки Таля *Atmsh2* SALK_002708, нокаутного за геном *msh2*, який кодує білок, що поряд з іншими функціями приймає участь у підтриманні стабільності мікросателітів. Виявилося, що на відміну від стимулюючої дії хронічної рідкоіонізуючої радіації у дозі 20 сГр на розвиток рослин дикого типу до 35-го дня вегетації, мутантні рослини такої стимуляції не зазнавали (рис 4.6). Однак наприкінці вегетації як рослини дикого типу, так і мутанти, що були хронічно опромінені протягом перших 35 діб розвитку, накопичували в середньому більшу біомасу, ніж неопромінені рослини. При цьому як опромінені, так і не опромінені мутанти *Atmsh2*^{-/-} мали меншу повітряно-суху масу надземної частини, ніж рослини дикого типу (рис. 4.7). Таким чином, білок MSH2 з одного боку є необхідним для нормального розвитку рослин в умовах відсутності дії генотоксичних факторів, таких як хронічна іонізуюча радіація з низькою ЛПЕ, з іншого – реакція прискорення темпів розвитку під дією стимулюючих доз опромінення не спостерігається (можливо, згладжується за рахунок пригнічення поділів клітин), якщо у клітинах рослин відсутній фермент MSH2.

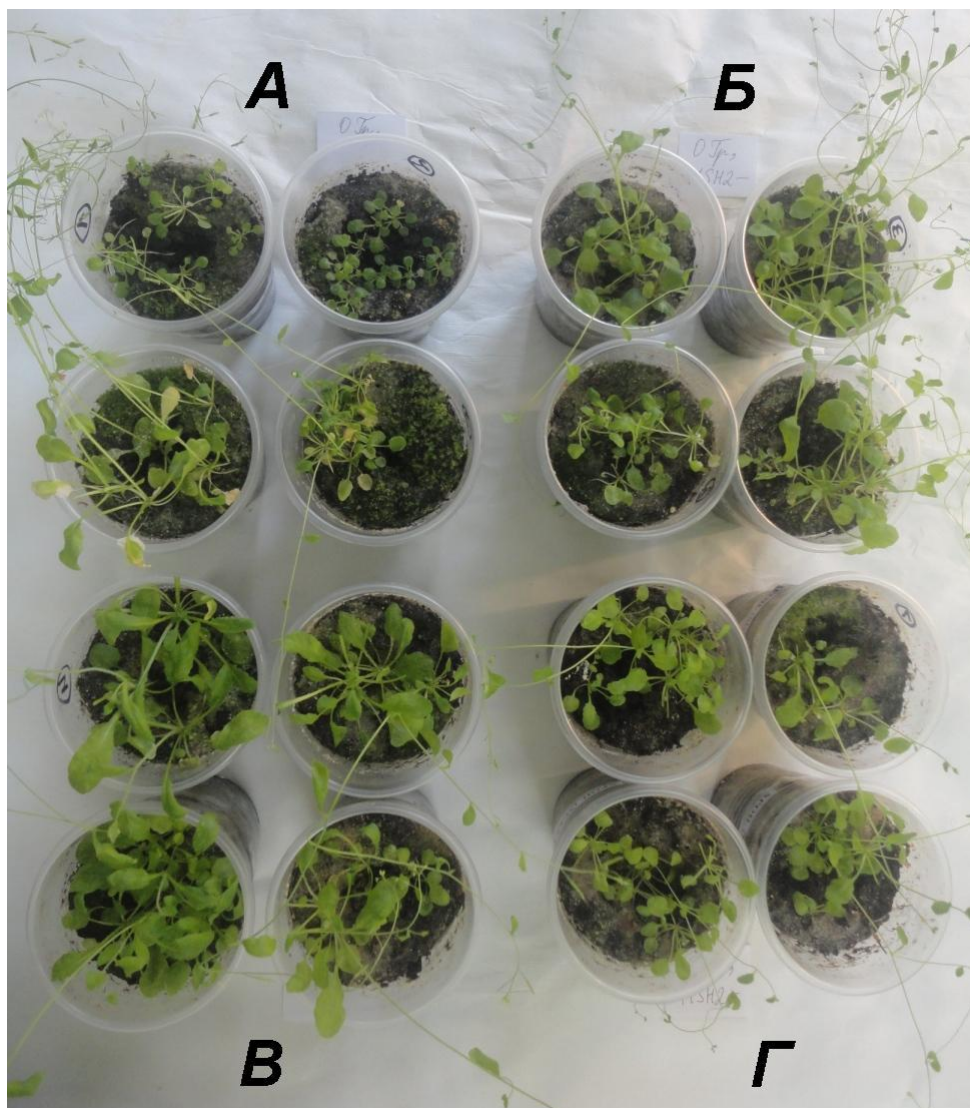


Рис. 4.6. Хронічно опромінені рослини, 35 доба вегетації. Накопичена доза 20 сГр

А – найбільш відмінні за рівнем розвитку рослини неопроміненого контролю, *wt Arabidopsis thaliana*; **Б** – найбільш відмінні за рівнем розвитку рослини неопроміненого мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708*, нокаутного за геном *Atmsh2*; **В** – найбільш відмінні за рівнем розвитку хронічно опромінювані рослини *wt Arabidopsis thaliana*; **Г** – найбільш відмінні за рівнем розвитку рослини хронічно опромінюваного мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708*, нокаутного за геном *Atmsh2*.

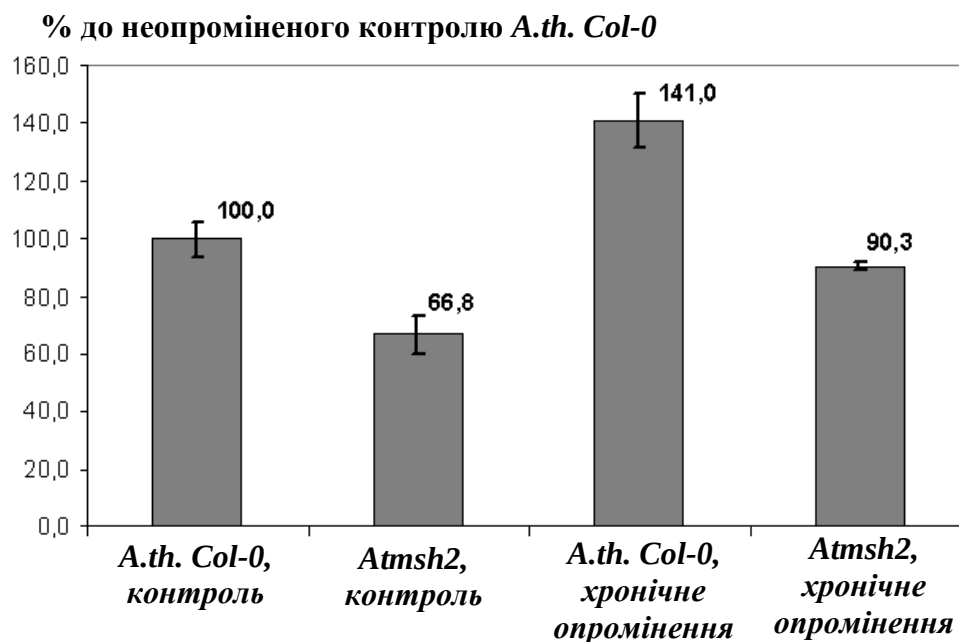


Рис. 4.7. Середня маса повітряно-сухої надземної частини рослин наприкінці вегетації. Загальна доза хронічного опромінення 20 сГр

Оскільки в листках опромінених рослин відмічали індукцію гена *AtRAD51* та підвищення активності гена *AtRad1*, можлива також участь відповідних білків у радіобіологічних ефектах опромінення. Це ще раз підтверджує значення так званих caretaker genes, що відповідають за підтримку структурної цілісності та стабільності геному, для реалізації функцій рослинних меристем у нормальних умовах і при дії генотоксичних факторів середовища.

4.4. Модифікація морфометричних кореляцій під дією малих доз опромінення

Крім аномалій генеративних органів у рослин з хронічно опроміненого насіння спостерігалось також порушення корелятивних зв'язків морфометричних характеристик. Ряд дослідників відзначають, що розпад або модифікація системи корелятивних відношень між морфологічними змінними є примітною особливістю хронічної дії радіації в малих дозах на рослини

[184;199] – як в умовах лабораторного експерименту, так і у складі фітоценозів на радіоактивно забруднених територіях.

Міжваріантні відмінності коефіцієнтів кореляції морфометричних змінних (табл. 4.1) свідчать на користь того, що порушення морфологічних корелятивних відношень в онтогенезі рослин з опроміненого насіння можна пояснити швидким ростом стебла без накопичення біомаси, тобто підвищеною активністю верхівкової бруньки. Це підтверджується більш високим середнім приростом стебла рослин дослідного варіанту до початку цвітіння.

Таблиця 4.1

Коефіцієнти рангової кореляції Спірмена між морфометричними параметрами *A. thaliana* з опроміненого та неопроміненого насіння

Пари морфометричних параметрів	Контроль	Рослини з опроміненого насіння	Статистична достовірність відмінностей між варіантами дослідів
Довжина стебла – Маса повітряно-сухої надземної частини пагона	0,76***	0,25	$p < 0,01$
Довжина стебла – Тривалість вегетативної фази розвитку	0,06	-0,56**	$p < 0,001$
Довжина стебла – Середньодобовий приріст маси сухої речовини	0,65**	-0,73***	$p < 0,001$
Довжина стебла – Середня кількість стручків, які дозріли на одній рослині	0,78***	0,67**	–
Маса повітряно-сухої надземної частини пагона – Середня кількість стручків, які дозріли на одній рослині	0,83***	0,78***	–

Примітка. Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена був використаний як непараметрична оцінка тісноти зв'язку, найбільш придатна для невеликих вибірок даних, розподіл яких відрізняється від Гаусівського.

Зірочками позначена статистична достовірність відмінностей наведених коефіцієнтів кореляції від 0: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Водночас відсутність достовірних відмінностей за кореляціями показників росту і врожайності, а також накопичення біомаси та врожайності,

поряд з приблизно рівною кількістю стручків, зібраних з рослин дослідного та контрольного варіантів, свідчить про те, що флоральна меристема *A. thaliana* в цілому досить стійка до впливу малих доз хронічного випромінювання з низькою ЛПЕ, хоча на опромінених рослинах іноді і зустрічаються аномальні квітки. Генеративна меристема більш чутлива, про що свідчить більший відсоток частково або повністю стерильних стручків у дослідному варіанті.

Гіперстимуляція меристем окремих органів або порушення зв'язків меристем різних частин рослини може призводити до гіперплазії або до порушення морфологічних кореляцій, всього плану будови і розвитку рослинного організму. Якщо ж відбувається радіаційно індуковане переривання клітинних потоків у меристемах підчас морфогенезу рослин, описане Д.М.Гродзинським та співробітниками, то формуються радіо морфози [174]. В наших дослідках ми спостерігали обидва типи фенодевіацій (рис. 4.5).

4.5. Висновки до розділу 4

Проведені експерименти показали значущий вплив малих доз хронічного γ/β - опромінення насіння і проростків *A.thaliana* на ріст та розвиток рослин. Серед основних виявлених ефектів можна назвати

у опромінених проростків:

1. збільшення енергії проростання, викривлення головного корінця опромінених проростків;
2. більш раннє формування первинної розетки в порівнянні з неопроміненим контролем;
3. збільшення повітряно-сухої маси надземної частини пагону;

у рослин, вирощених з опроміненого насіння:

1. прискорений ріст стебла у вегетативній фазі, менша тривалість цієї фази порівняно з аналогічним періодом онтогенезу контрольних рослин;
2. скорочення термінів початку цвітіння на 1-2 тижні;
3. скорочення тривалості вегетації на 2-3 тижні;

4. зменшення маси повітряно-сухої надземної частини пагону;
5. появу рослин з морфологічними аномаліями та збільшення частки стерильних рослин з редукованим фенотипом (R-фенотипом).

Слід підкреслити, що стимулюючий ефект опромінення насіння реалізується не відразу, як при хронічному опроміненні проростків, а на етапі ініціації верхівкового росту пагона і до настання генеративної фази. Висока варіація вегетативних та генеративних морфометричних показників, підвищення частоти морфометричних аномалій у дослідному варіанті свідчать про високу індивідуальну мінливість рослин за стійкістю до низькодозового хронічного опромінення.

Спільним для всіх спостережуваних ефектів є прискорення розвитку опромінених рослин.

Для опромінених хронічною низькодозовою радіацією біологічних об'єктів характерна амбівалентність радіобіологічних реакцій: з одного боку вони носять тимчасовий, транзйєнтний характер, а з іншого є транзитивними, переносяться з однієї фази розвитку в іншу.

На наш погляд, отримані дані можна пояснити радіаційною стимуляцією апікальних меристем у період вегетативного росту поряд з їх пригніченням після проходження піку генеративної фази. Результати дослідів свідчать про високу чутливість ембріональних ініціалів, апікальної меристеми осьових органів та генеративної меристеми до хронічного рідкоіонізуючого опромінення.

РОЗДІЛ 5

ЗВ'ЯЗОК МОРФОМЕТРИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ОПРОМІНЕНИХ РОСЛИН АРАБІДОПСИСУ З РАННІМИ РАДІАЦІЙНО ІНДУКОВАНИМИ ЗМІНАМИ ТРАНСКРИПЦІЇ ГЕНІВ РЕПАРАЦІЇ ДНК *ATKU70*, *ATRAD51*, *ATRAD1*

5.1. Залежність морфометричних параметрів рослин арабідопсису від дози опромінення в інтервалі 3 – 21 Гр

Опромінення рослин *A. thaliana* рентгенівськими променями у діапазоні сублетальних доз виявилося досить ефективним з точки зору впливу на морфометричні параметри та фенотип. Побудовані дозові залежності демонструють нелінійний характер взаємозв'язку дози та фенотипового ефекту (рис. 5.1, рис. 5.2). Оскільки криві «доза-ефект» мають переважно хвилеподібний характер, більш виразно викликані опроміненням зміни можна простежити після усереднення морфометричних характеристик за дозовими інтервалами, які відповідають характерним змінам транскрипційної активності ключових генів підтримки стабільності геному *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* (таблиця 5.1). Ці інтервали були визначені у підрозділі 3.2.

Як і випадку малих доз хронічного іонізуючого опромінення низької потужності після дії доз з інтервалу 3-21 Гр у кілька разів зростала частка рослин з морфологічними аномаліями та порушеннями морфогенезу, основну частину яких становили рослини з R-фенотипом (фотографії найбільш типових фенодевіацій наведені у підрозділі 4.2 разом з описом характерних рис R-фенотипу). Одноразове опромінення загалом призводило до формування більшої кількості (частки) фенодевіантних рослин у порівнянні з повторюваним.

Поряд з підвищенням частки фенодевіантів іонізуюче опромінення рослин стимулювало швидший ріст головного стебла у довжину (більшою мірою при одноразовому опроміненні, ніж при повторюваному).

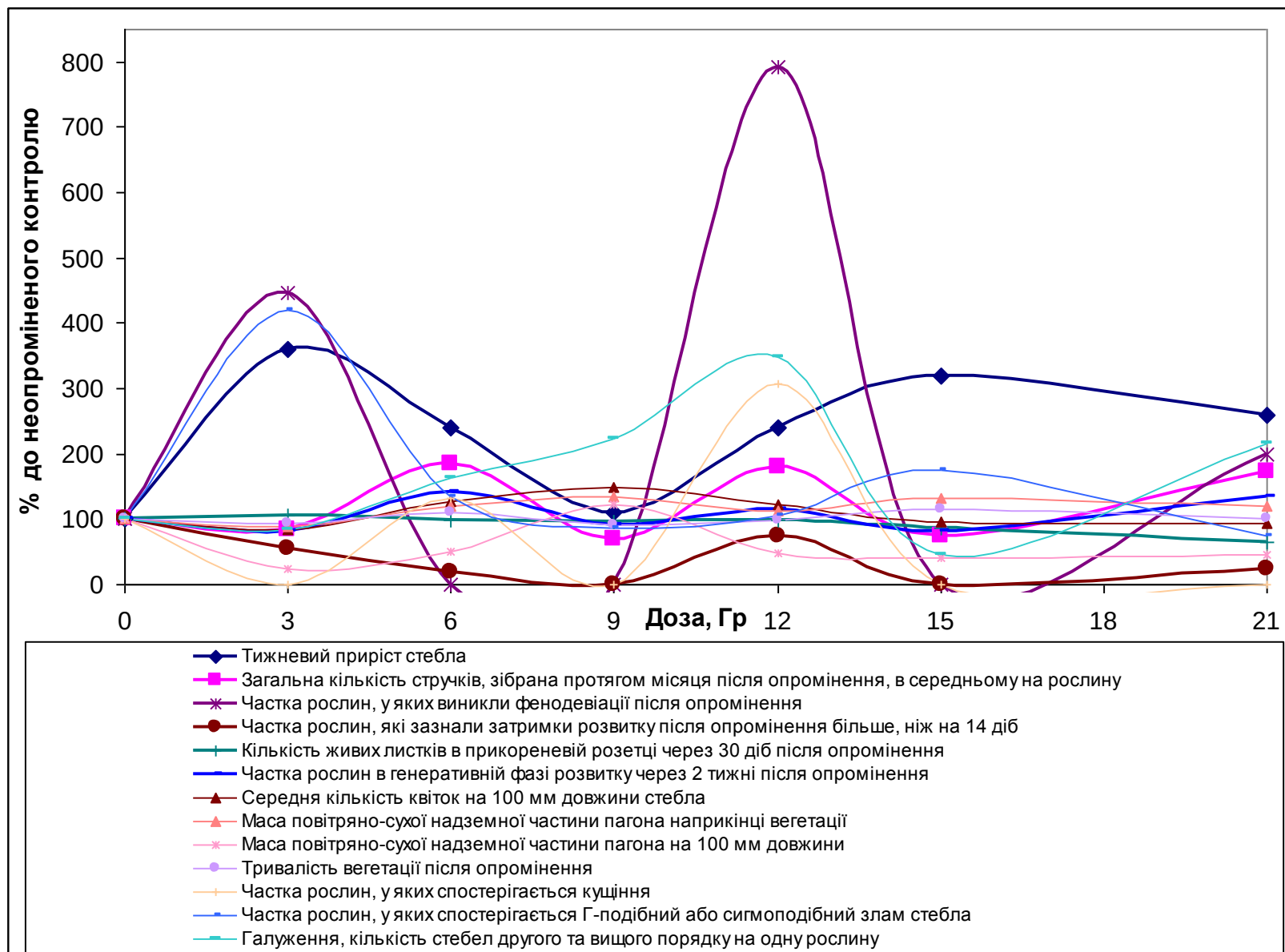


Рис. 5.1. Залежності морфометричних ознак опромінених рослин від дози одноразового опромінення

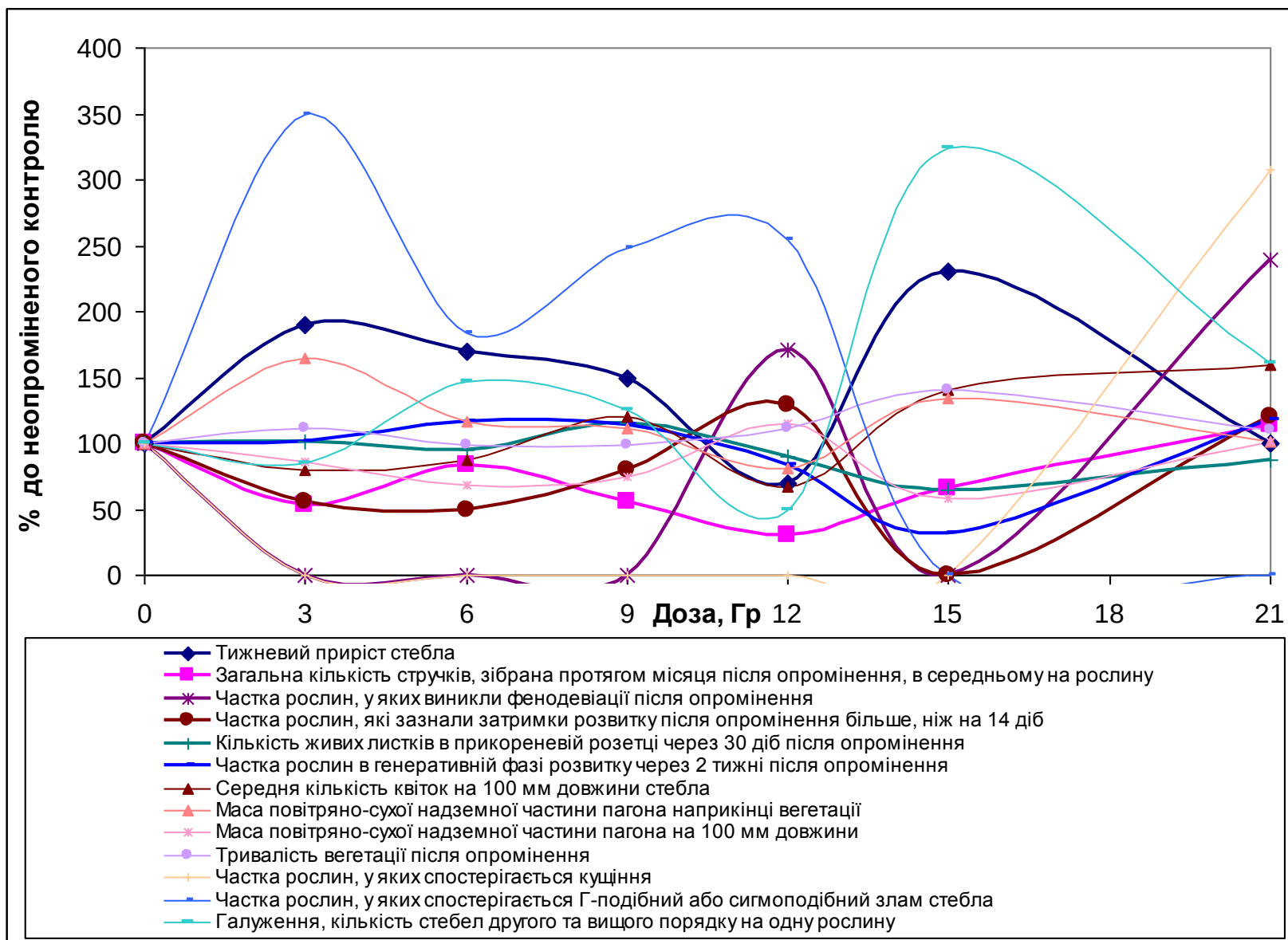


Рис. 5.2. Залежності морфометричних ознак опромінених рослин від дози повторюваного опромінення

