

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

На правах рукопису

СОКОЛОВА Дарина Олександрівна

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

**ЕПІГЕНЕТИЧНА КОМПОНЕНТА РАДІОАДАПТАЦІЇ ЗА УМОВ
ХРОНІЧНОГО ТА ГОСТРОГО ОПРОМІНЕННЯ РОСЛИН**

03.00.01 – радіобіологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
Кравець Олександра Петрівна
доктор біологічних наук
провідний науковий співробітник

Київ – 2015

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
ГЛАВА 1. Явище радіоадаптації як складової зберезувальних процесів біологічних систем. Огляд літератури.....	10
1.1. Феноменологія адаптивних процесів.....	10
1.1.1. Історія відкриття явища радіоадаптації.....	10
1.1.2. Критерії та тест-системи у вивченні радіоадаптивних процесів....	11
1.1.3. Класифікація різних видів адаптації.....	13
1.1.4. Залежність адаптації та радіоадаптації від дози і тривалості дії фактора.....	15
1.1.4.1. Радіоадаптація за умов гострого опромінення.....	16
1.1.4.2. Формування адаптивної реакції за умов хронічного опромінення.....	17
1.2. Механізми формування радіаційної адаптивної відповіді.....	19
1.2.1. Роль репаративних систем у формуванні радіаційної адаптивної відповіді.....	21
1.2.2. Участь активних форм кисню та антиоксидантних систем у формуванні радіаційної адаптивної відповіді.....	27
1.2.3. Роль неспецифічних та специфічних метаболічних перебудов у формуванні радіаційної адаптивної відповіді.....	29
1.3. Механізми епігенетичної регуляції.....	32
1.3.1. Рівні організації експресії генів.....	33
1.3.1.1. Модифікації гістонів та їх роль в експресії генів еукаріот.....	34
1.3.1.2. Роль РНК-інтерференції в організації експресії генів.....	37
1.3.1.3. Роль білків групи Polysom b в регуляції експресії генів.....	39
1.3.2. Роль метилування ДНК в епігенетичній регуляції.....	39
1.3.2.1. Особливості метилування ДНК рослин і участь цього процесу в епігенетичній регуляції.....	42
1.3.2.2. ДНК-метилтрансферази рослин.....	45
1.3.3. Метилування ДНК і нестабільність геному.....	49

1.4.	Регуляція експресії генів та метилування ДНК при дії стресових факторів.....	50
1.4.1.	Зміна рівня метилування при дії різних стресових факторів.....	51
1.4.2.	Напрямки змін у метилуванні ДНК при хронічному та гострому опроміненні.....	52
1.4.3.	Явища адаптації та метилування ДНК. Здобутки та напрямки подальших досліджень.....	55
ГЛАВА 2. Матеріали та методи досліджень.....		61
2.1.	Характеристика гібридів кукурудзи, використаних у роботі.....	61
2.2.	Режими опромінення та методи проведення досліджень.....	66
ГЛАВА 3. Зв'язок змін профілів метилування ДНК з радіостійкістю умов гострого фракціонованого опромінення рослини.....		75
3.1.	Оцінка мітотичного індексу та частоти хромосомних аберацій.....	75
3.2.	Статистичний аналіз взаємозв'язку частоти цитогенетичних аномалій та мітотичного індексу за умов фракціонованого опромінення.....	80
3.3.	Вплив гострого фракціонованого УФ-С-опромінення на зміну профілю метилування функціонально різних послідовностей ДНК.....	83
ГЛАВА 4. Адаптивна відповідь за умов гострого, хронічного та комбінованого опромінення.....		90
4.1.	Оцінка мітотичного індексу та частоти нестабільних хромосомних аберацій.....	91
4.2.	Статистичний аналіз взаємозв'язку частоти цитогенетичних аномалій та мітотичного індексу проростків кукурудзи, одержаних з попередньо хронічно гамма-опроміненого та неопроміненого насіння.....	93
4.3.	Метилування ДНК при адаптивній відповіді на гостре УФ-С-опромінення проростків кукурудзи, одержаних з неопроміненого та попередньо хронічно гамма-опроміненого насіння	95