Таблиця 5.1

Морфометричні параметри опромінених рослин *A.thaliana* в залежності від інтервалу доз опромінення (середні значення), % до контролю

ОДНОРАЗОВЕ ОПРОМІНЕННЯ														
Дозовий інтервал	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0 Гр	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3-9 Гр	236,7	113,0	148,7	25,0	99,3	104,3	120,0	66,3	114,7	65,5	99,0	43,9	213,6	157,2
12-15 Гр	280,0	128,0	396,5	37,5	92,5	98,5	110,0	165,5	122,2	44,1	106,9	153,5	140,0	196,9
21 Гр	260,0	172,0	200,0	25,0	65,0	134,0	93,0	66,7	119,0	45,8	101,0	0,0	75,0	217,0
ПОВТОРЮВАНЕ ОПРОМІНЕННЯ														
Дозовий інтервал	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0 Гр	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3-9 Гр	170,0	64,3	0,0	62,0	103,7	110,3	95,7	46,8	131,0	76,6	103,1	0,0	260,6	118,8
12-15 Гр	150,0	48,0	85,5	64,5	77,0	58,0	103,5	28,6	107,3	86,7	125,8	0,0	127,5	186,7
21 Гр	100,0	114,0	239,0	120,0	87,0	118,0	160,0	79,8	101,1	101,1	109,8	307,0	0,0	160,7
ПОВТОРЮВАНЕ/ОДНОРАЗОВЕ ОПРОМІНЕННЯ														
Дозовий інтервал	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0 Гр	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
3-9 Гр	71,8	56,9	0,0	248,0	104,4	105,8	79,7	70,7	114,2	116,9	104,1	0,0	122,0	75,5
12-15 Гр	53,6	37,5	21,6	172,0	83,2	58,9	94,1	17,3	87,8	196,7	117,7	0,0	91,1	94,8
21 Гр	38,5	66,3	119,5	480,0	133,8	88,1	172,0	119,6	84,9	220,8	108,7		0,0	74,1
1	Тижневий приріст стебла													
2	Загальна кількість стручків, зібрана протягом місяця після опромінення, в середньому на рослину													
3	Частка рослин, у яких виникли фенодевіації після опромінення													
4	Частка рослин, які зазнали затримки розвитку після опромінення більше, ніж на 14 діб													
5	Кількість живих листків в прикореневій розетці через 30 діб після опромінення													
6	Частка рослин в генеративній фазі розвитку через 2 тижні після опромінення													
7	Середня кількість квіток на 100 мм довжини стебла													
8	Стерильність рослин													
9	Маса повітряно-сухої надземної частини пагона наприкінці вегетації													
10	Маса повітряно-сухої надземної частини пагона на 100 мм довжини													
11	Тривалість вегетації після опромінення													
12	Частка рослин, у яких спостерігається куціння													
13	Частка рослин, у яких спостерігається Г-подібний або сигмоподібний злам стебла													
14	Галуження, кількість стебел другого та вищого порядку на одну рослину													

Примітка. Зеленим кольором виділені значення, більші за контрольні, червоним – менші за контрольні.

Разом з підвищеною швидкістю приросту спостерігалось галуження пагону, утворення та ріст бокових гілок (симподій) внаслідок активації бічних бруньок.

Радіація також сприяла зменшенню частки рослин, які зазнали затримки розвитку при переході від вегетативної до генеративної фази онтогенезу (таблиця 5.1). Даний ефект був сильніше виражений при одноразовому опроміненні. Зокрема при опроміненні дозою 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр частка рослин, що зазнали затримки розвитку, навпаки зростала відносно контролю. Певна частина рослин контрольної групи затримувалась на пізній вегетативній стадії подібно до того, як затримується проростання деяких насінин. Таку затримку проростання пов'язують з репарацією пошкоджень ДНК, які накопичуються у меристемах зародку підчас зберігання насіння [153]. Аналогічно затримку розвитку у критичний період онтогенезу – переходу рослин до цвітіння – можна пояснити накопиченням генетичних пошкоджень у генеративних меристемах, а відсутність такої затримки – активацією опроміненням індукцйбельної репарації ДНК, що дозволяє ці пошкодження швидко елімінувати. При опроміненні рослин зазначеною вище дозою 7 Гр + 7 Гр + 7 Гр активація індукцйбельної репарації не відбувається (рис. 3.1 Б, рис. 3.4, розділ 3), що і зумовлює 20%-е зростання частки рослин, які затримались у розвитку. Характерно, що в цьому варіанті досліду зафіксовано зростання частки рослин з морфологічними аномаліями у 2,4 рази в порівнянні з неопроміненим контролем, а рослин, у яких спостерігалось кушіння, – у 3,1 рази.

Одноразове опромінення у застосованих сублетальних дозах також призводило до збільшення врожайності. В той же час при фракціонованому опроміненні у сумарній дозі від 3 Гр до 15 Гр врожайність арабідопсису помітно знижувалась. При цьому рентгенівське опромінення в цілому сприяло зниженню частки стерильних рослин.

Накопичена суха біомаса пагону після опромінення збільшувалась, а у перерахунку на одиницю довжини стебла зменшувалась (через прискорений ріст стебла у довжину). Оскільки більшу частину біомаси рослин різущки Таля

складають листки прикореневої розетки, це означає, що приріст стебла відбувався значно швидше, ніж накопичення сухої речовини у листках. Отже, гостре опромінення у сублетальних дозах, як одноразове, так і повторюване, насамперед, стимулює поділ клітин верхівкової меристеми стебла і меншою мірою впливає на асиміляційні процеси у листках, інтенсивність яких після дії радіації може знижуватись.

Суттєве зростання кількості рослин, для яких характерне куціння, спостерігалось при дозі 12 Гр одноразового опромінення та при сумарній дозі 21 Гр повторюваного опромінення. У інтервалі доз 3-15 Гр одноразового та фракціонованого опромінення зростала частка рослин, стебло яких має Г-подібний злам у міжвузлі або сигмоподібний вигин. Дана фенотипічна ознака, ймовірно, відображає ураження інтеркалярної меристеми міжвузля. Цікаво, що при опроміненні у дозі 21 Гр при обох режимах опромінення цей показник був нижчим, ніж у неопроміненому варіанті. При даній дозі спостерігався також прискорений перехід рослин до цвітіння та збільшення кількості квіток і стручків на рослинах. Отже, найбільш чутливі меристеми *A. thaliana* набували певної стійкості до опромінення, разом із індукцією фракціонованим опроміненням процесів регенерації, про що свідчить зростання більше, ніж у 3 рази частоти куціння головного стебла. Повторюване опромінення рослин сумарною дозою 21 Гр призводило до зростання у 2,4 рази частки рослин з морфологічними аномаліями та морфозами, а також до утворення нових квіток та листків замість втрачених в результаті дії радіації. Доза у 21 Гр, незалежно від режиму опромінення, викликала загибель частини листків прикореневої розетки протягом 30 діб після опромінення.

Загалом, на підставі отриманих результатів можна стверджувати, що одноразове опромінення рослин арабідопсису рентгенівською радіацією в дозах 3-15 Гр на стадії переходу до цвітіння індукує пошкодження геному клітин (1-14 ДР ДНК на 2С-геном та 2-28 ДР ДНК на 4С-геном згідно з розрахунками, наведеними у таблиці 4.2), в тому числі і потенційно летальні дволанцюгові розриви, які, однак, є некритичними для життєздатності рослин через

активність механізмів відновлення ДНК на клітинному рівні та репопуляцію меристем. Ці пошкодження стимулюють більш швидкий і масований поділ клітин меристематичних тканин. Через це прискорюється ріст та розвиток рослин. Проте, оскільки стимуляція поділів у меристемах відбувається нерівномірно та стохастично, більш радіостійкі клітини діляться швидше, а інші, радіочутливі, зупиняють або уповільнюють поділ, порушується злагодженість та координація клітинних потоків, що призводить у деяких рослин до порушення реалізації клітинної інформації та морфологічних аномалій. Генетичні пошкодження, незначні для основної маси рослин, виявляються значущими для більш індивідуально радіо чутливих організмів, що має наслідком реакцію зупинки поділів у меристемах, арешт клітинного циклу меристематичних клітин і формування R-фенотипу. Таким чином, можна висловити припущення, що стимулюючий вплив сублетальних доз рідкоіонізуючої радіації на рослини зумовлений активацією пошкодженнями ДНК індуцибельних систем репарації, функціонування яких призводить до гіпервідновлення, адже ці системи знижують фоновий рівень порушень структурної цілісності геному та завдяки цьому сприяють більш швидкому поділу меристематичних клітин (затримки клітин у G1 та G2 фазах, подовження S-фази та мітотична загибель викликані неефективною репарацією ДНК). Однак описаний механізм стимуляції не спрацьовує в клітинах рослин, які мають знижену здатність до репарації ДР ДНК. У клітинах цих рослин відбувається деградація ДНК у сайтах дволанцюгових розривів, підвищується кількість олДНК та, відповідно, активується ATR-сигнальний каскад, підвищується активність гена *AtRad1*, ініціюється арешт клітинного циклу меристематичних клітин. Внаслідок сукупності цих процесів спостерігається формування відхилень габітусу рослин від норми, радіоморфози, R-фенотип, які, як буде показано нижче, корелюють з підвищеною транскрипційною активністю гена *AtRad1*.

Повторюване (фракціоноване) опромінення у дозах 3-15 Гр з часовим інтервалом у 24 години, що є достатнім, щоб відбувся один клітинний поділ,

має значно менший стимулюючий потенціал у порівнянні з одноразовим. Це проявляється також у явних ознаках пошкодження генеративної меристеми (зменшення кількості квіток та стручків, більш пізні у порівнянні з контролем терміни переходу до цвітіння – див. табл. 5.1), яка у період переходу до цвітіння є більш радіочутливою, ніж апікальна. Це підвищення чутливості відбувається, можливо, через складні процеси диференціації та нездатність до відновлення шляхом репопуляції. Відмінність у впливі на рослини одноразового та повторюваного опромінення на наш погляд полягає, по-перше, у тому, що у випадку повторюваного опромінення збільшується кількість радіочутливих клітин внаслідок стимуляції поділів першою та другою фракцією опромінення, по-друге, в тому, що дії радіації при фракціонуванні на три фракції зазнають три покоління активно проліферуючих меристематичних клітин.

Після одноразового опромінення фенотипічні ефекти обумовлені гіпервідновленням завдяки активації поділів у меристемах. При повторюваному опроміненні вражаються насамперед ті клітини, які починають ділитися під дією першої та наступних доз опромінення. Як наслідок, відновлення виявляється менш ефективним, ніж при одноразовому опроміненні. У генеративних меристемах, у яких неможлива репопуляція, при фракціонованому опроміненні у дозах 3-15 Гр відновлення не відбувається, що зумовлює зниження врожайності.

Натомість, при більшій дозі повторюваного опромінення 21 Гр були зафіксовані показники цвітіння та кушіння вищі за контрольні. Разом з тим, зростала і частка рослин, що зазнали тривалої затримки розвитку (табл. 5.1). Спостереження показали, що при даній дозі на опромінених рослинах відбувалося утворення нових квіткових бруньок після того, як контрольні рослини вже припинили цвітіння. Крім того було зафіксовано утворення нових розеткових листків у тих опромінених рослин, частина листків яких засохла. Отже, при дозі фракціонованого опромінення 21 Гр мала місце регенерація органів рослин – як асиміляційних, так і генеративних замість втрачених після

дії опромінення. Імовірно, більш високі дози, які виявились інгібуючими, пригнічували відновлення нормального функціонування рослинного організму шляхом регенерації органів. Також ми пов'язуємо з регенерацією активацію бічних стеблових бруньок, яке призводить до утворення бічних гілок (галуження) та квітконосів із суцвіттями.

В цілому ефект сублетальних доз опромінення рослин виявляє залежність від дози – при збільшенні дози знижується стимуляція та зростає пригнічення меристем, і режиму опромінення – повторюване опромінення меншою мірою стимулює та більшою мірою пригнічує активність меристем.

Все, що стосується повторюваного опромінення, справедливе і у відношенні хронічного опромінення. Ми вважаємо цю закономірність пов'язаною із збільшенням частки клітин меристем з пошкодженнями геному та середнього рівня пошкоджень на одну клітину разом зі збільшенням дози та при її фракціонуванні. Причому при відновленні на рівні тканин та органів відповідно до рівня пошкоджень ДНК і частки пошкоджених клітин домінують або процеси репопуляції без репродуктивної загибелі клітин, або репопуляції з репродуктивною загибеллю клітин, або, в разі неефективності перших двох – елімінації органів з пошкодженими меристемами та їх наступної регенерації із неактивних бруньок. У тому випадку, коли у індивідуально радіочутливих рослин або у більшості рослин при інгібуючих/летальних дозах радіації пригнічена регенерація, здійснюється елімінація цілих організмів шляхом репродуктивної загибелі (феноптозу). Всі ці процеси пов'язані з активацією систем репарації ДНК меристематичних клітин, оскільки нормальний поділ клітин, які містять пошкодження ДНК (а при дозах опромінення 3-21 Гр переважна більшість клітин арабідопсису повинні містити хоча б одне потенційно летальне пошкодження – див. табл. 4.2), вимагає індукції DDR-відповіді. Відповідно, ефективність репарації, яка залежить від активації ключових репараційних генів, має позначатись на ході пострадіаційного відновлення рослин.

Значною мірою характер спостережуваних на фенотипному рівні радіобіологічних ефектів був зумовлений різною радіочутливістю меристем: апікальної (ріст, галуження, накопичення біомаси), генеративної (цвітіння та врожайність), інтеркалярної, локалізованої у міжвузлях (Г-подібний злам або сигмоподібний вигин стебла у ділянці міжвузля), латеральної меристеми судинних пучків листкової пластинки (загибель розеткових листків після опромінення). Згідно з правилом Бергоньє-Тібондо найбільшою радіочутливістю, про яку можна судити за зміною відповідних показників при відносно менших дозах радіації, характеризуються недиференційована первинна (залишкова) інтеркалярна меристема міжвузлів квітконосів та високоактивна у період переходу до цвітіння генеративна меристема. Відносно нижча радіочутливість властива апікальній меристемі верхівкової бруньки стебла, більш диференційованій та менш активній. Найбільш радіостійкою на стадії переходу до фази генеративного розвитку є латеральна меристема судинних пучків листків, від стану якої залежить довгострокове збереження життєздатності листка. Саме відносною радіостійкістю цієї меристеми зумовлене суттєве зниження кількості розеткових листків тільки при одноразовому опроміненні у дозі 21 Гр. Радіаційне ураження судинних меристем напряду не призводить до загибелі листка, проте через тривалий час після опромінення може індукувати відмирання листків через руйнування судинно-волокнистих пучків та супутні метаболічні зміни у клітинах і тканинах. Результати дослідження цих процесів відображені у наступному підрозділі.

5.2. Біохімічні зміни у листках рослин, одноразово опромінених дозою 21 Гр рентгенівських променів

Вивчення середньострокових ефектів впливу радіації на рослини передбачає комплексний аналіз якісних та кількісних структурно-метаболічних змін, що виникають через тривалий проміжок часу після опромінення. Іонізуючу

радіацію можна розглядати як тестовий чинник, який можна використовувати для моделювання стресового впливу на рослину через подібність біохімічних наслідків рідко іонізуючого випромінювання та дії стресових умов середовища. Механізм індукції ефектів такого роду може бути пов'язаний з порушенням біохімічного гомеостазу низки структур клітин листка – мембран, білкових комплексів, клітинної стінки та нуклеїнових кислот. Це проявляється, зокрема, у зменшенні вмісту хлорофілів в тканинах листків, зниженні ефективності фотосинтезу, у частковому відмиранні асимілюючих органів рослини через деякий час після опромінення.

У попередніх експериментах відмічали зменшення кількості живих листків у прикореневій розетці опромінених в дозі 21 Гр рослин арабідопсису у 1,5 рази в порівнянні з неопроміненим контролем через 30 діб після опромінення. Доза 21 Гр належить до інтервалу доз, з яких починається інгібуючий вплив радіації на рослини *Arabidopsis thaliana*, що знаходяться наприкінці вегетативної фази розвитку. Тому дану дозу було використано в якості стрес-фактора, після дії якого можна зафіксувати біохімічні зміни, що при більших дозах проявляється в пригніченні життєвих процесів та зниженні життєздатності всієї рослини.

З метою аналізу змін біохімічного складу листків використали метод інфрачервоної спектроскопії Фур'є (FTIR). Перевагами даного методу є швидкість, простота, надійність і відтворюваність результатів, можливість одночасного вимірювання вмісту найбільш життєво важливих біохімічних компонентів клітин без порушення цілісності об'єкту, тобто із збереженням властивого живій системі зв'язку між просторовими компартментами та макромолекулами біологічно важливих сполук.

На основі співставлення спектрограм з результатами, отриманими іншими дослідниками, було виявлено та ідентифіковано 12 стійких піків (табл. 5.2), характерних для ІЧ-спектру поглинання листків *Arabidopsis thaliana* в області 400-4000 cm^{-1} .

Вимірювання площі ідентифікованих піків свідчить про значущі відмінності в концентрації основних сполук непігментної природи, що входять до складу

тканин (табл. 5.3). Так, листки опромінених рослин містять більше структурних і запасуючих речовин – геміцелюлози, целюлози і крохмалю. В той же час, вміст полісахаридів, хімічно не споріднених з целюлозою, лігніну, пектину та його похідних, тобто структурних макромолекул, характерних для живих клітин, здатних до розтягнення [145], в листках опромінених рослин зменшується.

Таблиця 5.2

Ідентифіковані піки ІЧ-спектру поглинання листків *Arabidopsis thaliana*

Пік спектру поглинання (вимірювання), см-1	Хімічна група або зв'язок, тип коливань	Пік спектру поглинання (літературні дані), см-1	Сполуки, характерні для тканин ліофілізованих листків	Клас хімічних сполук
872	глікозидний зв'язок, С-О	875	геміцелюлоза	полісахариди
1023	С-О-С, асиметричні коливання	1023	крахмаль	Полісахариди
1106	-CH, -C-C, -C-O-C	1106	целюлоза	полісахариди
1150	глікозидний зв'язок, С-О	1148	пектин	полісахариди
1244	фосфатний зв'язок, PO ₂ -, асиметричні коливання	1244	ДНК, РНК	нуклеїнові кислоти
1418	дисоційована карбоксильна група (COO-)	1419	Пектин	полісахариди
1472	С-Н, площинна деформація	1465-1595	лігнін	фенілпропаноїдний полімер, поліфеноли
1628	карбонільна група, пептидний зв'язок (C-N)	1627-1628	протеїн, амід I, бета-структурні домени	білки
1651	карбонільна група, пептидний зв'язок (C-N)	1652-1658	протеїн, амід I, альфа-спіральні домени	білки
1740	карбонільна група (C=O)	1740	тригліцериди та жирні кислоти	ліпіди
2849	метиленова група, симетричні коливання С-Н зв'язку	2850	аліфатичні складні ефіри жирних кислот	ліпіди кутикули (кутин)
2916	метиленова група, асиметричні коливання С-Н зв'язку	2916-2919	аліфатичні складні ефіри жирних кислот	ліпіди кутикули (кутин)

Також спостерігалися зміни кольору і форми листків (темно-зелене або антоціанове забарвлення, неправильна форма, скрученість листкової пластинки, порушення жилкування). Поряд із суттєвим зниженням вмісту білків та нуклеїнових кислот це вказує на відмирання або зменшення здатності меристематичних клітин до поділу, можливо, внаслідок програмованої клітинної загибелі.

У тканинах опромінених рослин майже в 2 рази знижувався вміст ліпідів, що узгоджується з існуючими даними щодо впливу іонізуючого випромінювання на даний клас сполук. Відмінності між варіантами за відношенням «нуклеїнові кислоти/білки» також були статистично недостовірними (див. табл. 5.4), а вміст нуклеїнових кислот у листках позитивно корелював з сумарною концентрацією характерних для білків груп. Крім того, вміст нуклеїнових кислот та білків зменшився приблизно у стільки ж разів, у скільки змінились співвідношення «нуклеїнові кислоти/полісахариди клітинної стінки» та «білки/полісахариди клітинної стінки» відповідно (див. табл. 5.3 та 5.4) Це свідчить на користь припущення про паралельне зниження вмісту ДНК, РНК і білків в більшості клітин листка на 75%-80%, тобто в результаті активації ендогенних механізмів біохімічної відповіді, а не внаслідок прямих променевих пошкоджень чи дії продуктів радіолізу води, оскільки при дозі гострого опромінення 21 Гр лише дуже незначна частка молекул біополімерів зазнає іонізації, руйнування активними радикалами або перекисного окислення.

Площа піків, пов'язаних з жирними кислотами кутину епідермісу листка не зменшується. Тим не менше їх композиція зазнає певних конформаційних змін, на що вказує зростання відношення «симетричні збуджені коливання/несиметричні збуджені коливання С-Н зв'язку» (табл. 5.4).

Можна припустити, що частина меристематичних клітин листків опромінених рослин втрачає рРНК, які становлять більшу частину пулу нуклеїнових кислот, відповідно і здатність до синтезу білків, а також зданість до реплікації ДНК та поділу. У багатьох класичних радіобіологічних роботах

була показана вакуолізація цитоплазми меристематичних клітин та потовщення клітинних стінок під дією іонізуючого опромінення [172]. Клітинна стінка таких клітин, імовірно, накопичує целюлозу, яка заміщує пектин. Зокрема, в наших дослідках відношення «целюлоза/пектин» в тканинах листків опромінених рослин зросло з 0,38 до 2,44 (табл. 5.4). Зниження вмісту лігніну в 11,3 рази в порівнянні з контролем (табл. 5.3) вказує на тотальне руйнування лігнінових структур, що неминуче призводить до порушення еластичності тканин листка, здатності клітин до росту та розтягування, втрати тургору та деформації просторової форми і жилкування листкової пластинки (ці аномалії листка опромінених рослин спостерігали візуально). Важливим є те, що загальна кількість основних полісахаридів клітинної стінки – целюлози, геміцелюлоз, пектину під впливом радіації значуще не змінюється, отже у віддалений період після гострого опромінення відбувається не стільки деструкція, скільки зміна складу і структури клітинних стінок: зменшення вмісту пектину та лігніну й одночасне збільшення вмісту целюлози та геміцелюлоз. Відповідним чином перебудовується і вуглеводний обмін – кількість полісахаридів у листках опромінених рослин дещо зростає за рахунок полімерів глюкози: целюлози, геміцелюлози, крохмалю.