4.4. Кореляційний аналіз взаємозв'язку змін у частоті хромосомних аберацій та варіювання профілей метилування ДНК.....	101
ГЛАВА 5. Зв'язок радіостійкості рослин з вихідним поліморфізмом профілів метилування ДНК.....	109
5.1. Цитогенетичні характеристики проростків з насіння, що проростає з різною швидкістю.....	109
5.2. Вплив гострого фракціонованого УФ-С-опромінення на зміну профілю метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків з різних епігенетичних груп.....	112
ГЛАВА 6. Зв'язок адаптивної відповіді рослин з вихідним поліморфізмом профілів метилування ДНК.....	118
6.1. Цитогенетичний аналіз формування адаптивної відповіді у епігенетично різних груп рослин.....	118
6.2. Зміни профілю метилування сателітної та ДНК, що транскрибується при формуванні адаптивної відповіді у епігенетично різних груп рослин.....	119
6.3. Статистичний аналіз взаємозв'язку змін профілів метилування різних послідовностей ДНК та частоти хромосомних аберацій.....	125
ЗАКЛЮЧЕННЯ. Положення, що виносяться на захист.....	131
ВИСНОВКИ.....	135
ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	137

ВСТУП

Актуальність теми. Використання різних джерел опромінення в техніці, сільськогосподарській практиці, медичних дослідженнях та лікуванні, функціонування підприємств ядерного паливного циклу та радіаційні аварії обумовлюють підвищення радіаційного навантаження на організми та екосистеми. У зв'язку з цим дослідження радіоадаптації як ключової проблеми збереження біосфери знаходиться в центрі уваги медичних та біологічних дисциплін. З моменту відкриття цього явища у другій половині минулого століття у дріжджів [322], рослин [325], тварин [28] та бактерій [344], у вивченні даного феномену можна виділити декілька галузей, які включають феноменологічне дослідження доз і режимів опромінення [287, 289, 307, 328], ролі репаративних процесів у становленні радіоадаптації [289, 299, 300, 344, 352], участі систем антиоксидантного захисту клітини та неспецифічних перебудов метаболізму [19, 49, 64, 324, 332]. На сьогодні найбільша увага надається оцінці співвідношення конститутивних та індукційних механізмів, тобто переключенню епігенетичних програм в становленні адаптивної відповіді клітини і організму. Виявлено існування багаторівневої системи регуляції експресії генів, що об'єднує механізми метилування ДНК, модифікації гістонів, РНК-інтерференцію та участь певних груп білків у нуклеосомній організації хроматину та його ремоделюванні [1, 22, 95, 167, 203, 204, 360], що є ключовими процесами як у експресії генів, так і у визначенні доступності ДНК для збірки на її послідовностях білкових комплексів репарації. Метилування ДНК є багатофункціональним процесом, що бере участь як у розвитку негативних явищ (малігнізація, активізація мобільних елементів), так і захисних процесів при дії різноманітних стресорів, включаючи опромінення [3, 132-134, 142, 325]. Дослідження ролі метилування ДНК в радіобіологічних реакціях обмежено виявленням лише основних тенденцій. Показано, що гостре опромінення викликає загальне деметилування ДНК, хронічне - обумовлює гіперметилування, яке розглядається як адаптивна реакція [124, 133]. Лишаються невідомими ключові питання, що відносяться до ролі метилування як складової епігенетичної

регуляції у формуванні радіоадаптації. В першу чергу - це зв'язок адаптивних ефектів за різних режимів опромінення зі змінами метилування функціонально різних послідовностей ДНК, тобто ДНК, яка транскрибується та сателітних її послідовностей, що може обумовлювати різні механізми адаптації. По друге, суттєвим є питання про динамічний зв'язок змін метилування ДНК з формуванням адаптивної реакції, що у цілісному організмі включає процеси з різним часом індукції і розвитку. Не менш важливою є оцінка впливу вихідного характеру метилування ДНК на подальший розвиток радіобіологічної реакції, оскільки цей фактор впливає як на стан ДНК – мішені радіаційного ураження, так і на її доступність факторам репарації і транскрипції.