Пострадіаційне порушення метаболізму нуклеїнових кислот призводить до зменшення відношення «нуклеїнові кислоти/полісахариди клітинної стінки» через 30 діб після опромінення у 6 разів в порівнянні з неопроміненим контролем (табл. 5.4). Після гострого опромінення відбуваються також і зміни на рівні білкового обміну. Окрім зменшення у 3,8 рази вмісту білків у розеткових листках *Arabidopsis thaliana* зафіксоване невелике збільшення відношення кількості бета-структурних доменів до кількості альфа-спіральних доменів білків (табл. 5.4). Обидва типи доменів, очевидно, входять до складу тих самих протеїнів, оскільки площі відповідних піків спектру поглинання сильно корелюють між собою ($r = 0,90-0,95$). Проте у листках опроміненого варіанту коефіцієнт кореляції значуще зменшується і повністю зникає характерна для контролю негативна кореляція ($r = -0,95-0,97$) між вмістом

нуклеїнових кислот та відношенням «бета-структурні/альфа-спіральні домени». Ми припускаємо радіаційну індукцію конформаційних модифікацій вторинної та третинної структури білків, пов'язану як з протеолізом, так і з переходом певних доменів до просторової структури, характерної для бета-шарів. Останні дослідження вказують на можливість викликаної радіацією зміни фолдингу деяких протеїнів рослин, подібної до утворення бета-амілоїдів у ссавців та дріжджів.

Таблиця 5.3

Зміни питомого вмісту ідентифікованих сполук, визначених на основі маркерних хімічних груп, у відносних одиницях площі піку на спектрограмі оптичної густини, $M \pm SE$

Сполуки, характерні для тканин ліофілізованих листків	Хімічна група або зв'язок, тип коливань	Col-0, контроль	Col-0, 21 Гр	Статистично достовірні відмінності, $p < 0,01$	Відношення "опромінені рослини / контроль"
геміцелюлози	глікозидний зв'язок, C-O	0,65±0,04	1,22±0,15	<	↑ 1,88
крахмаль	C-O-C, асиметричні коливання	1,03±0,04	1,40±0,06	<	↑ 1,36
целюлоза	-CH, -C-C, -C-O-C	0,71±0,04	1,76±0,06	<	↑ 2,48
пектин	глікозидний зв'язок, C-O; дисоційована карбоксильна група (COO-)	2,01±0,22	0,82±0,10	>	↓ 2,45
нуклеїнові кислоти	фосфатний зв'язок, PO ₂ -, асиметричні коливання	0,82±0,10	0,16±0,01	>	↓ 5,13
лігнін	C-N, площинна деформація	1,58±0,23	0,14±0,03	>	↓ 11,29
протеїн, амід I, бета-структурні домени	карбонільна група, пептидний зв'язок (C-N)	3,22±0,24	0,78±0,12	>	↓ 4,13
протеїн, амід I, альфа-спіральні домени	карбонільна група, пептидний зв'язок (C-N)	3,04±0,26	0,78±0,12	>	↓ 3,90
ліпіди	карбонільна група	2,11±0,30	1,07±0,17	>	↓ 1,97
жирні кислоти кутину	метиленова група, симетричні коливання C-H зв'язку; асиметричні коливання C-H зв'язку	3,41±0,12	3,84±0,86	відсутні	відсутні

Феноменологія виявлених ефектів значною мірою співпадає з гіперчутливою відповіддю, яка виникає у рослин внаслідок інвазії патогенів [202]. Особливість реакції рослин на дію радіаційного чинника полягає, по-перше, в тому, що вона не локальна, як у випадку гіперчутливості, а зачіпає цілі органи – розеткові листки, по-друге, описані вище біохімічні зміни розвиваються поступово, протягом тривалого часу після опромінення.

Таблиця 5.4

Деякі розрахункові біохімічні параметри, визначені на основі маркерних хімічних груп, у відносних одиницях площі піку на спектрограмі оптичної густини, $M \pm SE$

Біохімічний параметр	Col-0, контроль	Col-0, 21 Гр	Статистично достовірні відмінності, $p < 0,01$	Відношення" опромінені рослини/ контроль"
целюлоза, геміцелюлози	1,36 $\pm$ 0,04	2,98 $\pm$ 0,19	<	↑ 2,19
крохмаль	1,03 $\pm$ 0,04	1,40 $\pm$ 0,06	<	↑ 1,36
пектин	2,01 $\pm$ 0,22	0,82 $\pm$ 0,12	>	↓ 2,45
полісахариди клітинної стінки (целюлоза, геміцелюлози, пектин)	3,03 $\pm$ 0,40	3,80 $\pm$ 0,30	відсутні	
полісахариди-полімери глюкози (целюлоза, геміцелюлози, крохмаль)	2,39 $\pm$ 0,05	4,39 $\pm$ 0,20	<	↑ 1,84
полісахариди в цілому	4,06 $\pm$ 0,38	5,21 $\pm$ 0,31	<	↑ 1,28
відношення целюлоза/пектини	0,38$\pm$0,03	2,44$\pm$0,26	<	↑ 6,42
ліпіди	2,11 $\pm$ 0,3	1,07 $\pm$ 0,17	>	↓ 1,97
протеїни	6,26$\pm$0,50	1,64$\pm$0,21	>	↓ 3,82
відношення бета-структурні/альфа-спіральні домени	1,07 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,05	<	↑ 1,12
відношення симетричні коливання/несиметричні коливання, C-H зв'язок, кути	0,80 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,05	<	↑ 1,49
відношення нуклеїнові кислоти/протеїни	0,13 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,03	відсутні	відсутні
відношення нуклеїнові кислоти/полісахариди клітинної стінки	0,24$\pm$0,02	0,04$\pm$0,00	>	↓ 6,00
відношення протеїни/полісахариди клітинної стінки	1,86$\pm$0,07	0,49$\pm$0,08	>	↓ 3,80

Так само як стійкість до патогенів забезпечується гіперчутливістю клітин в зоні зараження, відносно висока радіостійкість рослин при опроміненні в сублетальній дозі може бути пов'язана з аналогічною реакцією, що проявляється у модифікації метаболізму, гістологічних змінах та відмиранні

клітин, тканин і органів. Показово, що транскрипційні фактори родини MYB, задіяні у гіперчутливій відповіді, відграють важливу роль у стресовій регуляції метаболізму полісахаридів, целюлози, лігніну, пектину, ліпідів [5;30;114;122], тобто тих ланок обміну речовин, у яких спостерігали найбільші відмінності від контролю після опромінення. Білки родини MYB поряд з іншими ендogenous факторами [41;139] приймають участь у регуляції фенілпропаноїдного шляху та цвітіння [29], процесах, які зазнають суттєвих змін під впливом іонізуючого опромінення. Показано, що накопичення деяких фенілпропаноїдів та флавоноїдів пов'язане із порушенням синтезу лігніну [145]. Крім того, трансгенні лінії арабідопису, які характеризуються підвищеним рівнем експресії стресового транскрипційного фактора R2R3-MYB, мають фенотип, дуже схожий на той, що ми спостерігали у опромінених рослин і рослин з опроміненого насіння [6].

Також при опроміненні рослин *Arabidopsis thaliana* у дозі 21 Гр в клітинах розеткових листків суттєво підвищується експресія маркерних генів репарації дволанцюгових розривів ДНК *AtRAD51* і *AtKu70*. Можна припустити, що реакція, подібна до реакції гіперчутливості, спрямована на елімінацію клітин, не здатних відновити цілісність геному, і завдяки цьому – на збереження життєздатності організму та генетичної повноцінності гамет та насіння.

5.3. Радіаційно індуковані зміни транскрипційної активності генів підтримки цілісності геному та морфометричні показники *A. thaliana* у пострадіаційний період

Аналіз дозових залежностей для морфометричних ознак як-то: 30-денна виживаність; аномалії фенотипу; довжина та швидкість росту стебла; кількість листків в прикореневій розетці; середня кількість квіток на 1 см довжини стебла; тривалість вегетації після опромінення; частка рослин, розвиток яких тимчасово зупиняється на стадії розетки або брунькування, маса і питома маса

на 1 см довжини стебла висушеної надземної частини, кущіння та галуження стебла опромінених рослин, засвідчує наявність кореляційних зв'язків даних ознак з варіацією транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* – більшою мірою при повторюваному (фракціонованому) опроміненні, аніж при гострому (табл. 5.5). Це підтверджує гіпотезу про важливу роль модифікації експресії генів систем репарації ДНК у формуванні біологічного ефекту повторюваного, пролонгованого або хронічного іонізуючого опромінення. Зокрема, показники, які характеризують виживаність та вегетацію опромінених рослин, негативно корелювали з активністю гена *AtRad1*. Радіаційна активація експресії гена *AtKu70* справляла стимулюючий вплив на ріст та розвиток *A. thaliana* після фракціонованого опромінення, а його радіаційна супресія навпаки призводила до зменшення виживаності, пригнічення росту і розвитку, формування аномального фенотипу рослин у віддалений після фракціонованого опромінення період. Частка стерильних рослин була позитивно зкорельована з транскрипційною активністю гена *AtRad1* і негативно – з активністю *AtKu70*. Було зафіксовано позитивний статистично достовірний зв'язок експресії гена *AtRAD51* з тижневим приростом стебла (дана тенденція простежується і для хронічно опромінених рослин) та негативний – з часткою фенODEVІАНТНИХ рослин після фракціонованого опромінення. Виявилось також, що відношення рівня експресії *AtRAD51* до *AtRad1* негативно зкорельоване з тривалістю вегетації рослин після опромінення до загибелі. Це можна інтерпретувати таким чином, що активація АТМ-залежного шляху DDR поряд з одночасним пригніченням АТР-залежного шляху в клітинах (в першу чергу меристематичних) призводить до прискореного старіння та передчасної загибелі рослин. Одночасна активація обох шляхів, маркером чого можна вважати сумарну експресію *AtRAD51* і *AtRad1*, імовірно, призводить до пошкодження і порушень відтворення структури меристем міжвузля, що проявляється у зламі або сигмоподібній деформації стебла. Слід відзначити зв'язок накопичення маси висушеної надземної частини, галуження стебла, кущіння рослин та транскрипційної активності генів *AtKu70* і *AtRad1* (таблиця

5.5).

Аналіз таблиці 5.5 демонструє в цілому менш значущий зв'язок експресії гена *AtRAD51* з морфометричними параметрами опромінених рослин порівняно з транскрипційною активністю гена *AtRad1* та різницею активностей генів *AtKu70* і *AtRad1*. Також варто відзначити від'ємну кореляцію транскрипційної активності гену «домашнього господарства» *AtEf1a* із затримкою росту та розвитку рослин після опромінення (як одноразового, так і повторюваного). На основі отриманих результатів нами запропоновано використання підвищеного рівня активності гена *Rad1* (*UVH1*) в якості маркера радіаційно індукованого арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *Ef1a* – як характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. В той же час показні обмеження застосування транскрипційної активності гена *RAD51* як маркера рівня пошкоджень ДНК у клітинах цілої рослини чи органу. Запропоновано додатковий індекс $I_{DDR} = (TA_D(AtKu70) - TA_D(AtRad1)) - (TA_0(AtKu70) - TA_0(AtRad1))$, де TA_D – транскрипційна активність відповідного гена при дозі опромінення D , TA_0 – транскрипційна активність відповідного гена за відсутності дії іонізуючого опромінення. Індекс I_{DDR} корелює із стимулюючим впливом рідкоіонізуючого опромінення у сублетальних дозах та відображає індукцію DDR відповіді.

Систематизувати ефекти впливу сублетальних доз радіації на рослини *A.thaliana* на межі вегетативної та генеративної фаз онтогенезу, а також дослідити зв'язок цих ефектів з активністю ключових генів підтримки структурної цілісності геному допомагає аналіз синхронно варіюючих морфометричних ознак, виділити які можна за допомогою методу головних компонент. Кращу інтерпретованість факторного рішення забезпечує процедура обертання простору факторів Varimax з нормалізацією по Кайзеру, тому ми застосували її до отриманої факторної моделі. Найбільшу пояснювальну силу (80% поясненої варіації вихідних змінних у випадку одноразового та 91% – фракціонованого опромінення) при мінімальній кількості компонент продемонструвала трьохфакторна модель (таблиця 5.6).

Два з трьох факторів отриманого рішення неспецифічні, спільні для обох використаних нами режимів гострого опромінення. Ключовими змінними першого фактора є: частка стерильних рослин (навантаження 0,91 при одноразовому та 0,85 при повторюваному опроміненні); частка рослин, які після опромінення знаходились у стані «growth arrest» (навантаження 0,88 при одноразовому та 0,92 при повторюваному опроміненні); маса повітряно-сухої надземної частини пагону наприкінці вегетації (навантаження -0,79 при одноразовому та -0,82 при повторюваному опроміненні); частка рослин, у яких виникли фенотипові зміни після опромінення (навантаження 0,75 при одноразовому та 0,90 при повторюваному опроміненні).

Перший фактор можна загалом характеризувати як порушення поділу клітин меристем, що призводить до дерегуляції клітинних потоків, збоїв реалізації позиційної інформації у меристемах, аномалій морфогенезу. Цей фактор зкорельований з активністю гена *AtRad1* при одноразовому ($r = 0,74^{**}$) та фракціонованому опроміненні ($r = 0,62^{**}$), а також з транскрипцією генів *AtKu70* ($r = -0,92^{***}$) і *AtRAD51* ($r = -0,73^{**}$). Отже, порушення поділу клітин меристем рослин пов'язані з активацією експресії *AtRad1* як при одноразовому, так і при фракціонованому опроміненні, а індукційна експресія *AtKu70* та *AtRAD51* негативно корелює з порушенням проліферації клітин тільки при повторюваному опроміненні.

Таблиця 5.5

Коефіцієнти кореляції Пірсона між морфометричними показниками та транскрипційною активністю генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtEf1a* після опромінення рослин

ОДНОРАЗОВЕ ОПРОМІНЕННЯ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Ku70</i>											-0,59*		
<i>RAD51</i>													
<i>Rad1</i>			0,86**	0,73*									
<i>Ku70+Rad1+RAD51</i>													
<i>Ku70+RAD51</i>													
<i>Ku70+Rad1</i>										-0,63*			
<i>RAD51+Rad1</i>													
<i>RAD51/Rad1</i>													
<i>Ku70/(Ku70+RAD51+Rad1)</i>										-0,60*	-0,58*		
<i>RAD51/(Ku70+RAD51+Rad1)</i>													
<i>Rad1/(Ku70+RAD51+Rad1)</i>													
<i>RAD51-Ku70</i>					0,58*								
<i>RAD51-Rad1</i>				-0,63*									
<i>Ku70-Rad1</i>			-0,59*	-0,58*							-0,80**		
<i>Ef1a</i>					-0,58*							-0,63*	
ПОВТОРЮВАНЕ (ФРАКЦІОНОВАНЕ) ОПРОМІНЕННЯ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Ku70</i>	0,88**		-0,62*	-0,86**				0,61*	-0,94**				0,80**
<i>RAD51</i>	0,60*		-0,79**										
<i>Rad1</i>	-0,77*			0,74*			-0,61*		0,91**				-0,76*
<i>Ku70+Rad1+RAD51</i>	0,64*		-0,81**	-0,60*					-0,73*				
<i>Ku70+RAD51</i>	0,77*		-0,80**	-0,73*					-0,90**				
<i>Ku70+Rad1</i>							-0,59*						
<i>RAD51+Rad1</i>							-0,70*					0,79**	
<i>RAD51/Rad1</i>			-0,72*	-0,67*					-0,90**	-0,72*			
<i>Ku70/(Ku70+RAD51+Rad1)</i>							0,86**		-0,60*			-0,71*	0,84**
<i>RAD51/(Ku70+RAD51+Rad1)</i>	0,70*		-0,86**	-0,64*					-0,81*				
<i>Rad1/(Ku70+RAD51+Rad1)</i>	-0,85**		0,68*	0,79**				-0,63*	0,93**				-0,66*
<i>RAD51-Ku70</i>					0,69*					-0,62*		0,72*	
<i>RAD51-Rad1</i>	0,73*		-0,77*	-0,69*					-0,89**				
<i>Ku70-Rad1</i>	0,83**		-0,60*	-0,81**					-0,93**				-0,79*
<i>Ef1a</i>			0,62*		-0,56*			-0,73*					

1 – Тижневий приріст стебла; **2** – Загальна кількість стручків, зібраних протягом 30 діб після опромінення, в середньому на рослину; **3** – Частка рослин, у яких виникли фенодевіації після опромінення; **4** – Частка рослин, які зазнали затримки розвитку після опромінення більше, ніж на 14 діб; **5** – Кількість живих листків в прикореневій розетці через 30 діб після опромінення; **6** – Частка рослин в генеративній фазі розвитку через 2 тижні після опромінення;

7 – Середня кількість квіток на 100 мм довжини стебла; **8** – Маса повітряно-сухої надземної частини пагону наприкінці вегетації; **9** – Маса повітряно-сухої надземної частини пагону на 100 мм довжини; **10** – Тривалість вегетації після опромінення; **11** – Частка рослин, у яких спостерігається куціння; **12** – Частка рослин, у яких спостерігається Г-подібний або сигмоподібний злам стебла; **13** – Галуження, кількість стебел другого та вищого порядку на одну рослину.

Примітка. Жирним шрифтом виділені коефіцієнти кореляції статистично достовірних предикторів лінійно-регресійної моделі (рівнів транскрипції відповідних генів та їх співвідношень) із залежною змінною- морфометричним параметром, якому відповідає колонка таблиці.

Статистична достовірність відмінності наведених коефіцієнтів кореляції від 0:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Це можна інтерпретувати як участь ендонуклеази *AtRad1* у SOG1-опосередкованій зупинці поділів клітин у відповідь на опромінення, а репараційних білків *AtKu70* і *AtRAD51* – у репарації ДР ДНК в проміжок часу між фракціями при повторюваному опроміненні. Також можливою є індукція активності гена *AtRad1* під час арешту клітинного циклу.

До другого фактора, який відображає регенеративні процеси, належать загальна кількість стручків, зібрана протягом 30 діб після опромінення в середньому на рослину (навантаження 0,95 при одноразовому та 0,91 при повторюваному опроміненні) та частка рослин, у яких спостерігається куціння (навантаження 0,71 при одноразовому та 0,82 при повторюваному опроміненні). Кореляційний аналіз показав, що фактор регенерації достовірно не пов'язаний з транскрипційною активністю ключових генів репарації ДНК.

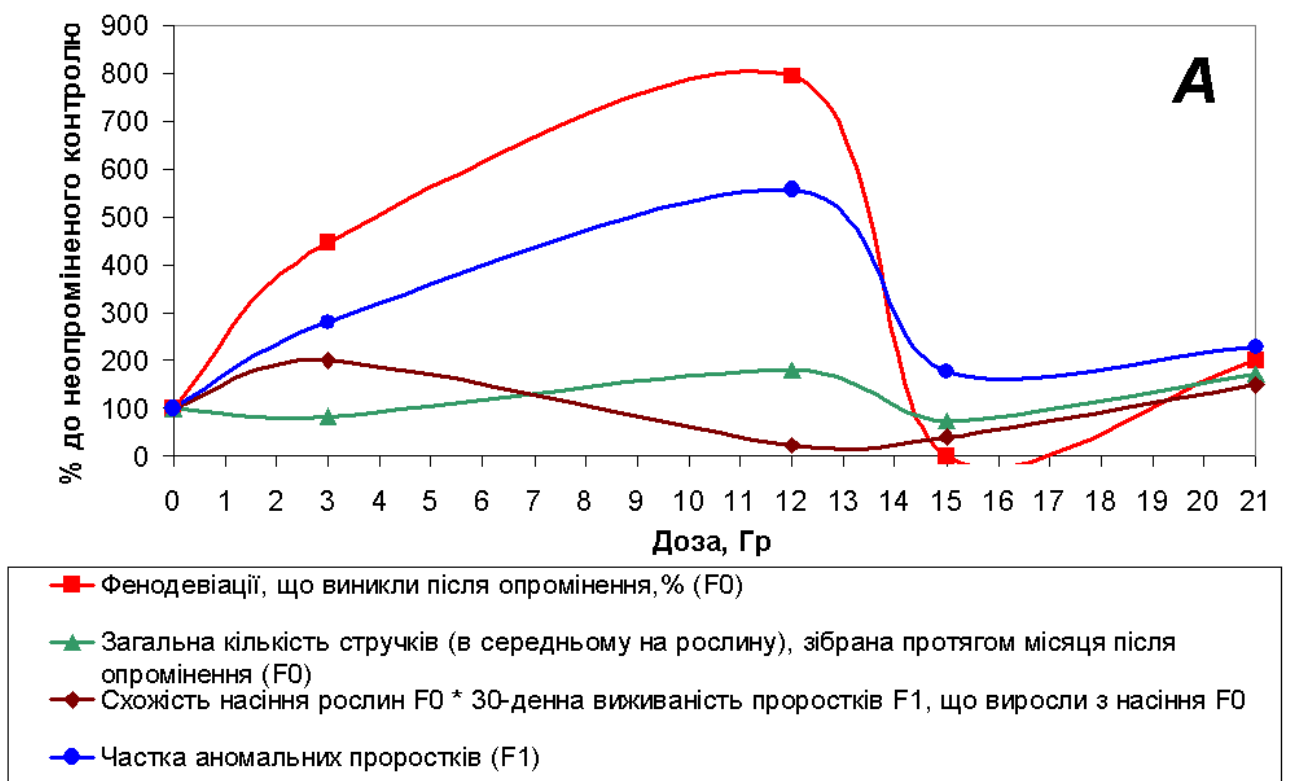
Таблиця 5.6

Факторні навантаження змінних головних компонент коваріації фенотипічних характеристик рослин *A. thaliana*, опромінених у дозах 3-21 Гр

ОДНОРАЗОВЕ ОПРОМІНЕННЯ			
	Компоненти		
	1	2	3
Тижневий приріст стебла	-0,09	-0,02	-0,93
Загальна кількість стручків, зібрана протягом місяця після опромінення, в середньому на рослину	0,03	0,95	-0,16
Частка рослин, у яких виникли фенотипічні відхилення після опромінення	0,75	0,41	-0,28
Частка рослин, які зазнали затримки розвитку після опромінення більше, ніж на 14 діб	0,88	0,11	-0,03
Кількість живих листків в прикореневій розетці через 30 діб після опромінення	0,65	-0,31	0,15
Частка рослин в генеративній фазі розвитку через 2 тижні після опромінення	-0,19	0,86	0,02
Середня кількість квіток на 100 мм довжини стебла	-0,14	0,25	0,82
Частка стерильних рослин	0,91	0,35	-0,12
Маса повітряно-сухої надземної частини пагона наприкінці вегетації	-0,79	0,18	0,42
Тривалість вегетації після опромінення	-0,61	0,15	-0,38
Частка рослин, у яких спостерігається куцуння	0,54	0,71	0,13
Частка рослин, у яких спостерігається Г-подібний або сигмоподібний злам стебла	0,34	-0,55	-0,65
Галуження, кількість стебел другого та вищого порядку на одну рослину	0,26	0,76	0,39
Маса повітряно-сухої надземної частини пагона на 100 мм довжини	-0,01	-0,23	0,95
% ПОЯСНЕНОЇ ДИСПЕРСІЇ ВИХІДНИХ ЗМІННИХ	29,4	25,7	25,0
ЗАГАЛЬНИЙ % ПОЯСНЕНОЇ ДИСПЕРСІЇ ВИХІДНИХ ЗМІННИХ		80,1	
ПОВТОРЮВАНЕ (ФРАКЦІОНОВАНЕ) ОПРОМІНЮВАННЯ			
	Компоненти		
	1	2	3
Тижневий приріст стебла	-0,95	0,00	-0,28
Загальна кількість стручків, зібрана протягом місяця після опромінення, в середньому на рослину	0,03	0,91	0,22
Частка рослин, у яких виникли фенотипічні відхилення після опромінення	0,90	0,36	-0,09
Частка рослин, які зазнали затримки розвитку після опромінення більше, ніж на 14 діб	0,92	0,01	0,38
Кількість живих листків в прикореневій розетці через 30 діб після опромінення	0,07	-0,26	0,92
Частка рослин в генеративній фазі розвитку через 2 тижні після опромінення	0,24	0,16	0,93
Середня кількість квіток на 100 мм довжини стебла	-0,10	0,87	-0,25
Частка стерильних рослин	0,85	0,08	0,44
Маса повітряно-сухої надземної частини пагона наприкінці вегетації	-0,82	-0,11	0,00
Тривалість вегетації після опромінення	-0,24	0,04	-0,93
Частка рослин, у яких спостерігається куцуння	0,48	0,82	0,10
Частка рослин, у яких спостерігається Г-подібний або сигмоподібний злам стебла	-0,08	-0,83	0,50
Галуження, кількість стебел другого та вищого порядку на одну рослину	-0,54	0,49	-0,66
Маса повітряно-сухої надземної частини пагона на 100 мм довжини	0,93	-0,14	0,17
% ПОЯСНЕНОЇ ДИСПЕРСІЇ ВИХІДНИХ ЗМІННИХ	39,2	24,6	27,4
ЗАГАЛЬНИЙ % ПОЯСНЕНОЇ ДИСПЕРСІЇ ВИХІДНИХ ЗМІННИХ		91,2	

Примітка. Жовтим маркером виділені змінні з максимальними навантаженнями, спільні для факторів моделей одноразового та повторюваного опромінення.

Нами було з'ясовано, що частка аномальних проростків F_1 , отриманих з насіння опромінених рослин, зкорельована з часткою фенотипових відхилень, які виникли у поколінні F_0 після опромінення. Схожість та виживаність проростків F_1 корелює з тижневим приростом стебла рослин F_0 після фракціонованого опромінення (див. рис. 5.3). Така залежність морфометричних показників неопроміненого покоління F_1 від показників покоління F_0 вказує на існування трансгенераційної пам'яті клітин про опромінення.



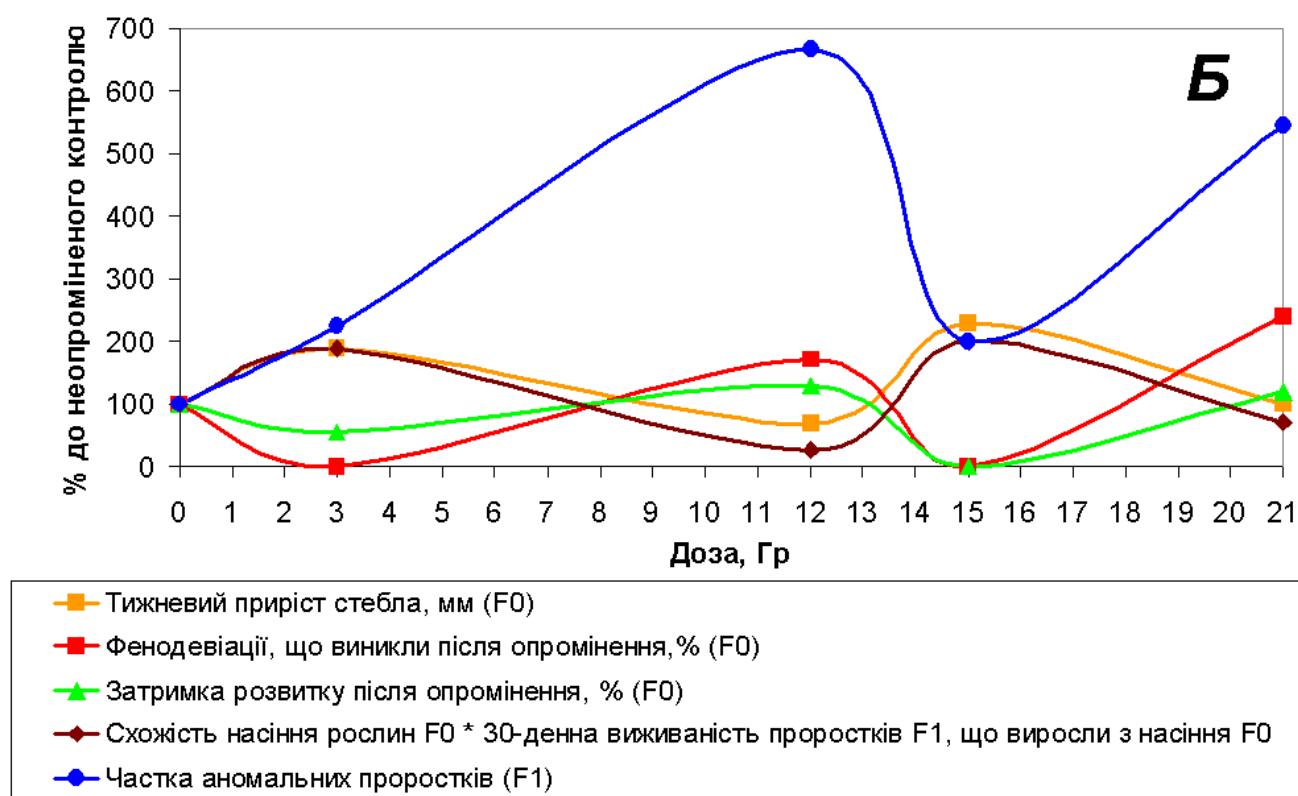


Рис. 5.3. Дозові залежності для зкорельованих морфометричних індексів опромінених рослин F_0 та їх нащадків покоління F_1 . А – одноразове, Б – повторюване (фракціоноване) опромінення

Оскільки морфометричні показники, особливо у випадку фракціонованого опромінення, корелюють із зміненою під впливом радіації транскрипційною активністю генів *AtKu70* та *AtRad1*, морфометричні особливості покоління, отриманого з насіння опромінених рослин, можуть бути пов'язані з успадкуванням патерну підвищеної активності гена *AtRad1* (модифікований патерн експресії *AtKu70* не успадковується) або, що більш імовірно, з трансгенераційною передачею нерепарованих одноланцюгових пошкоджень ДНК.

У зв'язку з раніше отриманими даними виникло питання про ефекти, що виникають у покоління F_1 , вирощеного з насіння опромінених рослин F_0 . Такі ефекти, пов'язані з ефектами у поколінні F_0 , виявили для схожості насіння, життєздатності 30-денних проростків і для частки рослин з аномальним габітусом, які ми назвали R-фенотипом (див. рис. 4.5 В). R-фенотип представлений рослинами, які характеризуються карликовістю, зупинкою на вегетативній фазі розвитку,

стерильністю, дрібними та скрученими листками розетки темно-зеленого чи антоціанового кольору з гіпертрофованими трихомами.

Було з'ясовано, що відсоток R-рослин у F_1 тісно пов'язаний з відсотком R-рослин у F_0 після одноразового та фракціонованого опромінення, з часткою рослин, що виявляють затримку росту, та із швидкістю росту стебла після фракціонованого опромінення (рис. 5.3, табл. 5.7).

Цікаво, що після фракціонованого рентгенівського опромінення спостерігається статистично достовірна кореляція між більшою кількістю фенотипових характеристик опромінених рослин та їх нащадків, ніж після одноразового опромінення.

Виходячи з попередньо отриманих даних щодо спадкових змін активності генів підтримки цілісності геному арабідопсиса *AtKu70*, *AtRAD51* і *AtRad1* ми прийшли до висновку, що успадкування зміненого фенотипу може бути реалізоване за допомогою трансгенераційної транзиції уражень ДНК меристем, що призводить до формування модифікованого фенотипу і паралельно активує транскрипцію генів репарації ДНК. Можливий також і механізм епігеномного успадкування патерну підвищеної експресії окремих генів репарації або їх транскрипційних факторів у поколінні неопромінених рослин. У цьому випадку до відхилення фенотипу рослини від нормального може призводити підвищена активність генів підтримки структурної цілісності геному, що грають важливу роль у нормальному поділі клітин меристематичних тканин. Обидва варіанти пояснення передбачають стійкий зв'язок між фенотипом і активністю генів *AtRad1*, *AtRAD51* та *AtKu70*, а також між активністю генів репарації ДНК у поколіннях F_0 та F_1 . У повній відповідності із зробленими припущеннями отримані результати показали, по-перше, кореляцію фенотипічних ознак опромінених варіантів з транскрипцією генів *AtRad1*, *AtRAD51* і *AtKu70* у поколіннях F_0 та F_1 (табл. 5.8, табл. 5.9), по-друге, збереження підвищеної транскрипційної активності *AtRad1* та *AtRAD51* у листках рослин покоління F_1 (рис. 3.9, табл. 3.1). При цьому змін у транскрипційній активності гена *AtKu70* у потомстві опромінених рослин у порівнянні з потомством контрольних рослин не спостерігалось.

Таблиця 5.7

Коефіцієнти кореляції Пірсона між пов'язаними характеристиками
опромінених рослин *A. thaliana* покоління F₀ та неопроміненими рослинами
покоління F₁

Ознака (5-6 тижні вегетації)	Частка рослин з R- фенотипом, одноразове опромінення (F ₁)	Частка рослин з R- фенотипом, фракціоноване опромінення (F ₁)
Частка рослин з R-фенотипом, одноразове опромінення (F ₀)	0,94**	—
Частка рослин з R-фенотипом, фракціоноване опромінення (F ₀)	—	0,75*
Частка рослин із затримкою розвитку більше, ніж на 14 діб («growth arrest»), фракціоноване опромінення (F ₀)	—	0,64*
Середня швидкість росту стебла, фракціоноване опромінення (F ₀)	—	-0,59*

Статистична достовірність відмінності наведених коефіцієнтів кореляції від 0: * $p \leq 0,05$;
** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Таблиця 5.8

Коефіцієнти кореляції Пірсона між низкою модифікованих опроміненням
фенотипних характеристик (F₀) та транскрипційною активністю генів *AtRad1*,
AtRAD51, *AtKu70* (F₀)

Ознака (5-6 тижні вегетації)	<i>AtRad1</i>	<i>AtRAD51</i>	<i>AtKu70</i>
Частка рослин з R-фенотипом, одноразове опромінення (F ₀)	0,86**	—	—
Частка рослин з R-фенотипом, фракціоноване опромінення (F ₀)	0,56*	-0,79*	-0,62*
Частка рослин із затримкою розвитку більше, ніж на 14 діб («growth arrest»), фракціоноване опромінення (F ₀)	0,74*	-0,55*	-0,86**
Середня швидкість росту стебла, фракціоноване опромінення (F ₀)	-0,77*	0,60*	0,88**

Статистична достовірність відмінності наведених коефіцієнтів кореляції від 0:
* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Як уже було зазначено, підвищена транскрипційна активність генів *AtRad1* та *AtRAD51* на відміну від активності *AtKu70* у розеткових листках першого покоління нащадків опромінених рослин зберігається, або ще більше зростає порівняно з

рівнем, характерним для батьківських рослин після опромінення. При цьому частка рослин з R-фенотипом після одноразового опромінення позитивно корелює з експресією гена *AtRad1* у листках покоління F_0 опромінених рослин ($r = 0,72^*$) та їх нащадків ($r = 0,97^{**}$):

Таблиця 5.9

Коефіцієнти кореляції Пірсона між низкою модифікованих опроміненням фенотипних характеристик (F_1) та транскрипційною активністю генів *AtRad1*, *AtRAD51*, *AtKu70* (F_0 та F_1)

Ознака (5-6 тижні вегетації)	<i>AtRad1</i> (F_0)	<i>AtRAD51</i> (F_0)	<i>AtKu70</i> (F_0)	<i>AtRad1</i> (F_1)	<i>AtRAD51</i> (F_1)	<i>AtKu70</i> (F_1)
Частка рослин з R-фенотипом, одноразове опромінення (F_1)	0,72*	—	—	0,97**	—	—
Частка рослин з R-фенотипом, фракціоноване опромінення (F_1)	—	—	—	—	0,93**	—
Схожість насіння рослин F_0 * 30-денна виживаність проростків F_1 , що вирости з насіння F_0 , одноразове опромінення	—	0,90**	—	—	—	—
Схожість насіння рослин F_0 * 30-денна виживаність проростків F_1 , що вирости з насіння F_0 , фракціоноване опромінення	-0,75*	0,92**	—	-0,64*	0,93**	—

Статистична достовірність відмінності наведених коефіцієнтів кореляції від 0:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Проростання насіння та виживаність проростків F_1 позитивно зкорельована з рівнем транскрипційної активності гена *AtRAD51* і негативно – з транскрипцією гена *AtRad1* в обох поколіннях (таблиця 5.9). Разом з тим, у поколінні F_1 частка R-фенотипу серед повторювано опромінених рослин та проростання і виживаність одноразово опромінених рослин корелюють з транскрипційною активністю гена *AtRAD51* у листках F_1 ($r = 0,93^{**}$) та у листках F_0 ($r = 0,90^{**}$) відповідно.

Узагальнення виявлених зв'язків і тенденцій (особливо стосовно індукції *AtRAD51* у неопромінених нащадків рослин, опромінених у дозі 15 Гр, при тому, що у листках полкоління F_0 опромінених рослин індукція *AtRAD51* не спостерігається) побічно свідчить на користь трансгенераційної передачі нерепарованих пошкоджень ДНК як механізму успадкування морфологічних аномалій та зміненого фенотипу. Ймовірно, це стосується одноланцюгових пошкоджень ДНК, як це має місце при хронічному низькодозовому опроміненні (розділ 3.3), про що свідчить збільшення транскрипційної активності переважно гена *AtRad1*, а не *AtRAD51*, за однакової з контролем експресії *AtKu70*. Гени репарації ДНК у цьому випадку індукуються в клітинах листків неопроміненого потомства переданими пошкодженнями батьківської ДНК. Проте ці дані не дають підстав виключити і роль епігенетичного успадкування підвищеної активності гена *AtRad1*.

5.4. Радіочутливість мутанта *Atmsh2*^{-/-} SALK_002708 та ймовірна роль білку MSH2 у пострадіаційному відновленні ДНК рослин

У попередніх дослідках було з'ясовано, що опромінення мутанта *Atmsh2*^{-/-} призводить до змін у транскрипції генів *AtRAD51*, *AtKu70* та *AtRad1*, які статистично достовірно не відрізняються від таких у рослин з генотипом *Atmsh2*^{+/+}. Однак при цьому мутант *Atmsh2*^{-/-} більш чутливий до дії одноразового, але не повторюваного та не хронічного іонізуючого опромінення за показником накопичення сухої маси надземної частини [190;192], тобто зазнає сильніших ушкоджень при дії тих самих одноразово отриманих доз радіації в порівнянні з рослинами генотипу *Atmsh2*^{+/+} (рис. 4.7, рис. 5.4, рис. 5.5).

Більше 50 % нащадків неопроміненої лінії *Atmsh2*^{-/-} у 5-6-му поколінні гинули, не досягнувши генеративної фази або ж були стерильними, що свідчить про швидке накопичення мутаційного тягаря та виродження лабораторної популяції.

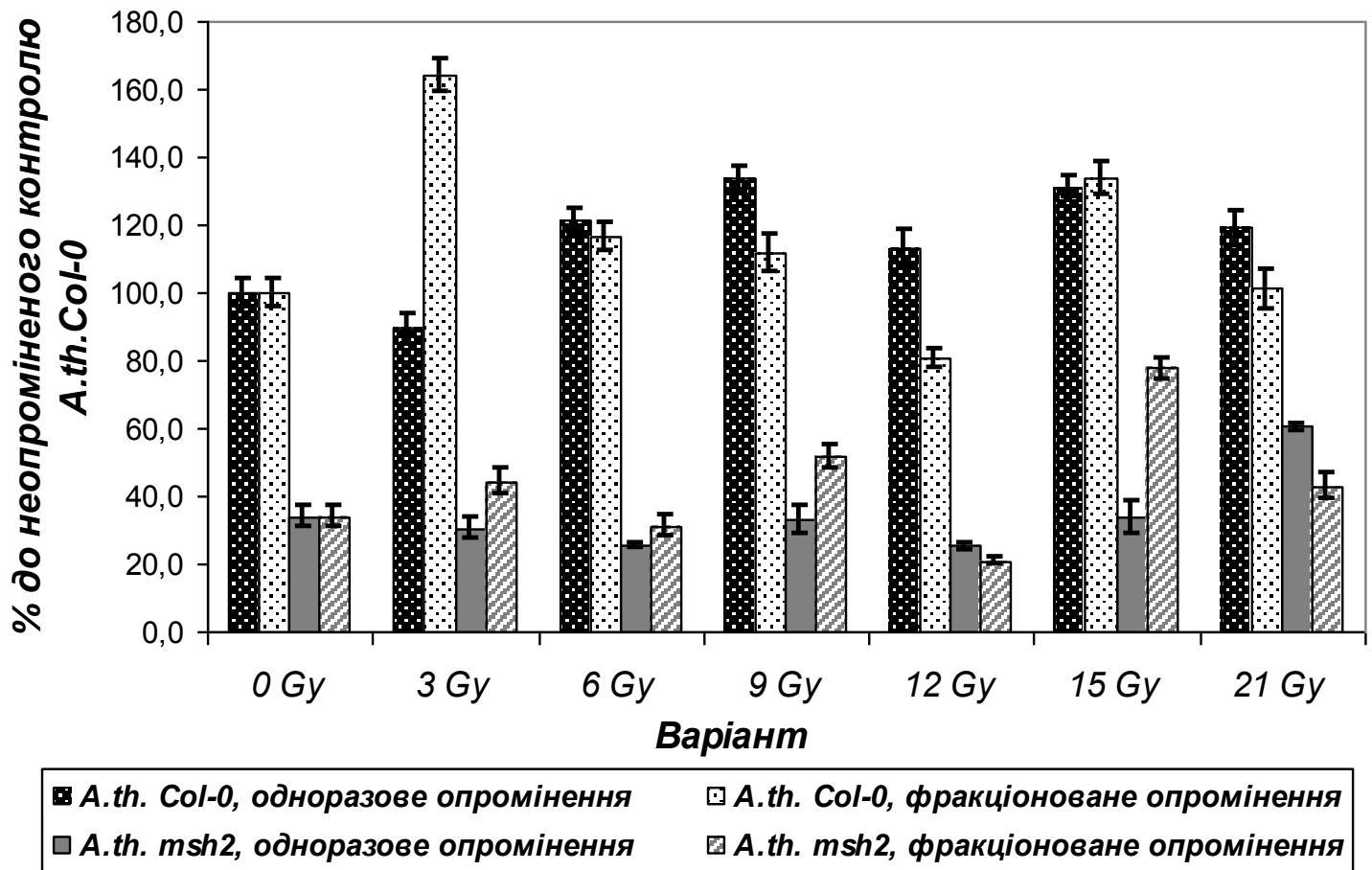


Рис. 5.4. Середня маса повітряно-сухої надземної частини рослин наприкінці вегетації, % до неопроміненого контролю *A.th. Col-0* (wt)

При опроміненні в дозі 12 Гр, яка стимулювала активність гена *AtRad1*, частка рослин *Atmsh2*^{+/+} з аномальним фенотипом та затримкою розвитку зростала у порівнянні з неопроміненим контролем, а серед рослин з генотипом *Atmsh2*^{-/-}, навпаки, знижувалася. При дозах фракціонованого опромінення 6, 9 і 15 Гр, що стимулювали експресію гена *AtRAD51*, знижувався відсоток рослин *Atmsh2*^{+/+} з аномальним фенотипом і затримкою розвитку та зростав відповідний відсоток серед опромінених мутантів *Atmsh2*^{-/-}.

Щодо впливу опромінення на накопичення біомаси (показник, за яким мутант *Atmsh2*^{-/-} SALK_002708 суттєво відрізнявся від рослин *Atmsh2*^{+/+} *Col-0*), то пострадіаційні ефекти були подібними для обох генотипів лише при дозі 3 Гр, коли відбувалася індукція *AtRAD51*, а експресія *AtRad1* суттєво не знижувалася. Для всіх інших доз опромінення в інтервалі 6–21 Гр спостерігалися значні відмінності між мутантом *Atmsh2*^{-/-} SALK_002708 та рослинами *Col-0* (рис. 5.5).