Вирішенням цього кола питань було присвячено дослідження, результати якого виносяться на захист.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась з 2010 по 2014 роки у відділі біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом д.б.н. Кравець О.П. в межах бюджетних тем: «Епігеномна складова адаптації у рослин» (№ 0108U000875, 2008-2012 р.р.); III-4-13 «Роль епігеномних механізмів в адаптогенезі рослин» (2012-2016 р.р.); II-3-12 «Розробка способів скерованого впливу на сигнальні системи і епігенетичну пластичність культурних рослин для підвищення їх продуктивності та стійкості» (2012-2016 р.р.).

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження є виявлення ролі метилування ДНК як складової епігенетичної регуляції радіоадаптації рослин до іонізуючого та УФ-С випромінювань.

Для реалізації поставленої мети в роботі вирішували такі завдання:

1. Дослідити участь процесів метилування сателітної та ДНК, що транскрибується, як складових епігенетичної регуляції при формуванні радіоадаптивної реакції.
2. Виявити залежність переходу від підтримуючого метилування до метилування ДНК *de novo* від проміжку часу між послідовними сеансами

гострого УФ-С опромінення та дослідити вплив збільшення цього інтервалу на прояви адаптивної реакції і зміни профілів метилування.

3. Виявити особливості метилування *de novo* функціонально різних послідовностей ДНК при формуванні радіоадаптивної реакції за різних режимів опромінення: «адаптивне - ударне», хронічне, комбіноване опромінення;

4. Дослідити зв'язок активності проростання насіння із станом метилування обох форм ДНК, радіочутливістю та радіостійкістю проростків.

5. Оцінити зв'язок адаптивного потенціалу рослини із вихідним станом метилування обох функціональних форм ДНК.

6. Дослідити щільність статистичного зв'язку між змінами профілів метилування ДНК та радіорезистентності рослин за показником частоти хромосомних аберацій за різних режимів опромінення.

Об'єкт дослідження – роль процесів метилування ДНК в регуляції адаптації рослин до опромінення.

Предмет дослідження – зміни метилування сателітної ДНК кукурудзи і ДНК, що транскрибується, під впливом різних режимів опромінення і їх зв'язок зі змінами радіочутливості та радіостійкості за показником частоти хромосомних аберацій.

Методи дослідження: біометричні (визначення швидкості проростання насіння), фізіологічні і радіометричні (дослідження радіобіологічних характеристик гібридів кукурудзи), цитогенетичні (оцінка мітотичного індексу та виходу хромосомних аберацій), молекулярно-біологічні (виділення ДНК, рестрикційний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція для дослідження зміни профіля метилування), стандартні методи статистичного аналізу, включаючи кореляційний аналіз по Браве-Пірсону та рангову кореляцію по Спірмену.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показано, що при формуванні радіоадаптивної реакції змінюються профілі метилування як сателітної, так і ДНК, що транскрибується. Зміни профілів відбуваються за рахунок деметилування існуючих і метилування нових сайтів, що свідчить про перехід від підтримуючого до метилування *de novo* обох функціональних форм

ДНК. Встановлено, що переключення метилування ДНК у режим *de novo* відбувається при перевищенні інтервалу між послідовними фракціями УФ-С-опромінення одна година. При збільшенні інтервалу відбуваються подальші зміни профілів метилування і ступеню адаптивної реакції, що свідчить про зв'язок цих ефектів з реалізацією різних за часом розвитку епігенетичних механізмів. Виявлені відмінності у характері перебудов профілів метилування при формуванні радіоадаптивних реакцій за різних режимів опромінення.

Вперше встановлено зв'язок різної швидкості проростання насіння довільної вибірки з вихідним поліморфізмом профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків та їх радіостійкістю, що дозволяє розглядати характер метилування ДНК як фактор індивідуальної радіостійкості організму. Показано, що адаптивний потенціал рослинного організму пов'язаний з активністю процесу проростання та вихідним станом метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків, а адаптивні можливості популяції рослин - з поліморфізмом профілів метилування ДНК.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати щодо існування поліморфізму метилування функціонально різних послідовностей ДНК і зв'язку цього явища із різною стійкістю та адаптивним потенціалом рослин запропоновано використовувати в селекційній практиці. Подальші дослідження цього питання на різних сортах пшениці призвели до розробки і впровадження маркеру епігенетичного поліморфізму, значення якого пов'язано із виробничою надійністю сорту.