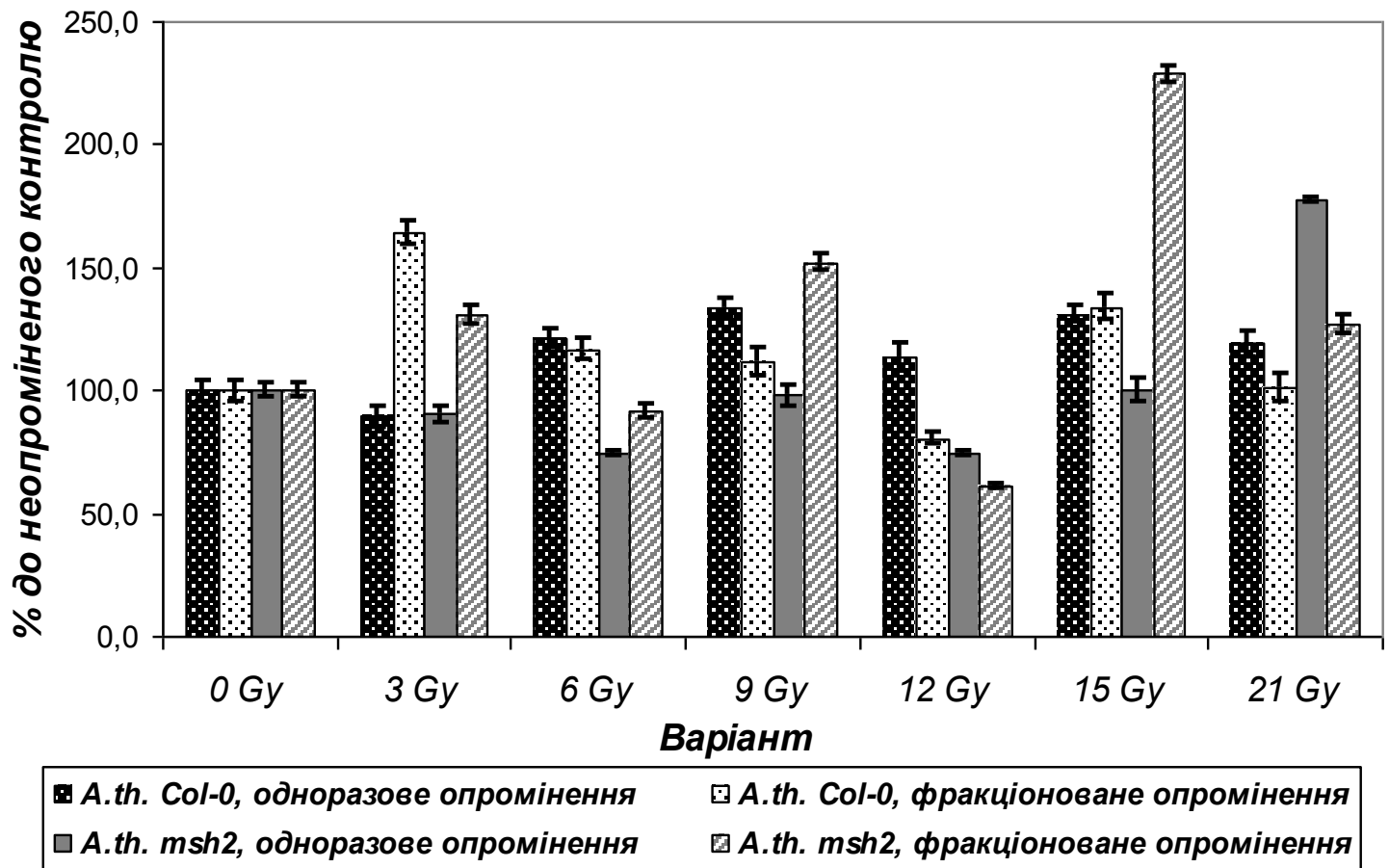


Рис. 5.5. Середня маса повітряно-сухої надземної частини рослини наприкінці вегетації, % до власного неопроміненого контролю *A.th. Col-0* (wt) та *A.th. msh2* (*Atmsh2* SALK_002708) відповідно

Зокрема, при дозі одноразового і повторюваного опромінення 6 Гр (при якій відмічалася максимальна індукція *AtRAD51* поряд із зниженою експресією *AtRad1*), що була стимулюючою для рослин *Atmsh2*^{+/+}, зменшувалося накопичення біомаси рослинами мутантної лінії *Atmsh2*^{-/-} SALK_002708. Інгібуюча доза 12 Гр (при опроміненні в цій дозі спостерігалася відсутність індукції *AtRAD51* і максимальна стимуляція експресії *AtRad1*) діяла на рослини генотипу *Atmsh2*^{-/-} значно сильніше в порівнянні з генотипом *Atmsh2*^{+/+}. Доза фракціонованого, але не одноразового опромінення 15 Гр стимулювала збільшення маси надземної частини рослин мутантної лінії (при фракціонуванні дози 15 Гр активувалася експресія *AtRAD51*, відсутня при одноразовому опроміненні у дозі 15 Гр). Водночас, опромінення у дозі 21 Гр мало значно сильнішу стимулюючу дію на утворення біомаси рослинами з генотипом *Atmsh2*^{-/-} відносно рослин *Atmsh2*^{+/+}. В сукупності дані факти свідчать

про взаємодію білка MSH2 з ендонуклеазою Rad1 та рекомбіназою RAD51 під час пострадіаційного відновлення ДНК у клітинах рослин.

Фракціонування дози на три рівні фракції з інтервалом у 24 години зумовлювало зменшення відносної радіочутливості мутанта *Atmsh2*^{-/-} в середньому у 1,6 раза (крім стимулюючих індуковану репарацію ДНК доз фракціонованого опромінення 3 та 21 Гр, за яких радіочутливість рослин *Atmsh2*^{-/-} підвищується в 1,3 та 1,2 рази відповідно).

У підрозділі 4.3 були наведені дані, згідно з якими доза хронічного опромінення проростків та вегетуючих рослин 20 сГр збільшувало суху масу надземної частини приблизно в 1,4 рази як у *wt* рослин, так і мутантів *Atmsh2*. Також було показано, що рослини з генотипом *Atmsh2*^{-/-} у інтервалі сублетальних доз рентгенівського опромінення до 21 Гр включно накопичували меншу суху біомасу надземної частини в порівнянні з рослинами генотипу *Atmsh2*^{+/+}. Отже, абсолютна радіочутливість мутантних рослин за даним показником є вищою по відношенню до рослин дикого типу. У той же час при дозі гострого опромінення 21 Гр, а також при фракціонуванні доз 9 Гр, 15 Гр і 21 Гр спостерігався більший відносний приріст сухої маси опромінених рослин щодо неопроміненого контролю *Atmsh2*^{-/-} і менший у рослин *Atmsh2*^{+/+}. Це означає, що у інтервалі сублетальних доз рентгенівського опромінення відносна радіочутливість рослин, дефектних за білком місметч-репарації MSH2, не однакова, а залежить як від дози, так і від режиму опромінення. Фракціонування доз 6 – 15 Гр знижує відносну радіочутливість мутанта *Atmsh2*^{-/-}, а доз 3 і 21 Гр, навпаки, її підвищує.

Отримані дані свідчать як про самостійну роль білка MSH2 у репарації викликаних радіацією пошкоджень ДНК рослин, так і про ймовірну взаємодію з продуктами генів *Rad1* і *RAD51*. Ця взаємодія можлива шляхом участі MSH2 у біохімічних шляхах репарації ДНК, зокрема у виправленні дволанцюгових розривів шляхом гомологічної рекомбінації – HR (*RAD51* і *MSH2*) та поєднання кінців, опосередкованого мікрогомологією – MMEJ (*Rad1* і *MSH2*).

5.5. Оцінка ступеню радіаційного ураження ДНК арабідопсису використаними дозами опромінення

Згідно з сучасними радіобіологічними уявленнями до радіації найбільш чутливі саме меристематичні тканини. Розрахунок кількості влучень у ДНК за модифікованим методом Тимофєєва-Ресовського та Лі [178;201] з урахуванням оцінки очікуваної кількості дволанцюгових пошкоджень, показує, що для обраних дозових навантажень первинними потенційно летальними пошкодженнями ДНК меристематичних клітин можна знехтувати, а в разі хронічно опромінених проростків навіть загальна кількість первинних пошкоджень виявляється дуже малою (табл. 5.10). Причому, враховуючи виключно малу кількість пошкоджень ДНК, що виникають у клітинах активних меристем проростків дикого типу *A. thaliana* та мутанта *Atmsh2 SALK_002708* протягом клітинного циклу при опроміненні в дозах, які все ж індукують DDR, можна зробити висновок, що при хронічній дії радіації пошкодження повинні накопичуватись кумулятивно. Інакше незрозуміло, як виникають розриви ДНК, що активують DDR-відповідь клітин, зокрема транскрипцію генів *AtRAD51* та *AtRad1*, підвищений рівень якої був виявлений нами у листках хронічно опромінених проростків арабідопсису. Тобто одноланцюгові пошкодження при хронічному низькодозовому опроміненні мають передаватися від материнської клітини до дочірньої.

Таблиця 5.10

Середня очікувана кількість радіаційно індукованих пошкоджень ДНК у клітинах
опромінених рослин

Клітини	Тривалість опромінення клітин, год	Накопичені دوزи, Гр	Математичне очікування кількості пошкоджень ДНК (з них дволанцюгових пошкоджень), 4C: на геном у пізній S, G2 та M- фазах, 2C: на геном у G0, G1 та ранній S- фазах
Клітини меристем ембріона сухого насіння <i>A. thaliana</i>	672	0,3	4C: 32,88 (0,22-0,33) 2C: 16,44 (0,11-0,17)
Клітини меристем проростків <i>A. thaliana</i> , що знаходяться у стані спокою	168	0,03	4C: 3,28 (0,022-0,033) 2C: 1,64 (0,011-0,017)
Клітини активних меристем проростків <i>A. thaliana</i> протягом клітинного циклу	24	0,0044	4C: 0,48 (0,0042-0,0083) 2C: 0,24 (0,0021-0,0042)
Клітини меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2 SALK_002708</i> , що знаходяться у стані спокою	840	0,2	4C 21,92 (0,15-0,22) 2C: 10,96 (0,073-0,11)
Клітини активних меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2</i> <i>SALK_002708</i> протягом клітинного циклу	24	0,0057	4C: 0,63 (0,0056-0,0108) 2C: 0,32 (0,0028-0,0054)
Клітини меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2 SALK_002708</i>	0,056	3	4C: 328,8 (2,20-3,30) 2C: 164,4 (1,10-1,70)
Клітини активних меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2</i> <i>SALK_002708</i> протягом клітинного циклу	0,019	1 (фракція)	4C: 109,6 (0,73-1,10) 2C: 54,8 (0,37-0,55)
Клітини меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2 SALK_002708</i>	0,112	6	4C: 657,6 (4,40-6,60) 2C: 328,8 (2,20-3,30)
Клітини активних меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2</i> <i>SALK_002708</i> протягом клітинного циклу	0,037	2 (фракція)	4C: 219,2 (1,46-2,20) 2C: 109,6 (0,74-1,10)
Клітини меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2 SALK_002708</i>	0,169	9	4C: 986,4 (6,60-9,90) 2C: 493,2 (3,30-4,95)
Клітини активних меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2</i> <i>SALK_002708</i> протягом клітинного циклу	0,056	3 (фракція)	4C: 328,8 (2,20-3,30) 2C: 164,4 (1,10-1,70)
Клітини меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2 SALK_002708</i>	0,225	12	4C: 1315,2 (8,80-13,20) 2C: 657,6 (4,40-6,60)
Клітини активних меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2</i> <i>SALK_002708</i> протягом клітинного циклу	0,075	4 (фракція)	4C: 438,4 (2,92-4,40) 2C: 219,2 (1,46-2,20)
Клітини меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2 SALK_002708</i>	0,281	15	4C: 1644,0 (11,00-16,50) 2C: 822,0 (5,50-8,25)
Клітини активних меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2</i> <i>SALK_002708</i> протягом клітинного циклу	0,094	5 (фракція)	4C: 548,0 (3,67-5,50) 2C: 274,0 (1,84-2,75)
Клітини меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2 SALK_002708</i>	0,393	21	4C: 2301,6 (15,40-23,10) 2C: 1150,8 (7,70-11,55)
Клітини активних меристем проростків дикого типу <i>A. thaliana</i> та мутанта <i>Atmsh2</i> <i>SALK_002708</i> протягом клітинного циклу	0,131	7 (фракція)	4C: 767,2 (5,13-7,70) 2C: 383,6 (2,57-3,85)

Примітка. Розрахунки зроблені на основі припущення, що при поглинанні енергії рідкоіонізуючого випромінювання 30 eV/мол у ДНК очікується поява одиничного одноланцюгового пошкодження (виходячи з прийнятих оцінок радіаційно-хімічних виходів пошкоджень ДНК у водному ~1% розчині *in vivo*). Дволанцюгових пошкоджень на одиницю поглиненої дози виникає приблизно в 100-150 разів менше загальної кількості пошкоджень [201].

З цього ми можемо зробити висновок, що описані вище радіобіологічні ефекти, як і активація DDR, можуть бути наслідком не первинних, а вторинних ушкоджень, викликаних ферментативною активністю конститутивних систем репарації ДНК. В цьому проявляється дія принципу підсилювача, про який вже неодноразово згадувалося.

5.6. Висновки до розділу 5

Дія сублетальних доз опромінення рослин виявляє залежність як від дози – при збільшенні дози знижується стимуляція та зростає пригнічення меристем, так і від режиму опромінення – повторюване опромінення меншою мірою стимулює та більшою мірою пригнічує активність меристем у порівнянні з одноразовим.

Ефекти сублетальних доз радіації зумовлені неоднорідністю різних клітинних популяцій у меристемах, а також гетерогенністю меристем рослинного організму та окремих рослин всередині однієї лінії за радіостійкістю. Найвищу радіочутливістю відрізняються інтеркалярна меристема міжвузлів квітконосів та високоактивна у період переходу до цвітіння генеративна меристема. Відносно нижча радіочутливість властива апікальній меристемі верхівкової бруньки стебла. Найбільш радіостійкою на стадії переходу до фази генеративного розвитку є латеральна меристема судинних пучків листків, від стану якої залежить довгострокове збереження життєздатності листка.

На межі інтервалів стимуляції та пригнічення життєдіяльності опромінених рослин спостерігались значні зміни кількісного вмісту полісахаридів (зростання вмісту), лігнінів, нуклеїнових кислот і протеїнів (зменшення вмісту), а також конформації макромолекул. Виявлені віддалені біохімічні зміни можуть бути

зумовлені індукцією біохімічної відповіді рослинних клітин на стрес, викликаний іонізуючим опроміненням, що призводить до деградації нуклеїнових кислот, модифікації клітинної стінки, накопичення крохмалю, протеолізу та конформаційних перетворень білків. Високий рівень активності генів репарації ДНК *AtRAD51* і *AtKu70* на межі інтервалу сублетальних доз рентгенівського опромінення (21 Гр) у поєднанні з маркерами загибелі клітин демонструє, що системи репарації найбільш ефективно забезпечують пострадіаційне відновлення рослин лише в інтервалі стимулюючих доз радіації.

Незважаючи на те, що повторюване опромінення загалом менш ефективно індукувало експресію генів репарації ДНК у порівнянні з одноразовим, саме при цьому режимі спостерігався тісний зв'язок між активністю досліджуваних генів та динамікою морфометричних показників у пострадіаційний період. Зокрема, частка рослин у стані «growth arrest» (затримка росту та розвитку) корелювала з активністю гена *AtRad1*. Водночас експресія гена *AtKu70* була пов'язана з подоланням пострадіаційної затримки розвитку, зменшенням ризику виникнення морфологічних аномалій, стимуляцією росту та накопиченням біомаси. Індукція гена *AtRAD51* запобігала утворенню морфологічних аномалій рослин та формуванню R-фенотипу.

З'ясовано, що у інтервалі сублетальних доз рентгенівського опромінення відносна радіочутливість рослин, дефектних за білком місметч-репарації MSH2, не однакова, а залежить як від дози, так і від режиму опромінення. Фракціонування доз 6 – 15 Гр знижує відносну радіочутливість мутанта, а доз 3 Гр і 21 Гр, навпаки, підвищує. Отримані дані свідчать як про самотійну роль білка MSH2 у репарації викликаних радіацією пошкоджень ДНК рослин, так і про можливу взаємодію з продуктами генів *AtRad1* і *AtKu70*.

Трансгенераційна передача підвищеної транскрипційної активності ключових генів підтримки структурної цілісності геному корелює з фенотиповими ефектами у неопроміненому потомстві опромінених рослин. Фракціонування дози з 24-годинним інтервалом, у порівнянні з одноразовим опроміненням, викликає більш виражений та тісний зв'язок між морфометричними характеристиками опромінених рослин та їхнього потомства. Підвищена активність гена *AtRad1* у клітинах

неопромінених рослин першого покоління, вирощених з насіння опромінених рослин, пов'язана із зниженням схожості й 30-денної виживаності та підвищеною частотою морфологічних аномалій. Все це дозволяє розглядати підвищену транскрипційну активність гена *Rad1* через тривалий час після дії на організм рідко іонізуючої радіації в якості маркера індукованої нестабільності геному.

На наш погляд, виявлені радіобіологічні ефекти стимулюючих та сублетальних доз рентгенівського опромінення пов'язані з радіаційною модифікацією активності систем підтримки цілісності геному, а не з прямим впливом радіації. Це має особливе значення при подовженій в часі дії радіаційного чинника на клітини, які раніше зазнали опромінення, наприклад, при повторюваному (фракціонованому), пролонгованому та хронічному опроміненні. Зокрема, при фракціонуванні дози з інтервалом 24 години, близьким до тривалості мітотичного циклу, радіаційна модифікація активності генів підтримки цілісності геному суттєвим чином впливає на ефективність та злагодженість процесів репопуляції меристем. Тому радіаційно індукована транскрипційна відповідь ключових генів репарації ДНК пов'язана більшою мірою із стійкістю рослин до дії повторюваного та хронічного, але не одноразового опромінення.

В основі спостережуваних радіобіологічних ефектів може лежати DDR-відповідь – активна реакція клітин на пошкодження ДНК. Незначна кількість пошкоджень активує транскрипцію низки генів репарації ДНК, зокрема *AtRad1*, *AtMsh2*, *AtRAD51*, які прискорюють нормальне проходження реплікації та подолання арешту клітинного циклу. Якщо ж при дозах опромінення, вищих за стимулюючі, у структурі ДНК меристематичних клітин виникають критичні пошкодження, то DDR навпаки блокує клітинний цикл та пригнічує репопуляцію меристем у пострадіаційний період. В цьому випадку ріст та розвиток рослин зупиняється.

Достеменно встановлена участь білка *Rad1* у SOG1-залежній зупинці росту та розвитку рослин (growth arrest) у відповідь на гамма-опромінення. На основі цих даних у розділі 4 ми висловили припущення щодо ролі пострадіаційної активації гена *Rad1* у ATR-опосередкованій зупинці циклу клітин меристем, що призводить

до формування R-фенотипу рослин. При цьому відмінність R-фенотипу від стану growth arrest полягає в тому, що цей фенотип є термінальним і пов'язаний із зупинкою розвитку в онтогенетичному чекпойнті – на стадії пізньої розетки перед початком активації верхівкової бруньки або у період завершення вегетативного росту стебла, який передує переходу до цвітіння, тобто у фазах, коли активність меристеми верхівкової бруньки є низькою.

РОЗДІЛ 6

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведені дослідження показали значну роль змін у конститутивній та індукцйбельній системах репарації ДНК у радіобіологічних реакціях рослин на рівні цілісного організму. Індуковані рідкоіонізуючою радіацією у сублетальних дозах інтервалу 0,2 Гр – 21 Гр модифікації транскрипційної активності ключових генів репарації пошкоджень ДНК *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, які спостерігаються в найближчий після опромінення період, суттєво позначаються на процесах росту та розвитку рослин у середньостроковій та довгостроковій перспективі, включаючи перше покоління нащадків опромінених рослин. При повторюваному опроміненні сублетальними дозами рідкоіонізуючої радіації відмічається тісний зв'язок морфометричних показників опромінених рослин з ранніми змінами експресії генів *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, на відміну від одноразового опромінення, при якому кореляції більшості морфометричних показників з транскрипційною активністю досліджуваних генів статистично недостовірні. Також при фракціонованому опроміненні сильніше виражена пригнічувальна дія радіації на пострадіаційний розвиток рослин дослідного варіанту.

Було виявлено значне (у 1,5 і більше разів) підвищення транскрипційної активності генів *AtRad1* та особливо *AtRAD51* у листках рослин, хронічно опромінених малими дозами γ -радіації (0,2 Гр та 0,3 Гр протягом 35 і 7 діб відповідно). При цьому спостерігались радіобіологічні ефекти, кількісно та якісно співставні з ефектами, що були зафіксовані у рослин арабідопсису, гостро опромінених на порядок більшими дозами. Зазначені факти дають підставу припустити, що висока біологічна ефективність повторюваного та хронічного рідкоіонізуючого опромінення зумовлена впливом ініційованих радіацією змін активності систем репарації ДНК. Причому, оскільки експресія факторів репарації ДНК, як і їх взаємодія, мають вирішальне значення для підтримки стабільності геному рослин, то будь-які модифікації цієї експресії мають довготривалий вплив на меристематичні клітини та тканини, а значить і на життєдіяльність організму

протягом тривалого часу після закінчення дії опромінення. Оскільки модифікація роботи систем репарації ДНК може відбуватись не тільки у соматичних і меристематичних клітинах, але і гаметогенних/статевих клітинах, то вплив генотоксичних факторів, що призводять до структурних пошкоджень ДНК, зокрема іонізуючої радіації, може позначатись принаймні на першому поколінні нащадків організмів, які зазнали генотоксичного впливу. Показано, що підвищена після опромінення у сублетальних дозах активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* може зберігатись у нащадків першого покоління, в той час як індукована активність *AtKu70* – ні. Успадкування підвищеної активності гена *AtRad1* пов'язана із зростанням у першому поколінні нащадків частки рослин, що мають аномалії будови та розвитку.

Щодо характеру впливу іонізуючої радіації на модифікацію активності ключових генів репарації, то їх експресія у різних типах клітин на окремих стадіях розвитку організму може бути як індукцибельною (*AtRAD51*), так і поєднувати риси конститутивної активності з індукцибельною стимуляцією транскрипції (*AtKu70* і *AtRad1*). Причому іонізуюче опромінення може стимулювати або активувати експресію генів репарації при менших сублетальних дозах, а може пригнічувати її при більших сублетальних дозах.

Наскільки відомо з літератури по проблемі репарації ДНК, пригнічення конститутивної транскрипційної активності генів репарації сублетальними дозами радіації досі ще не було описане. Виявлений нами феномен репресії репаративних генів у сукупності з появою вкорочених форм мРНК *AtKu70* та одного з основних генів домашнього господарства *AtEfla* може зумовлювати формування реакції пригнічення росту та розвитку рослин, опромінених певними сублетальними дозами іонізуючої радіації. Поряд із дозою 12 Гр, яка зумовлює зниження експресії генів *AtRAD51* та *AtKu70*, що забезпечують цілісність хроматид і хромосом, в інтервалі сублетальних доз опромінення спостерігаються два локальних максимуми експресії даних генів при дозах 3-6 Гр та 21 Гр відповідно. На наш погляд, це підтверджує гетерогенність рослинних тканин, які складаються з пулу активних радіочутливих клітин та пулу радіостійких клітин, що знаходяться у стані спокою. Перший пік

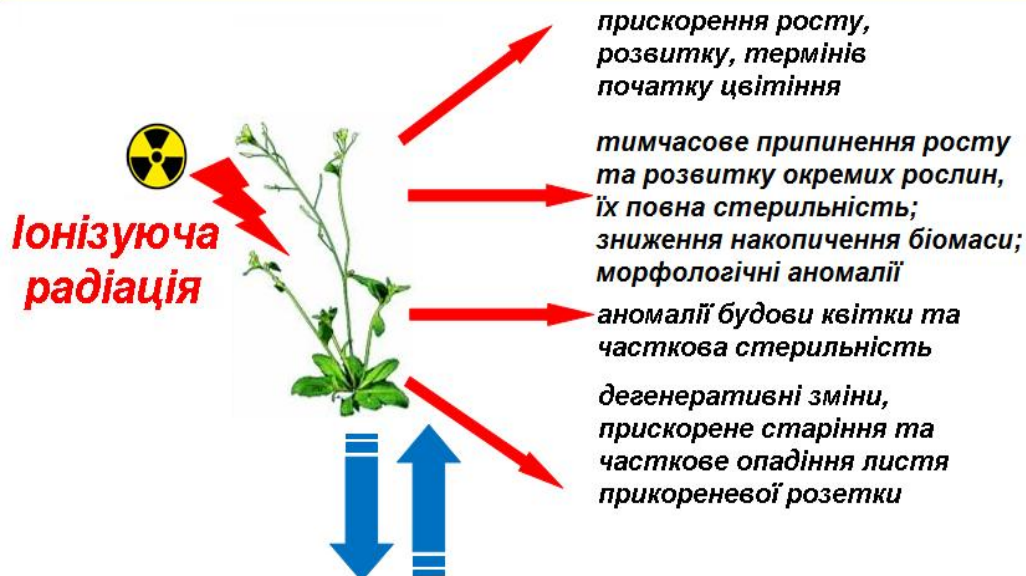
активації генів репарації ДНК відповідає індукції досліджуваних генів під впливом одиничних нерепарованих дволанцюгових розривів ДНК, що виникають в інтервалі доз опромінення 3-6 Гр (див. таблицю 5.10). В цьому ж дозовому інтервалі у 2-2,5 рази знижується транскрипційна активність гена «домашнього господарства» *AtEfl1a*. Більше ніж один нерепарований дволанцюговий розрив ДНК, що припадає на одну радіочутливу клітину після опромінення у дозах 9-15 Гр, інгібує активність генів *AtRAD51* і *AtKu70* у найближчий період після опромінення. Імовірно, що зниження ефективності репарації ДНК при дозах, які індукують в середньому більше ніж один нерепарований ДР ДНК на клітину, призводить до відміченої нами появи видозмінених, можливо, нефункціональних мРНК генів *AtKu70* та *AtEfl1a*. Водночас, радіаційне ураження радіочутливих клітин здатне активувати пул радіостійких клітин, стан спокою яких забезпечується активністю радіочутливих клітин. Тому при дозі 21 Гр спостерігається другий пік активації індукцибельної репарації ДНК. Дана доза приблизно на 6 Гр більше за дозу 15 Гр, яка максимально інгібує експресію генів репарації ДНК у клітинах радіочутливого пулу. Також при вказаній дозі відмічається рівень експресії фактору елонгації трансляції *AtEfl1a*, який властивий неопроміненому листю *A. thaliana*. Оскільки у меристематичних тканинах, як це було показано іншими дослідниками, також існує резервування клітинних потоків за допомогою пулу радіостійких клітин, що знаходяться у стані спокою, можна стверджувати, що перший пік стимуляції на двохпікових дозових залежностях відповідає індукції систем репарації ДНК, а другий – стимуляції меристем внаслідок активації їх клітинного резерву. Проте і в першому, і в другому випадку транскрипція генів репарації ДНК та підтримки стабільності геному є важливим чинником забезпечення повноцінного пострадіаційного відновлення на молекулярному, клітинному, тканинному та організменому рівнях. Узагальнююча схема формування радіобіологічної реакції рослин на іонізуюче опромінення наведена на рис. 6.1.

Поряд з генами *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, задіяними у підтримці структурної цілісності спадкового апарату клітин, у відновленні нормального росту та розвитку рослин після опромінення важливу роль відіграє один з основних ферментів

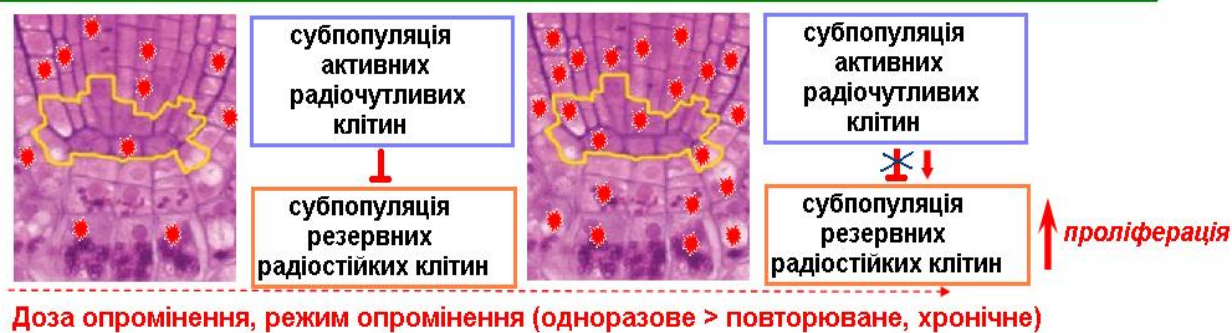
репарації помилково спарених нуклеотидів *AtMSH2*. Нами було показано, що мутанти *Atmsh2*^{-/-} більш чутливі у порівнянні з *Atmsh2*^{+/+} рослинами до дії одноразового, але не повторюваного та хронічного іонізуючого опромінення у сублетальних дозах. Продемонстрована самостійна роль гена *Atmsh2* у пострадіаційній репарації ДНК, а також його взаємодія з генами *AtRad1* та *AtKu70*. Нокаутність рослин арабідопсису за геном *Atmsh2* послаблює інгібуючий вплив підвищеної експресії *AtRad1* на накопичення біомаси (*MSH2* бере участь у *Rad1*-залежному мутагенному шляху репарації ДР ДНК MMEJ; також можлива їх взаємодія в межах сигнально-ефекторної мережі DDR). Водночас підвищена експресія гена *AtKu70* здатна послабити пригнічувальний вплив іонізуючого опромінення на накопичення біомаси рослин з генотипом *Atmsh2*^{-/-}, що свідчить про здатність одних систем репарації ДНК виконувати компенсаторну роль у випадку функціональної недостатності інших систем.

Досить неочікуваним виявився прямо пропорційний зв'язок транскрипційної активності гена репаративної ендонуклеази *AtRad1* з порушеннями морфогенезу, зупинкою розвитку та стерильністю опромінених рослин арабідопсису. Підвищена експресія гена *AtRad1* може бути маркером арешту циклу активних клітин, що призводить до підвищення частки рослин з порушеннями морфогенезу серед нащадків опромінених рослин. Отримані дані вказують на гіпотетичну роль даного гена як учасника системи клітинного добору та онтогенетичного чекпойнту, що дозволяє елімінувати з меристематичних тканин клітини, що містять критичні пошкодження, а з популяції рослин – організми з численними пошкодженнями геному, тим самим зменшуючи генетичний тягар, який неминуче зростає в умовах дії радіації, особливо, якщо мова йде про автономітичні популяції.

ОРГАНІЗМЕННИЙ / ОРГАННИЙ РІВНІ



КЛІТИННИЙ / ТКАНИННИЙ РІВНІ



МОЛЕКУЛЯРНИЙ РІВЕНЬ

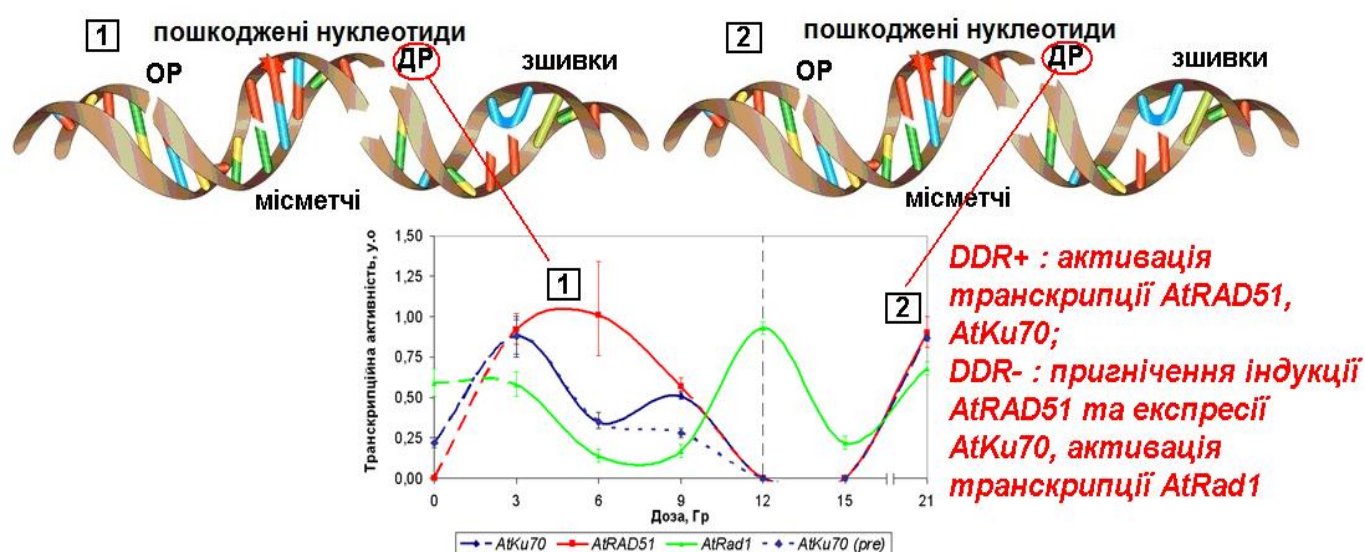


Рис. 6.1. Узагальнююча схема формування радіобіологічної реакції рослин на іонізуюче опромінення у сублетальній дозі

Пояснення до рис. 6.1

Дія іонізуючої радіації має специфічні особливості на кожному рівні організації живого. Водночас, з огляду на те, що всі рівні пов'язані між собою як частини одного цілого, реакція рослини на іонізуюче опромінення має системний та ієрархічний характер (в основі проявів ефектів вищого рівня лежать елементарні події нижчого рівня). Системність радіобіологічних ефектів означає наявність зв'язку не тільки між ефектами організменого/органного рівня та змінами, які відбуваються внаслідок дії радіації на рівні клітин і тканин, а й між рівнем цілісного організму та радіаційним пошкодженням макромолекул на базовому рівні організації живого – молекулярному.

Процеси молекулярного рівня реалізуються у вигляді ефектів організменого рівня опосередковано, завдяки процесам, що відбуваються на клітинному та тканинному рівнях. Проте вказані процеси самі значною мірою визначаються молекулярними взаємодіями, що уможлиблює вивчення зв'язку між викликаними дією іонізуючої радіації реакціями на молекулярному рівні (швидка відповідь) та радіобіологічними ефектами організменого рівня через тривалий час після опромінення (повільна відповідь).

Важливість молекулярного рівня для формування радіобіологічних реакцій визначається ще і тим, що реалізація дії радіації на даному рівні (іонізація, радіоліз, генерація вільних радикалів, пошкодження біологічно важливих молекул, активна біохімічна відповідь сигнально-ефекторних систем клітини) відбувається за проміжок часу не більше хвилин та годин, в той час як формування радіобіологічного ефекту на рівні організму потребує днів, тижнів, місяців, а іноді і років у видів з достатньо великою тривалістю життєвого циклу.

Отже, першим результатом впливу радіації на рослину є зміни на молекулярному рівні організації. Однак наявність мережі горизонтальних зв'язків всередині одного рівня та вертикальних зворотних зв'язків між рівнями зумовлює некоректність опису значення молекулярних процесів для вищих ієрархічних рівнів біологічної організації в термінах жорсткого причинного детермінізму, як це передбачає редуccionістська методологія. З іншого боку, ця ж особливість дозволяє досліджувати зв'язок молекулярного рівня з організмом як корелятивний, що не передбачає попередніх припущень про причину та наслідок.

Відповідно до зазначених методологічних положень механізми, що лежать в основі спостережуваних нами радіобіологічних ефектів дії сублетальних доз радіації на рослини, можна описати наступним чином. Внаслідок індукованих радіацією пошкоджень ДНК виникають прямі та опосередковані (ензиматичні) одноланцюгові (ОР) та дволанцюгові (ДР) розриви ДНК. В свою чергу розриви ДНК запускають сигнальні каскади DDR-відповіді, зокрема, транскрипцію ключових генів репарації ДНК. Модифікація транскрипції генів репарації, що відповідають за підтримку структурної цілісності геному, здійснюється в результаті детекції спеціалізованими білками нерепарованих ДР ДНК. Індукція генів репарації дволанцюгових розривів ДНК відбувається разом із зниженням рівня конститутивної транскрипції у клітині. Для ініціації каскаду реакцій достатньо одного нерепарованого ДР ДНК на геном. Два та більше дволанцюгових розриви затримують або пригнічують

індукцію/стимуляцію транскрипції ключових генів репарації ДР ДНК та є сигналом пошкодження клітини, що, імовірно, призводить до арешту клітинного циклу активно проліферуючих клітин. Пошкоджені клітини у свою чергу виділяють сигнальні речовини, що активують поділ резервних клітин, які перебували у стані спокою.

Таким чином, молекулярні пошкодження визначають реакцію рослин на клітинному та тканинному рівнях організації, а структура тканин – наявність радіочутливої активно проліферуючої та радіостійкої (резервної) субпопуляції клітин – впливає на поклітинний розподіл пошкоджень ДНК. Геном клітин радіостійкої субпопуляції зазнає менше пошкоджень через те, що хроматин у їх ядрах більш компактизований і менш доступний як для прямої дії радіації (через менший розмір мішені), так і для індукованих опроміненням вільних радикалів. Відповідно, при відносно менших сублетальних дозах спостерігається індукція експресії ключових генів відновлення структурних пошкоджень ДНК (перший пік стимуляції експресії генів *AtRAD51* і *AtKu70*), яка пригнічується при більших сублетальних дозах, поряд із активацією транскрипції ендонуклеази *AtRad1* – маркера мутагенної репарації ДР ДНК за механізмом MMEJ та тимчасової зупинки росту й розвитку рослин.

При певній дозі опромінення частка активних клітин, які містять два та більше нерепарованих дволанцюгових пошкодження, досягає критичної величини, що через зняття інгібування поділу резервних клітин стимулює їх проліферацію та заміщення уражених клітин, а також супроводжується індукцією експресії генів ключових репаративних білків у субпопуляції клітинного резерву (другий пік стимуляції експресії *AtRAD51* і *AtKu70*). На органному/організменому рівнях це може призводити як до підвищення темпів росту та розвитку у певний період після опромінення, так і викликати морфологічні аномалії внаслідок порушення просторово-часової зкоординованості клітинних потоків у меристемах. Ще вищі дози іонізуючої радіації призводять до накопичення пошкоджень у геномі клітин резерву, що веде до зростання частки рослин, які гинуть внаслідок опромінення. Такі дози знаходяться близько верхньої межі інтервалу сублетальних доз опромінення. У деяких органах рослин, наприклад у розеткових листках арабідопсису, дані дози радіації можуть викликати програмовану клітинну загибель, деградацію тканин та прискорене старіння, в той час як рослина як організм при цьому, як правило, виживає за рахунок регенерації органів із бруньок, які знаходились у стані спокою (резервування на органному рівні).

У інтервалі сублетальних доз не менше значення ніж експозиційна доза має режим опромінення. Так, фракціонування дози на три рівні фракції з інтервалом у 24 години призводить до менш вираженої стимуляції росту та розвитку при стимулюючих дозах або до інгібування росту, цвітіння та формування стручків. Це відбувається тому, що через репарацію пошкоджень у інтервалі часу між фракціями опромінення з одного боку зменшується частка клітин, які містять принаймні один ДР ДНК, а з іншого, при дозах, що стимулюють проліферацію клітин субпопуляції клітинного резерву, останні зазнають більших пошкоджень, бо 2/3 експозиційної дози припадають на радіочутливу фазу активної проліферації зазначеного пулу клітин.

Суттєве значення для вказаних ефектів має функціональний стан меристем, найбільш активних на ранніх стадіях розвитку рослин та підчас їх переходу від вегетативного до генеративного етапу онтогенезу (відповідно до закону Бергоньє-Трибондо ступінь радіочутливості меристематичних тканин пропорційний їх проліферативній активності).

Отже, основні відмічені на організменому рівні радіобіологічні ефекти дії сублетальних доз іонізуючої радіації на рослини, такі як: прискорення росту, розвитку, ініціації цвітіння, поява морфологічних аномалій, тимчасова зупинка росту та розвитку, зменшення накопичення біомаси, повна або часткова стерильність рослин, прискорене старіння листків, принаймі частково, пов'язані не з прямим впливом радіації, а з радіаційною модифікацією активності ключових генів репарації ДНК, з DDR-відповіддю, що через певний час після опромінення позначається на життєдіяльності клітин та функціональному стані тканин, а згодом визначає характер і ефективність пострадіаційного відтворення рослини як цілісного організму.

На межі інтервалу сублетальних доз (21 Гр), незважаючи на другий пік активації ключових генів репарації ДНК *AtRAD51* і *AtKu70*, відбувається масштабна деградація нуклеїнових кислот у клітинах листків рослин через 30 діб після опромінення, що проявляється у зниженні їх вмісту у тканинах листків більше ніж у 5 разів. У листках опромінених рослин різко зменшується вміст протеїнів та ліпідів, зростає співвідношення бета-структурних і альфа-спіральних доменів білків, руйнується хлорофіл, накопичуються пурпурово-фіолетові пігменти, відбувається заміщення пектину та лігніну целюлозою й геміцелюлозою, акумулюється крохмаль, спостерігається модифікація складу жирних кислот кутину. Це підтверджує гіпотезу щодо ураження радіочутливих клітин як причину другого піку стимуляції при дозах в області верхньої межі інтервалу сублетальних доз рідкоіонізуючої радіації, що пов'язано з активацією резервної субпопуляції радіостійких клітин.

Загалом, результати, отримані в ході виконання дисертаційної роботи, можна поділити на 3 групи за рівнем їх значущості:

1. загальнорадіобіологічні результати –

- доведено безпосередній вплив радіаційної модифікації активності систем репарації ДНК на життєдіяльність цілісного організму після опромінення у сублетальних дозах;

- показано різний вплив одних і тих самих сублетальних доз одноразового та повторюваного опромінення на активність ключових генів репарації ДНК;
- встановлено, що радіаційно модифікована експресія генів систем репарації ДНК *AtRAD51* та *AtRad1* може бути успадкована наступним поколінням неопромінених організмів;

2. результати, які стосуються радіобіології рослин –

- з'ясовано, що маркером радіаційних пошкоджень клітин та DDR відповіді може бути співвідношення активності декількох ключових генів репарації ДНК *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, але не рівень експресії окремо взятого гена;
- виділено та описано R-фенотип, що формується у деяких рослин під дією радіаційного чинника у сублетальних дозах;
- на основі отриманих даних висунута гіпотеза щодо ролі гена *Rad1* як тригера систем клітинного добору та онтогенетичного чекпойнту рослин;
- доведено, що опромінення у сублетальних дозах може не тільки стимулювати, але і пригнічувати транскрипцію генів репарації ДНК, а також призводити до появи вкорочених форм мРНК;
- отримано нові дані на користь існування двох відмінних за радіочутливістю субпопуляцій рослинних клітин, які відіграють різну роль у пострадіаційному відновленні та радіаційній стимуляції, що зумовлює характерну двохпікову залежність «доза-ефект»;
- з'ясована важлива роль гена *AtMsh2* у відновленні радіаційних пошкоджень в інтервалі сублетальних доз іонізуючого опромінення;
- виявлено, що опромінення рідкоіонізуючою радіацією на межі сублетальних доз через тривалий час після опромінення призводить до суттєвих біохімічних змін у головному асимілюючому органі рослин – листку, які пов'язані з деградацією нуклеїнових кислот і ліпідів, зниженням вмісту та зміною конформації білків,

руйнуванням лігнінових волокон, модифікацією складу клітинної стінки, накопиченням крохмалю, деградацією хлорофілу та синтезом пурпурово-фіолетових пігментів, імовірно, антоціанів;

3. *результати, які можуть бути важливими для медичної радіобіології –*

- фракціонування дози опромінення з інтервалом у 24 години є ефективним щодо пригнічення поділу клітин, які швидко діляться;
- виходячи з того, що роль індукцйбельної репарації ДНК є значно вищою при повторюваному опроміненні у порівнянні з одноразовим, доцільно вивчити вплив на ефективність променевої терапії рецидивуючих злоякісних пухлин, що характеризуються наявністю пулу радіостійких клітин (так званих ракових стовбурових клітин), інгібіторів ключових ферментів індукцйбельної репарації ДНК, зокрема інгібіторів RAD51 та Ku70;
- ефект радіаційної модифікації активності генів репарації ДНК у ракових та здорових клітинах слід враховувати як при проведенні променевої терапії, так і при прогнозуванні її віддалених наслідків для пацієнтів, у яких внаслідок лікування досягнута стійка ремісія.