Особистий внесок здобувача полягає в самостійному аналізі літератури за темою дисертації, оволодінні необхідними методами досліджень, плануванні і проведенні експериментів, аналізі та обробці результатів, підготовці до друку наукових робіт. Вибір об'єкту і напрямку досліджень проведено спільно з науковим керівником – д.б.н. Кравець О.П. Результати дисертаційної роботи отримані автором самостійно або спільно зі співробітниками ІКБГІ НАН України, які є співавторами публікацій. Особистий внесок дисертанта становить понад 75%.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові результати були представлені на Міжнародній конференції з радіації та дозиметрії в різних напрямках досліджень «RAD 2012» (Ніш, Сербія, 2012 р.), Молодіжній науковій конференції “Шевченківська весна” Київського Національного Університету ім. Т. Шевченка (Київ, Україна, 2012 р.), XII Молодіжній науковій конференції «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» Інституту сільськогосподарської біотехнології РАСХН (Москва, Росія, 2012 р.), Міждисциплінарній науковій конференції «Адаптивні стратегії живих систем» (Крим, Україна, 2012 р.), конференції – конкурсі молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2012” Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Київ, Україна, 2012 р.), XIX щорічній науковій конференції Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, Україна, 2012 р.), XXI щорічній науковій конференції Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, Україна, 2014 р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Радіоекологія - 2014» (Київ, Україна, 2014 р.), науковій конференції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України та НТУУ Київського Політехнічного Інституту «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2015 р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Радіоекологія - 2015» (Київ, Україна, 2015 р.), семінарі Київського біофізичного товариства Інституту теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова НАН України «Актуальні проблеми фізики ДНК» (Київ, Україна, 2015 р.), а також доповідались на звітних та наукових семінарах відділу біофізики та радіобіології ІКБГІ НАН України.

Публікації. Основні матеріали дисертації опубліковано у 20 працях, із них 6 статей у провідних фахових виданнях, 3 з яких – в іноземних журналах.

Обсяг та структура роботи. Дисертаційна робота викладена на 183 сторінках друкованого тексту (основного тексту 136 сторінок) й містить 32 рисунки і 11 таблиць. Робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 4 глав, у яких наведено результати досліджень, висновків, списку використаної літератури (364 найменування), з яких 282 англomовних.

ГЛАВА 1

ЯВИЩЕ РАДІОАДАПТАЦІЇ ЯК СКЛАДОВОЇ ЗБЕРЕЖУВАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Феноменологія адаптивних процесів

Дослідження розвитку реакції організмів на тривалі та повторні впливи знаходиться в центрі уваги багатьох медичних та біологічних дисциплін. В радіобіології це питання широко досліджується у лабораторних умовах при вивченні ефектів фракціонованого опромінення і адаптивної відповіді, та на біологічних об'єктах в зонах природних або антропогенних радіонуклідних аномалій. Незважаючи на вагомий експериментальний матеріал, отриманий в цих дослідженнях, системні механізми зміни радіочутливості – як її зниження (радіоадаптації), так і зростання (сенсibiliзації) залишаються маловивченими.

1.1.1. Історія відкриття явища радіоадаптації

Явище радіоадаптації було виявлене вже в перших радіобіологічних дослідженнях 20 століття, але початок систематичного вивчення цього феномену може датуватися 1971 роком, коли Куліковим та ін. [327] було виявлено на рослинах, що хронічно опромінювалися у зоні Кіштимської аварії. У 1976 році Бредфордом [28] на тваринах і 1977 року Самсоном та Каїрнсом на бактеріях [344] було помічено явище адаптації до гострого іонізуючого опромінення. З моменту відкриття цю реакцію вивчали з різних точок зору – з феноменологічної, встановлюючи дозові закономірності, розвиток і збереження у часі, а також механізми її індукції та формування.

На початку 60-х років В. Л. Корогодіним був проведений ряд експериментів з приводу хронічного опромінення дріжджових клітин за різних потужностей доз і температур. Було встановлено, що процеси відновлення відбуваються не лише

після, але й під час опромінення. В подальших експериментах, В. Л. Корогодін і М. О. Зюзіков намагалися виявити, чим зумовлене явище радіоадаптації, коли внаслідок малих доз хронічного опромінення підвищується радіорезистентність клітин та організмів, що супроводжується порушеннями імунної системи, і прийшли до висновку, що в основі даного феномену лежать ушкодження масових структур клітин, які активують, як вони припускали, репараційні системи і, внаслідок цього відбувається відновлення масових чи унікальних структур клітин від пошкоджень [289, 322].

У 1984 році Олівері встановив, що низькі концентрації радіоактивного тимідину в лімфоцитах людини індукують подальше підвищення резистентності до дії більших доз [28, 180].

На сьогодні внесок праць по радіоадаптації становить не менше 20-30 % статей у фахових виданнях. Продовжується як вивчення загальних закономірностей, так і наближення до розуміння механізмів цих явищ на різних біологічних об'єктах з використанням всього арсеналу сучасних молекулярно-біологічних методів.

1.1.2. Критерії та тест-системи у вивченні радіоадаптивних процесів

Явище радіоадаптації полягає в підвищенні радіостійкості організму у відповідь на попереднє гостре або хронічне опромінення в малій дозі. Цей стан оцінюють за різними критеріями – виживаністю організмів чи клітин, частотою хромосомних аберацій, частотою виникнення точкових мутацій, утворенням мікроядер, здатністю до утворення колоній клітин у культурі, інтенсивністю репарації ДНК від одно- та двониткових розривів [157]. Внаслідок адаптації підвищується рівень [33] та порядок репарації деяких пошкоджень ДНК [32], знижується частота радіаційно-індукованих та спонтанних непластичних трансформацій у клітинах гризунів [9, 10, 259, 260] та людини [199, 272, 353]. Адаптація проявляється при дії рідкоіонізуючого (Х-промені, гамма-опромінення

та бета-частинки) [8, 169, 171, 180, 219] та щільноіонізуючого (нейтрони та альфа-частинки) випромінювання [83, 213].

Радіоадаптивну відповідь вивчали на дріжджах та інших одноклітинних організмах [25], комах [214] та рибах [140], клітинних лініях людини [33, 195, 222], кролях та коровах [77], лабораторних гризунах [9, 160, 212, 270] на хромосомному та клітинному рівнях [62, 63, 131, 212, 253]. Ранні дослідження на різноманітних організмах [153, 357] та більш сучасні на мишах [169] підтвердили дані закономірності і для цілісного організму. Висловлюється думка, що цей феномен не є радіаційно-специфічним, а є складовою загальної відповіді організму на стрес [25]. Явище так званої крос-адаптації спостерігали між впливом радіації та металів [96], хімікатів [26, 168] і гіпертермії [162, 249].

Найчастіше про адаптивну відповідь судять за частотою хромосомних аберацій або за утворенням мікроядер [220]. Мікроядерний аналіз використовувався Б. А. Улшем та С. М. Міллером для оцінки адаптивної відповіді на фібробластах трьох видів парнокопитних тварин, опромінених високими (1-4 Гр γ -опромінення ^{60}Co) та низькими дозами (1-100 мГр), схожими на дози від природного радіаційного фону; виявилось, що малі дози є захисними при подальшій дії високих [249].

Протягом багатьох років і до сьогодні головною гіпотезою, що пояснює формування радіоадаптації, була гіпотеза індукції та активації систем репарації ДНК після опромінення в малих дозах. Доведено, що для формування адаптивної відповіді необхідна активація полі-АДФ-рибозополімерази, синтез цілого переліку білків та активація певних груп генів, пов'язаних з репарацією ДНК та стресовою реакцією клітин. Також вчені залучають до цього процесу індукцію систем антиоксидантного захисту та гальмування клітинного циклу (що збільшує час для репарації). Велике значення в індукції адаптивної відповіді відіграють сигнальні шляхи: цитокіни, кластерини, активація протеїнкінази С. Прояв адаптивної відповіді залежить від потужності дози, часу між опроміненнями, генетичних особливостей організму, фази клітинного циклу в якій відбувається опромінення, тощо.

Сучасна радіобіологія оперує обширними даними про конститутивні та індукційні механізми захисту та відновлення біологічних систем від радіаційних впливів, але потенціал кожного з них та взаємозв'язок у формуванні пострадіаційної системної відповіді залишається малодослідженим.