ВИСНОВКИ

Отримані результати дозволили зробити наступні висновки:

1. Дозові залежності ранньої транскрипційної відповіді генів *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1* на дію рідкоіонізуючої радіації у сублетальних дозах носять нелінійний характер та відображають як стимуляцію, так і супресію активності генів репарації ДНК у відповідь на рентгенівське опромінення. В той час як при дозах 3 Гр – 9 Гр має місце підвищена сумарна експресія генів *AtRAD51* та *AtKu70* поряд із зниженою експресією гена *AtRad1*, при дозі опромінення 12 Гр активність генів *AtRAD51* і *AtKu70* репресована, а транскрипція гена *AtRad1* навпаки суттєво підвищена у порівнянні з неопроміненим контролем. Одноразове опромінення при дозі 3 Гр більш ефективно індукує експресію генів *AtRAD51* і *AtKu70* у порівнянні з повторюваним (фракціонованим), але при більш високих дозах 6 Гр – 21 Гр ефективність індукції для режиму повторюваного опромінення в цілому вища, ніж для одноразового. Характер отриманих дозових залежностей ранньої транскрипційної відповіді генів *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1* вказує на наявність у тканинах опромінених рослин двох субпопуляцій клітин – радіочутливої та радіостійкої.

2. Опромінення рослин арабідопсису у сублетальних дозах призводить як до середньо-, так і довгострокових ефектів, серед яких стимуляція росту у довжину, галуження стебла, активація бічних стеблових і квіткових бруньок, кушіння, поява рослин з морфозами та зміненим фенотипом, а також таких рослин, розвиток яких тимчасово зупиняється, стимуляція або пригнічення цвітіння, скорочення або подовження терміну вегетації. Стимулюючий вплив більшою мірою характерний для одноразового опромінення у порівнянні з повторюваним та хронічним.

3. Активність гена *AtKu70* позитивно корелює з приростом рослин та накопиченням біомаси після фракціонованого опромінення, в той час як активність гена *AtRad1* позитивно корелює з затримкою або зупинкою розвитку, порушеннями морфогенезу, стерильністю опромінених рослин. Також встановлена негативна кореляція транскрипції гена *AtRAD51* з виникненням морфологічних аномалій.

4. Наявність або відсутність у геномі арабідопсису функціонуючого гена *Atmsh2* не впливає на ранню транскрипційну відповідь генів *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*. Білок AtMSH2 підвищує стійкість рослин до дії іонізуючого опромінення та, імовірно, взаємодіє з рекомбіназою *AtRAD51* й ендонуклеазою *AtRad1* у процесі пострадіаційного відновлення ДНК *A.thaliana*.

5. Підвищена після опромінення експресія генів *AtRAD51* і *AtRad1* зберігається у поколінні нащадків опромінених рослин F_1 , на відміну від радіаційно модифікованої транскрипції гена *AtKu70*. Індуковані опроміненням зміни активності генів *AtRAD51* і *AtRad1* позначаються на життєздатності та варіативності морфометичних ознак неопромінених рослин, які є нащадками опромінених – активність гена *AtRAD51* сприяє збільшенню схожості та виживаності проростків F_1 , активність *AtRad1* пов'язана із зниженням даних показників.

6. На основі отриманих результатів запропоновано використання підвищеного рівня експресії гена *Rad1* (*UVH1*) в якості маркера радіаційно індукованого арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *Efla* – в якості характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. Показані обмеження застосування транскрипційної активності гена *RAD51* як маркера рівня пошкоджень ДНК у клітинах цілої рослини чи органу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Achard P., Renou J., Berthome R. et al. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species // *Curr. Biol.* – 2008. – 18, №9. – pp. 656–60.
2. Acilan C., Potter D., Saunders W. DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation // *Genes, Chrom. Cancer* – 2007. – 46, № 6. – pp. 522–531.
3. Adachi N., Ishino T., Ishii Y. et al. DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: implications for DNA double-strand break repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – 98, № 21. – pp. 12109–12113.
4. Adams B., Hawkins A., Povirk L. et al. ATM-independent, high-fidelity nonhomologous end joining predominates in human embryonic stem cells // *Aging.* – 2010. – 2, № 9. – pp. 582–596.
5. Ambawat S., Sharma P., Yadav N.R., Yadav R.C. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. // *Physiology and Molecular Biology of Plants.* – 2013. – 19(3). – pp. 307–321. doi: 10.1007/s12298-013-0179-1
6. Ataian Y., Krebs J. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair // *Biochem. Cell Biol.* – 2006. – 84, № 4. – pp. 490–504.
7. Bennardo N., Cheng A., Huang N., Stark J. Alternative–NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair // *PLoS Genetics.* – 2008. – 4, №6. doi:10.1371/journal.pgen.1000110
8. Bennardo N., Gunn A., Cheng A. et al. Limiting the persistence of a chromosome break diminishes its mutagenic potential // *PLoS Genet.* – 2009. – 5, № 10. – pp. e1000683.
9. Besse B. et al. ERCC1 and RRM1: Ready for Prime Time? // *Journal of Clinical Oncology.* – 2013. – Vol. 31, No. 8. – pp. 1050–1060. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2012.43.0900>
10. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work. – New York: UNSCEAR, 2012. http://www.unscear.org/docs/reports/Biological_mechanisms_WP_12-57831.pdf
11. Boboila C., Oksenysh V., Gostissa M. et al. Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – 110, № 14. – pp. 5731–5738.
12. Boubriak I., Akimkina T., Polischuk V., Dmitriev A., McCready S., Grodzinsky D. Long Term Effects of Chernobyl Contamination on DNA Repair Function and Plant Resistance to Different Biotic and Abiotic Stress Factors. // *Cytology and Genetics.* – 2016. – 50(6). – pp. 381–399. <https://doi.org/10.3103/S0095452716060049>
13. Boubriak I., Grodzinsky D., Polischuk V., Naumenko V., Gushcha N., Micheev A., McCready S., Osborne J. Adaptation and Impairment of DNA Repair Function in Pollen of *Betula verrucosa* and Seeds of *Oenothera biennis* from Differently Radionuclide-contaminated Sites of Chernobyl. // *Annals of Botany.* – 2008. – 101. – pp. 267–276. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm276>
14. Bogomazova A., Lagarkova M., Tskhovrebova L. et al. Error-prone nonhomologous end joining repair operates in human pluripotent stem cells during late G2 // *Aging.* – 2011. – 3, № 6. – pp. 584–596.

15. Boulton S., Jackson S. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing // *EMBO J.* – 1998. – 17, № 6. – pp. 1819–1828. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.6.1819>
16. Boyko A., Zemp F., Filkowski J. et al. Double-strand break repair in plants is developmentally regulated // *Plant Physiol.* – 2006. – 141, № 2. – pp. 488–497.
17. Bradford W.D., Cahoon L., Freel S.R., Mays Hoopes L.L., Eckdahl T.T. An Inexpensive Gel Electrophoresis-Based Polymerase Chain Reaction Method for Quantifying mRNA Levels. // *Cell Biology Education.* – 2005. – 4(2). – pp. 157–168. <http://dx.doi.org/10.1187/cbe.04-09-0051>
18. Brady N., Gaymes T., Cheung M. et al. Increased error-prone NHEJ activity in myeloid leukemias is associated with DNA damage at sites that recruit key nonhomologous end-joining Proteins // *Cancer Res.* – 2003. – 63, № 8. – pp. 1798–1805.
19. Britt A. DNA damage and repair in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – 47. – pp. 75–100.
20. Burkhalter M., Roberts S., Havener J. et al. Activity of ribonucleotide reductase helps determine how cells repair DNA double strand breaks // *DNA Repair.* – 2009. – 8, № 11. – pp. 1258–1263.
21. Chahwan R., van Oers J., Avdievich E. et al. The ATPase activity of MLH1 is required to orchestrate DNA double-strand breaks and end processing during class switch recombination // *J. Exp. Med.* – 2012. – 209, № 4. – pp. 671–678.
22. Chapman R., Taylor M., Boulton S. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice // *Mol. Cell.* – 2012. – 47, № 4. – pp. 497–510.
23. Charbonnel C. et al. Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in Arabidopsis. // *DNA repair.* – 2011. – Vol. 10, No 6. – pp. 611–619.
24. Cheng Q., Barboule N., Frit P. et al. Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks // *Nucl. Acids Res.* – 2011. – 39, № 22. – pp. 9605–9619.
25. Chernobyl and New Knowledge about the Impact of Low Doses of Radiation / E. B. Burlakova, A. M. Grodzinsky, K. H. Loganovsky, T. A. Mousseau, A. P. Moller, M. V. Naboka, B. M. Shestopalov // *The Chernobyl Disaster.* – 2016. – New York: Nova Science Publisher's, Inc. – pp. 63–107.
26. Chittela R., Sainis J. Plant DNA recombinases: a long way to go // *J. Nucl. Acids.* – 2010. – P. doi:10.4061/2010/646109
27. Christmann M., Kaina B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. // *Nucleic Acids Research.* – 2013. – Vol. 41, No. 18. – pp. 8403–8420.
28. Ciccia A., Elledge S. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives // *Molecular Cell.* – 2010. – 40. – pp. 179–204.
29. Colquhoun T.A., Schwieterman M.L., Wedde A.E. et al. EOBII Controls Flower Opening by Functioning as a General Transcriptomic Switch. // *Plant Physiology.* – 2011. – 156. – pp. 974–984. doi: 10.1104/pp.111.176248
30. Cominelli E., Sala T., Calvi D., Gusmaroli G., Tonelli C. Over-expression of the Arabidopsis *AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. //

- The Plant Journal. –2008. – 53. – pp. 53-64. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03310.x
31. Crespan E., Czabany T., Maga G. et al. Microhomology-mediated DNA strand annealing and elongation by human DNA polymerases λ and β on normal and repetitive DNA sequences // Nucl. Acids Res. – 2012. – 40, № 12. – pp. 5577–5590.
 32. Danchenko M., Klubicova K., Krivohizha M., Berezhna V., Sakada V., Hajdich M., Rashydov N. Systems biology is an efficient tool for investigation of low-dose chronic irradiation influence on plants in the Chernobyl zone. // Cytology and Genetics. –2016. – 50(6). – pp. 400-414. doi: 10.3103/S0095452716060050
 33. De Zio D., Bordi M., Cecconi F. Oxidative DNA damage in neurons: implication of Ku in neuronal homeostasis and survival // Int. J. Cell Biol. – 2012. doi:10.1155/2012/752420
 34. Decottignies A. Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective // Frontiers in Genetics. – 2013. – 4. – pp. 1–7. doi: 10.3389/fgene.2013.00048
 35. Decottignies A. Capture of extranuclear DNA at fission yeast double-strand breaks // Genetics. – 2005. – 171. – pp. 1535–1548.
 36. Decottignies A. Microhomology-mediated end joining in fission yeast is repressed by Pku70 and relies on genes involved in homologous recombination // Genetics. – 2007. – 176, № 3. – pp. 1403–1415.
 37. Della-Maria J., Zhou Y., Tsai M., Kuhnlein J., Carney J., Paull T., Tomkinson A. Human Mre11/Human Rad50/Nbs1 and DNA Ligase III α /XRCC1 Protein Complexes Act Together in an Alternative Nonhomologous End Joining Pathway // The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – 286, №39. – pp. 33845–33853. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.274159>
 38. Depeiges A., Farget S., Degroote F., Picard G. A new transgene assay to study microsatellite instability in wild-type and mismatch-repair defective plant progenies. // Plant Science. – 2005. – 168. – pp. 939 – 947.
 39. DNA Repair. / Edited by I. Kruman. – Rijeka: InTech, 2011. – 636 p.
 40. Donini B., Sparrow A.H., Schairer L.A., Sparrow R.C. The Relative Biological Efficiency of Gamma Rays and Fission Neutrons in Plant Species with Different Nuclear and Chromosome Volumes // Rad. Research. – 1967. – 32. – pp. 692–705.
 41. Endo M., Mochizuki N., Suzuki T. et al. CRYPTOCHROME2 in vascular bundles regulates flowering in Arabidopsis // Plant Cell. – 2007. – 19, №1. – pp. 84–93.
 42. Fattah F., Lee E., Weisensel N. et al. Ku Regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells // PLoS Genet. – 2010. – 6, № 2. – P. doi:10.1371/journal.pgen.1000855
 43. Fell V., Schild-Poulter C. Ku Regulates Signaling to DNA Damage Response Pathways through the Ku70 von Willebrand A Domain. // Molecular and Cellular Biology. – 2012. – Vol. 32, No. 1. – pp. 76–87.
 44. Ferguson D., Sekiguchi J., Chang S. et al. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2000 – 97, № 12. – pp. 6630–6633.
 45. Focea R., Capraru-Vochita G., Creanga D., Luchian T. Effect of low dose X-rays on plant.

- http://www.bursedoctorale.ro/public/documente/conferinte/1347180040_articol_articol_conf_%20IBWAP_Focea_SD_Fizica_nepublicat.pdf
46. Frankenberg-Schwager M. et al. Single-Strand Annealing, Conservative Homologous Recombination, Nonhomologous DNA End Joining, and the Cell Cycle-Dependent Repair of DNA Double-Strand Breaks Induced by Sparsely or Densely Ionizing Radiation. // *Radiation Research*. – 2009. – Vol. 171, No. 3. – pp. 265–273. <http://dx.doi.org/10.1667/RR0784.1>
 47. Fu B. The Role of DNA Polymerase 4 in homologous recombination // *The UC Davis Undergraduate Res. J.* – 2011. – 14.
 48. Gabrisova D., Klubicova K., Danchenko M., Gomory D., Berezhna V., Skultety L., Miernyk J., Rashydov N., Hajduch M. Do Cupins Have a Function Beyond Being Seed Storage Proteins? // *Front. Plant Sci.* – 2016. – 6. – pp. 1-9. doi: 10.3389/fpls.2015.01215
 49. Gandhi M., Evdokimova V., Cuenco K. et al. Homologous chromosomes make contact at the sites of double-strand breaks in genes in somatic G0/G1-phase human cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2012. – 109, № 24. – pp. 9454–9459.
 50. Grabarz A., Barascu A., Guirouilh-Barbat J. et al. Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining // *Amer. J. Cancer Res.* – 2012. – 2, №3. – pp. 249–268.
 51. Gudkov I., Grodzinsky D. Cell radiosensitivity variation in synchronously-dividing root meristems of *Pisum sativum* L. and *Zea mays* L. during the mitotic cycle. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1982. – Vol. 41, No. 4. – pp. 401–409
 52. Guirouilh-Barbat J., Huck S., Bertrand P. et al. Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells // *Mol. Cell.* – 2004. – 14, № 5. – pp. 611–623.
 53. Guirouilh-Barbat J., Rass E., Plo I., Bertrand P., Lopez B. Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends // *PNAS*. – 2007. – 104, №52. – pp. 20902–20907.
 54. Haber J. Alternative endings // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – 105, № 2. – pp. 405–406.
 55. Hartlerode A., Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells // *Biochem J.* – 2009. – 423. – pp. 157–168.
 56. Heacock M., Spangler E., Riha K. et al. Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: multiple pathways for chromosome end-joining // *EMBO J.* – 2004. – 23, № 11. – pp. 2304–2313.
 57. Hefferin M., Tomkinson A. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining // *DNA Rep.* – 2005. – 4, № 6. – pp. 639–648.
 58. Hiom K. Coping with DNA double strand breaks // *DNA Repair*. – 2010. – 9, № 12. – pp. 1256–1263.
 59. Hogg M., Sauer-Eriksson E., Johansson E. Promiscuous DNA synthesis by human DNA polymerase θ // *Nucl. Acids Res.* – 2012. – 40, № 6. – pp. 2611–2622.
 60. Hsu D.-W. DNA double-strand break repair pathway choice in *Dictyostelium* // *J. Cell Sci.* – 2011. – 124. – pp. 1655–1663.

61. Hwang J.-Y. et al. The Rad1–Rad10 Complex Promotes the Production of Gross Chromosomal Rearrangements From Spontaneous DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. // Genetics. – 2005. – Vol. 169, No. 4. – pp. 1927–1937. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.104.039768>
62. Iliakis G., Wu W., Wang M. et al. Backup pathways of nonhomologous end joining may have a dominant role in the formation of chromosome aberrations // Chromosomal Alterations. – 2007. – pp. 67–85. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71414-9_5
63. Izhar L. et al. Genomic assay reveals tolerance of DNA damage by both translesion DNA synthesis and homology-dependent repair in mammalian cells. // PNAS. – 2013. – Vol. 110, No. 16. – pp. 1462–1469.
64. Jackson S. Sensing and repairing DNA double-strand breaks // Carcinogenesis. – 2002. – 23, №5. – pp. 687–696.
65. Jia Q. DNA repair and gene targeting in plant end-joining mutants: Doctoral thesis, Leiden University. – 2011.
66. Kanungo J. DNA Repair defects and DNA-PK in neurodegeneration // Cell & Developmental Biology. – 2012. – 1, № 2. doi:10.4172/2168-9296.1000e105.
67. Kass E., Jasin M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways // FEBS Lett. – 2010. – 584, № 17. – pp. 3703–3708.
68. Kurimoto T., Constable J.V., Huda A. Effects of ionizing radiation exposure on *Arabidopsis thaliana* // Health Phys. – 2010. – 99, №1. – pp. 49–57.
69. Kwon T., Huq E., Herrin D. Microhomology-mediated and nonhomologous repair of a double-strand break in the chloroplast genome of *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – 107, № 31. – pp. 13954–13959.
70. Lee K., Lee S. *Saccharomyces cerevisiae* Sae2- and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining // Genetics. – 2007. – 176, № 4. – pp. 2003–2014.
71. Lehman J., Hoelz D., Turchi J. DNA-dependent conformational changes in the KU heterodimer // Biochemistry. – 2008. – 47, № 15. – pp. 4359–4368.
72. Li J. et al. Functional Analysis of Maize RAD51 in Meiosis and Double-Strand Break Repair. // Genetics. – 2007. – Vol. 176. – pp. 1469–1482. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.062604>
73. Li P., Li J., Li M. et al. Multiple end joining mechanisms repair a chromosomal DNA break in fission yeast // DNA Repair. – 2011. – 11, № 2. – pp. 120–130.
74. Li X., Heyer W. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance // Cell Res. – 2008. – 18, № 1. – pp. 99–113.
75. Lieber M. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. // Nature Structural & Molecular Biology. – 2010. – Vol. 17. – pp. 393–395. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb0410-393>
76. Lieber M. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway // Annu. Rev. Biochem. – 2010. – 79. – pp. 181–211.
77. Lieber M. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining // J. Biol. Chem. – 2008. – 283, № 1. – pp. 1–5.

78. Lin Y. p53 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair // PLoS Genet. – 2009. – 5, № 10. – p. e1000680.
79. Litvinov S. Effects of chronic exposure of seeds and seedlings of *Arabidopsis thaliana* by low doses of γ -radiation on plant growth and development. // Nuclear Physics and Atomic Energy. – 2014. – Vol. 15, No. 4. – pp. 406–414.
80. Litvinov S.V. The main repair pathways of double-strand breaks in the genomic DNA and interactions between them. // Cytology and Genetics. – 2014. – Vol. 48, No. 3. – pp. 64–77.
81. Litvinov S., Rashydov N. The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes to X-rays. // Journal of Agricultural Science and Technology A. – 2017. – 7 (1). – pp. 52–60. doi: 10.17265/2161-6256/2017.01.008
82. Litvinov S., Rashydov N. Transgenerational Transmission of Radiation-Induced Expression Patterns of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Rad51* and *Rad1* Genes. // International Journal of Secondary Metabolite. – 2018. – Vol. 5, No. 2. – pp. 149–155.
83. Lloyd A., Wang D., Timmis J. Single molecule PCR reveals similar patterns of non-homologous DSB repair in *Tobacco* and *Arabidopsis* // PLoS ONE. – 2012. – 7, № 2. – p. e32255.
84. Loser D. Investigating the mechanisms by which PARP inhibitors increase sensitivity to DNA damaging agents: Doctoral thesis. – University of Sussex, 2009.
85. Low doses of ionizing radiation: biological effects and regulatory control. Contributed papers. – Vienna: IAEA, 1997. – 696 p.
86. Ma J.-L. et al. Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. // Molecular and Cellular Biology. – 2003. – Vol. 23, No. 23. – pp. 8820–8828. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.23.8820-8828.2003>
87. Ma W. et al. Homologous recombination rescues ssDNA/gaps generated by nucleotide excision repair and reduced translesion DNA synthesis in yeast G2 cells. // PNAS. – 2013. – Vol. 110, No. 31. – pp. 2895–2904. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1301676110>
88. Mahaney B., Meek K., Lees-Miller S. Repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks by non-homologous end-joining // Biochem. J. – 2009. 417, № 3. – pp. 639–650.
89. Majka J., Alford B., Ausio J. et al. ATP hydrolysis by RAD50 switches MRE11 from an endonuclease to an exonuclease // J. Biol. Chem. – 2012. – 287, № 4. – pp. 2328–2341.
90. Makhnii T., Ilchenko O., Reynt A., Pilgun Y., Kutsyk A., Krasnenkov D., Ivasyuk M., Kukharskyy V. Age-related changes in FTIR and Raman spectra of human blood. // Ukr. J. Phys. – 2016. – 61 (10). – pp. 853–862. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ukjournph_2016_61_10_3
91. Malla B. Biological effects of low dose radiation from the cobalt-60 source at As, Norway, and of natural background radiation at the thorium-rich area in Telemark, Norway: studies with the model plant *Arabidopsis thaliana*: Master thesis. – Norwegian University of Life Sciences, 2012.

92. Mannuss A. et al. Gene regulation in response to DNA damage // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1819. – pp. 154–165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaggm.2011.08.003>
93. Mannuss A., Dukowic-Schulze S., Suer S. et al. RAD5A, RECQ4A, and MUS81 have specific functions in homologous recombination and define different pathways of DNA repair in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. – 2010. – 22, № 10. – pp. 3318–3330.
94. Manova V. Processing of DNA double strand breaks by alternative non-homologous end-joining in hyperacetylated chromatin // *Genome Integrity*. – 2012. – 3, № 4. – doi:10.1186/2041-9414-3-4.
95. Mansour W., Rhein T., Dahm-Daphi J. The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies // *Nucleic Acids Research*. – 2010. – 38, № 18. – P. 6065–6077.
96. Marcand S., Pardo B., Gratias A. et al. Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres // *Genes Dev*. – 2008. – 22, № 9. – pp. 1153–1158.
97. Mazurek S., Mucciolo A., Humbel B., Nawrath C. Transmission Fourier transform infrared microspectroscopy allows simultaneous assessment of cutin and cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis* petals. // *The Plant Journal*. – 2013. – 74. – pp. 880–891. doi: 10.1111/tpj.12164
98. McVey M., Lee S.E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. // *Trends in Genetics*. – 2008. – Vol. 24., No. 11. – pp. 529–538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.08.007>
99. McVey M., Radut D., Sekelsky J. End-Joining Repair of Double-Strand Breaks in *Drosophila melanogaster* Is Largely DNA Ligase IV Independent // *Genetics*. – 2004. – 168. – pp. 2067–2076.
100. Meulle A., Salles B., le Daviaud D. et al. Positive regulation of DNA double strand break repair activity during differentiation of long life span cells: the example of adipogenesis // *PLoS ONE*. – 2008. – 3, № 10. – p. e3345.
101. Mills K., Ferguson D., Alt F. The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis // *Immun. Rev*. – 2003. – 194. – pp. 77–95.
102. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N. et al. ROS signaling: the new wave? // *Trends Plant Sci*. – 2011. – 16, № 6. – pp. 300–309.
103. Mladenov E., Iliakis G. DNA Repair – On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors / Edited by Dr. Francesca Storici. – InTech, 2011. – pp. 143–168. <http://www.intechopen.com/books/dna-repair-on-the-pathways-to-fixing-dna-damage-and-errors/the-pathways-of-double-strand-break-repair>
104. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. // *Applied Spectroscopy Reviews*. – 2008. – 43. – pp. 134–179. doi: 10.1080/05704920701551530
105. Oksenych V., Alt F., Kumar V. et al. Functional redundancy between repair factor XLF and damage response mediator 53BP1 in V(D)J recombination and DNA repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Early Edition*. – 2012. – 109, № 7. – pp. 2455–2460.
106. Orii K., Lee Y., Kondo N. et al. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous

- system development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – 103, № 26.– pp. 10017–10022.
107. Pardo B., Gómez-González B., Aguilera A. DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship // Cell. Mol. Life Science. – 2009. – 66. – pp. 1039–1056.
 108. Paull T. Making the best of the loose ends: Mre11/Rad50 complexes and Sae2 promote DNA double-strand break resection // DNA Repair (Amst). – 2010. – 9, №12. – pp. 1283–1291.
 109. Perromat A., Melin A.-M., Lorin C., Deleris G. Fourier Transform IR Spectroscopic Appraisal of Radiation Damage in *Micrococcus luteus*. // Biopolymers. – 2003. – 72. – pp. 207-216. doi: 10.1002/bip.10381
 110. Peterson S., Li Y., Chait B. et al. Cdk1 uncouples CtIP-dependent resection and Rad51 filament formation during M-phase double-strand break repair // J. Cell Biol. – 2011. – 194, № 5. – pp. 705–720.
 111. Pierce A., Hu P., Han M. et al. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells // Genes Dev. – 2001. – 15, № 24. – pp. 3237–3242.
 112. Prudden J., Evans J., Hussey S. et al. Pathway utilization in response to a site-specific DNA double-strand break in fission yeast // EMBO J. – 2003. – 22, № 6. – pp. 1419–1430.
 113. Quennet V., Beucher A., Barton O. et al. CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1 // Nucl. Acids Res. – 2011. – 39, № 6. – pp. 2144–2152.
 114. Raffaele S., Vailleau F., A. Léger et al. A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis. // The Plant Cell. – 2008. – 20. – pp. 752–767. doi: 10.1105/tpc.107.054858
 115. Rahal E., Henricksen L., Li Y. et al. ATM regulates Mre11-dependent DNA end-degradation and microhomology-mediated end joining // Cell Cycle. – 2010. – 9, № 14. – pp. 2866–2877.
 116. Rai R., Zheng H., He H. et al. The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres // EMBO J. – 2010. – 29, № 15. – pp. 2598–2610.
 117. Rasydov N., Kliuchnikov O., Seniuk O. et al. Radiobiological Characterization Environment Around Object "Shelter" // Nuclear Power Plant / by edit. Soon Heung Chang, 2012. – pp. 231–279.
 118. Riha K., Watson M., Parkey J. et al. Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in *Arabidopsis* mutants deficient in Ku70 // EMBO J. – 2002. – 21, № 11. – pp. 2819–2826.
 119. Roberts S., Strande N., Burkhalter M. et al. Ku is a 5'dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends // Nature. – 2010. – 464. – pp. 1214–1217.
 120. Rosidi B., Wang M., Wu W. et al. Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ // Nucl. Acids Res. – 2008. – 36, № 5. – pp. 1610–1623.

121. Rothkamm K., Krüger I., Thompson L. et al. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – 23, № 16. – pp. 5706–5715.
122. Roy S. Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. // *Plant signaling & Behaviour.* – 2016. – 11(1). – pp. 1-7. doi: 10.1080/15592324.2015.1117723
123. Schär P., Fäsi M., Jessberger R. SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways // *Nucl. Acids Res.* – 2004. – 32, № 13. – pp. 3921–3929.
124. Schild D., Wiese C. Overexpressed of RAD51 suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability. // *Nucleic Acids Research.* – 2010. – Vol. 38, No. 4. – pp. 1061–1070.
125. Schulz H., Baranska M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. // *Vibrational Spectroscopy.* – 2007. – 43. – pp. 13-25. doi: 10.1016/j.vibspec.2006.06.001
126. Schwartz M., Zlotorynski E., Goldberg M. et al. Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability // *Genes Dev.* – 2005. – 19. – pp. 2715–2726.
127. Scuric Z. et al. Ionizing Radiation Induces Microhomology-Mediated End Joining in trans in Yeast and Mammalian Cells. // *Radiation Research.* – 2009. – Vol. 171, No. 4. – pp. 454–463. <http://dx.doi.org/10.1667/RR1329.1>
128. Shahi A., Lee J., Kang Y. et al. Mismatch-repair protein MSH6 is associated with Ku70 and regulates DNA double-strand break repair // *Nucl. Acids Res.* – 2011. – 39, № 6. – pp. 2130–2143.
129. Shibata A., Conrad S., Birraux J. et al. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase // *EMBO J.* – 2011. – 30, № 6. – pp. 1079–1092.
130. Shrivastav M., De Haro L., Nickoloff J. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice // *Cell Res.* – 2008. – 18, № 1. – pp. 134–147.
131. Sidler C. Development-Dependent Expression of DNA Repair Genes and Epigenetic Regulators in Arabidopsis Plants Exposed to Ionizing Radiation // *Radiation Research.* – 2015. – Vol. 183. – pp. 219–232.
132. Simsek D., Brunet E., Wong S. et al. DNA Ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation // *PLoS Genet.* – 2011. – 7, № 6. – pp. 1–11.
133. Singh S., Roy S., Choudhury S. et al. DNA repair and recombination in higher plants: insights from comparative genomics of arabidopsis and rice // *BMC Genomics.* – 2010. – 11. doi:10.1186/1471-2164-11-443
134. Sokal R. Introduction to Biostatistics / by edit. R. Sokal and J. Rohlf. New York: Dover Publications, 2009. – 365 p.
135. Summers K., Shen F., Sierra Potchanant E. et al. Phosphorylation: the molecular switch of double-strand break repair // *Int. J. Proteomics.* – 2011. doi:10.1155/2011/373816
136. Suzuki J., Yamaguchi K., Kajikawa M. et al. Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition // *PLoS Genet.* – 2009. – 5, № 4. doi:10.1371/journal.pgen.1000461

137. Suzuki K., Takahashi M., Oka Y. et al. Requirement of ATM-dependent pathway for the repair of a subset of DNA double strand breaks created by restriction endonucleases // *Genome Integrity*. – 2010. – 1, № 4. doi:10.1186/2041-9414-1-4
138. Takata M., Sasaki M., Sonoda E. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells // *EMBO J*. – 1998. – 17, № 18. – pp. 5497–5508.
139. Tamaki S., Matsuo S., Wong H.L. et al. Hd3a Protein Is a Mobile Flowering Signal in Rice // *Science*. – 2007. – 316. – P. 1033–1036.
140. Taylor E., Cecillon S., Bonis A. et al. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex functions in resection-based DNA end joining in *Xenopus laevis* // *Nucl. Acids Res*. – 2010. – 38, № 2. – pp. 441–454.
141. Tichy E., Pillai R., Deng L. et al. Mouse embryonic stem cells, but not somatic cells, predominantly use homologous recombination to repair double-strand DNA breaks // *Stem Cells Dev*. – 2010. – 19, № 11. – pp. 1699–1711.
142. Ting N., Yu Y., Pohorelic B. et al. Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase // *Nucl. Acids Res*. – 2005. – 33, №7. – pp. 2090–2098.
143. Tuteja N., Singh M., Misra M. et al. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. // *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol*. – 2001. – 36 (4). – pp. 337–397.
144. Uehara Y. et al. Absence of *Ku70* Gene Obliterates X-Ray-Induced lacZ Mutagenesis of Small Deletions in Mouse Tissues. // *Radiation Research*. – 2008. – Vol. 170, No. 2. – pp. 216–223
145. Vanholme R., Storme V., Vanholme B. et al. A Systems Biology View of Responses to Lignin Biosynthesis Perturbations in Arabidopsis. // *The Plant Cell*. – 2012. – 24. – pp. 3506–3529. doi: 10.1105/tpc.112.102574
146. Vannier J.-B. et al. ERCC1/XPF Protects Short Telomeres from Homologous Recombination in *Arabidopsis thaliana*. // *PLoS Genetics*. – 2009. – Vol. 5., Iss. 2. – p. e1000380. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000380>
147. Vonarx E. The repair and tolerance of DNA Damage in higher plants: Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy, Deakin University, – 2000.
148. Wang B. BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail // *Cell & Bioscience*. – 2012. – 2, №6. doi:10.1186/2045-3701-2-6
149. Wang H., Perrault A., Takeda Y. et al. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ // *Nucl. Acids Res*. – 2003. – 31, № 18. – pp. 5377–5388.
150. Wang H., Rosidi B., Perrault R. et al. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining // *Cancer Res*. – 2005. – 65, №10. – pp. 4020–4030.
151. Wang H., Shao Z., Shi L. et al. CtIP dimerization is critical for its recruitment to chromosomal DNA double-strand breaks // *J. Biol. Chem*. – 2012. – 287, № 25. – pp. 21471–21480.

152. Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – 34, №21. – pp. 6170–6182.
153. Waterworth W. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together // *New Phytologist*. – 2011. – Vol. 192, No. 4. – pp. 805–822. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x>
154. Watson M., Shippen D. Telomere rapid deletion regulates telomere length in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – 27, № 5. – pp. 1706–1715.
155. Wei Z., Dong L., Tian Z.H. Fourier transform infrared spectrometry study on early stage of cadmium stress in clover leaves. // *Pak. J. Bot.* – 2009. – 41(4). – pp. 1743-1750. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41\(4\)/PJB41\(4\)1743.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41(4)/PJB41(4)1743.pdf)
156. Weinstock D., Jasin M. Alternative pathways for the repair of RAG-induced DNA breaks// *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – 26, № 1. – pp. 131–139.
157. Wilson R., Smith A., Kačuráková M., Saunders P., Wellner N., Waldorn K. The Mechanical Properties and Molecular Dynamics of Plant Cell Wall Polysaccharides Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. // *Plant Physiology*. – 2000. – 124. – pp. 397-405. doi: 10.1104/pp.124.1.397
158. Windhofer F., Wu W., Iliakis G. Low Levels of DNA Ligases III and IV Sufficient for Effective NHEJ // *Journal of cellular physiology*. – 2007. – 213. – pp. 475–483.
159. Wu X., Wilson T., Lieber M. A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining: The order of strand annealing and nucleolytic processing events // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – 96, № 4. – pp. 1303–1308.
160. Xu F., Yu J., Tesso T., Dowell F., Wang D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. // *Applied Energy*. – 2013. – 104. – pp. 801-809. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.12.019
161. Yamauchi M., Suzuki K., Oka Y. et al. Mode of ATM-dependent suppression of chromosome translocation // *Biochemi. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – 416, № 1-2. – pp. 111–118.
162. Yang J., Xu Z.-P., Huang Y. et al. ATM and ATR: sensing DNA damage // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – 10, № 2. – pp. 155–160.
163. Yano K., Morotomi-Yano K., Adachi N. et al. Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the non-homologous end-joining pathway // *J. Radiat. Res.* – 2009. – 50, № 2. – pp. 97–108.
164. Yokota Y. et al. Comparative Radiation Tolerance Based on the Induction of DNA Double-Strand Breaks in Tobacco BY-2 Cells and CHO-K1 Cells Irradiated with Gamma Rays. // *Radiation Research*. – 2005. – Vol. 163, No. 5. – pp. 520–525
165. Yoshiyama K.O. et al. DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals. // *Biology*. – 2013. – Vol. 2, Iss. 4. – pp. 1338–1356. <http://dx.doi.org/10.3390/biology2041338>
166. Yu A., McVey M. Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions // *Nucleic Acids Research*. – 2010. – 38, № 17. – pp. 5706–5717.

167. Yun M., Hiom K. CtlP-BRCA1 modulates the choice of DNA doublestrand-break repair pathway throughout the cell cycle // *Nature*. – 2009. – 459. – pp. 460–463.
168. Zhang Y. et al. Involvement of Nucleotide Excision and Mismatch Repair Mechanisms in Double Strand Break Repair. // *Current Genomics*. – 2009. – Vol. 10, No. 4. – pp. 250–258. <http://dx.doi.org/10.2174/138920209788488544>
169. Zhao X., Sheng F., Li X., Chen G. Fourier transform-infrared studies on the effects of salt and drought stress on the chemical composition and protein conformation changes in *Arabidopsis* leaves. // *Sciences in Cold and Arid Regions*. – 2009. – 1(4). – pp. 341-347. doi: 10.1104/pp.004325
170. Белоусова Е., Лаврик О. ДНК полимеразы бета и альфа и их роль в репликации и репарации ДНК // *Молекуляр. биология*. – 2010. – 44, № 6. – С. 947–965.
171. Бурлакова Е.Б. Сверхмалые дозы – большая загадка природы // *Экология и жизнь*. – 2000. – №2. – С.38–42.
172. Васильев И. Действие ионизирующих излучений на растения. Радиобиологические исследования. – М.: Издательство Академии наук СССР, 1962. – 222 с.
173. Гродзинский Д.М. Адаптивная стратегия физиологических процессов растений. – Київ: Наукова думка, 2013. – 301 с.
174. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений: монография / Отв. ред. И.Н.Гудков. – Киев: Наукова думка, 1989. – 384 с.
175. Гродзинский Д.М., Коломиец К.Д., Гудков И.Н., Голубкова М.Г., Булах А.А., Кутлахмедов Ю.А., Дмитриев А.П., Гуца И.Н., Сержант И.А. Формы пострadiационного восстановления растений. – К.:Наукова думка, 1980.–188 с.
176. Гродзинский Д.М., Коломиец К.Д., Гудков И.Н., Кутлахмедов Ю.А., Булах А.А. Формирование радиобиологической реакции растений. К.: Наукова думка, 1984. – 216 с.
177. Гродзинський Д.М., Гуца М.І., Дмитрієв О.П., Коломієць О.Д., Кравець О.А., Кравець О.П., Кутлахмедов Ю.О., Куцоконь Н.К., Міхєєв О.М., Пчеловська С.А., Рашидов Н.М., Шиліна Ю.В. Радіобіологічні ефекти хронічного опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи: монографія. – К.: Наукова думка, 2008. – 373 с.
178. Иванов В.И., Лысцов В.Н. Основы микродозиметрии. – М.: Атомиздат, 1979. – С. 105.
179. Ковалёва О. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // *Цитология и генетика*. – 2008. – № 1. – С. 58–72.
180. Козлов А. А. К проблеме «малых доз» в радиобиологии // *Радиобиология*. – 1988. – 28, №3. – С.424–426.
181. Количественный анализ экспрессии генов. / Под общ. ред. Е.В.Ермиловой. – СПб: Тесса, 2011. – 121 с.
182. Коломієць О.Д. Геномна нестабільність і віддалені ефекти хронічного та гострого опромінення рослин // Радіобіологічні ефекти хронічного опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи: монографія / Д.М.Гродзинський, М.І.Гуца, О.П.Дмитрієв, О.Д.Коломієць, О.А.Кравець,

- О.П.Кравець, Ю.О.Кутлахмедов, Н.К.Куцоконь, О.М.Міхєєв, С.А.Пчеловська, Н.М.Рашидов, Ю.В.Шиліна. – Київ.: Наукова думка, 2008. – С.33 – 62.
183. Котловая Н. Активация репарации и чекпойнт-контроля двунитевыми разрывами ДНК. Каскад активационного фосфорилирования белков // Препринт Объединённого института ядерных исследований. – Дубна, 2007. <http://www1.jinr.ru/Preprints/2007/132%28P19–2007–132%29.pdf>
 184. Кравець О.А. Асиметрія органогенезу, що індукується впливом факторів середовища // Радіобіологічні ефекти хронічного опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи: монографія / Д.М.Гродзинський, М.І.Гуща, О.П.Дмитрієв, О.Д.Коломієць, О.А.Кравець, О.П.Кравець, Ю.О.Кутлахмедов, Н.К.Куцоконь, О.М.Міхєєв, С.А.Пчеловська, Н.М.Рашидов, Ю.В.Шиліна. – Київ.: Наукова думка, 2008. – С.191– 213.
 185. Кравець О.П., Літвінов С.В., Рашидов Н.М., Соколова Д.О. Розвиток захисних реакцій за умов дії гострого опромінення. // Епігенетичні фактори адаптації рослин: монографія. – К.: ПАЛИВОДА А.В., 2018. – 284 с.
 186. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Основы радиационной биофизики. – М.: Издательство МГУ, 1982. – 304 с.
 187. Литвинов С.В. Влияние хронического облучения семян и проростков *Arabidopsis thaliana* малыми дозами γ -радиации на рост и развитие растений. // Ядерна фізика та енергетика. – 2015. – Т. 15, № 4. – С. 406-414.
 188. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Изменение параметров морфогенеза *Arabidopsis thaliana* L. при хроническом облучении семян и проростков малыми дозами редкоионизирующей радиации. // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2016. – Т. 18. – С. 51-55.
 189. Літвінов С. В., Кривохижа М. В., Кухарський В. М., Рашидов Н. М. Зміни непігментних сполук у листках опромінених рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія.– 2018. – № 2 (73). – С. 157-164.
 190. Літвінов С. В., Рашидов Н. М. Відносна радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708* у діапазоні сублетальних доз опромінення радіацією.// Ядерна фізика та енергетика. – 2018. – Т.19, №2. – С.145-149. <https://doi.org/10.15407/jnpae2018.02.145>
 191. Літвінов С.В. Кривохижа М.В., Кухарський В.М., Рашидов Н.М. Пострадіаційні зміни біохімічного складу нефотосинтезуючих структур листя рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // "Радіоекологія-2017". Збірник статей Науково-практичної конференції із міжнародною участю, м. Київ, 24-26 квітня 2017 року.– Житомир: Вид-во ЕЦ «Укрекобіокон», 2017. – С.168-172.
 192. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Відносна радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708* у діапазоні сублетальних доз опромінення радіацією. // Ядерна фізика та енергетика. – 2018. – Т.19, №2. – С. 145-149.
 193. Надёжность биологических систем: Сборник научных трудов. – К.: Наукова думка, 1985. – 224 с.
 194. Надёжность и гомеостаз биологических систем: Сборник научных трудов.

- К.: Наукова думка, 1987. – 192 с.
195. Надёжность и элементарные события процессов старения биологических объектов: Сборник научных трудов. – К.: Наукова думка, 1986. – 208 с.
 196. Николаева М.Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Издательство «Наука», 1985. – 347 с.
 197. Парадигми сучасної радіобіології / Д.М. Гродзинський // Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля: наук.-техн. зб. – 2005. – Вип. 3, ч. 2. – С. 9-16.
 198. Радіаційний гормезис – ретроспектива і сучасність / Д.М. Гродзинський, Ю.В. Шиліна, О.М. Міхєєв, М.І. Гуца // Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля: наук.-техн. зб. – 2005. – Вип. 3, ч. 2. – С. 17-28.
 199. Савин В.Н. Действие ионизирующего излучения на целостный растительный организм. – М.: Энергоиздат, 1981. – 120 с.
 200. Семенова Е., Филатов М., Штам Т., Варфоломеева Е. Влияние уровня экспрессии RAD51–рекомбиназы на выживаемость и прохождение фаз цикла клетками человека // Цитология. – 2008. – № 11. – С. 959–963.
 201. Тимофеев-Ресовский Н.В., Савич А.В., Шальнов М.И. Введение в молекулярную радиобиологию (физико-химические основы). – М.: Медицина, 1981. – 320 с.
 202. Шиліна Ю. В. Радіобіологічні властивості реакції надчутливості у рослин: Дис. канд. біол. наук: 03.00.01 / НАН України. – К., 1999. – 184 с.