Проблема нелінійності відповідей біологічних об'єктів на дію іонізуючого опромінення в низькодозовому діапазоні вивчається доволі давно. Для пояснення даного феномену створено безліч моделей, в яких розглядаються ефекти іонізуючого впливу на ДНК (хроматин) окремих клітин, або на рівні адаптаційної гіпотези, в якій аналізуються проблеми гомеостазу цілого організму. Поліфакторність механізмів фізіологічної адаптації до іонізуючого опромінення, співставленість інтенсивності дії різнонаправлених факторів може призвести до послідовного підвищення та зниження частоти цитогенетичних аномалій на фоні відносно постійного рівня дії пошкоджуючого агента у генетично однорідних об'єктів [291].

1.1.3. Класифікація різних видів адаптації

Оскільки метаболічна активність організмів залежить від ферментів та нуклеїнових кислот, процеси адаптації мають призводити до такого стану макромолекул, коли життєві процеси організму проходять задовільно, не зважаючи на негативні впливи навколишнього середовища. П. Хочачка та Дж. Сомеро виділили три загальні стратегії адаптації: зміна типу макромолекул в тій чи іншій системі організму; зміна кількості чи концентрації макромолекул; регуляція функцій макромолекул. За допомогою одного з цих стратегічних механізмів чи певної їх комбінації організм досягає векторного гомеостазу метаболічних функцій. Фраза «векторний гомеостаз» підкреслює те, що в процесі адаптації до зовнішнього середовища як швидкості, так і напрямки метаболічних реакцій «налагоджені» таким чином, щоб організм безперервно отримував необхідні йому продукти [363].

Існує уявлення про три основні часові форми біохімічної адаптації [363]. По-перше, це так звана негайна адаптація, заснована на особливостях, закладених в самих метаболічних ланцюгах, як системах з від'ємними зворотніми зв'язками, яка можливо використовує конститутивну їх частину. По відношенню до радіаційного впливу, це може бути зростання активності функціонування антиоксидантних та конститутивної частини репаративних систем ДНК. Саме ці ефекти добре досліджені на даний час під назвою адаптивної відповіді, характеристичні часи якої займають хвилини чи кілька годин. Наступним етапом в часовій ієрархії є те, що називається акклімацією чи акліматизацією і потребує часу, що дорівнює тривалості життя індивіда. І найповільніша форма – це еволюційна адаптація, яка є найбільш тривалим процесом пристосування до факторів (фактору). Цей процес самоорганізації пов'язаний з виникненням нової генетичної інформації, яка детермінує нові адаптивні фенотипічні ознаки, потребує багатьох поколінь і може бути віднесена до мікроеволюційних процесів. Виявлені ефекти радіаційно-індукованої геномної нестабільності, пов'язані в значному ступені з найважливішим механізмом еволюції геному – активізацією мобільної ДНК, можуть розглядатися як створення початкових умов для нового витка самоорганізації, виникнення нової генетичної інформації і, відповідно, нових механізмів збереження. Згадана фенотипічна класифікація адаптивних процесів була запропонована більше двох десятиліть тому і з точки зору сучасних уявлень може бути доповнена свідченнями про епігенетичну регуляцію – вибір епігеному, заснований на конкуренції між продуктами окремих локусів та алелей, коли зміна чутливості призводить до переключення метаболізму через зміни профілей метилування ДНК. Тоді другу за швидкістю форму адаптації можна було б віднести до епігенетичної.

З вище сказаного випливає, що в кожній живій системі існує три групи механізмів збереження, які взаємодіють між собою. На першому рівні – механізми захисту і репарації, що забезпечують «швидкі» зміни радіочутливості та дозових залежностей різних біологічних процесів. На другому – «середні» за часом реалізації, епігенетичні компоненти адаптації зі зміною епігеному системи.

Суть епігенетичної компоненти – в забезпеченні нової епігенетичної програми організму, формування нового, більш ефективного першого рівня захисту – тобто «негайної» адаптації. У випадку виснаження ресурсів цих двох вже існуючих класів захисних та пристосувальних реакцій, зберігається радіаційно-індукована нестабільність геному, що зумовлює різні форми загибелі організму, або, з меншою вірогідністю, слугує основою для еволюції геному. Такий грубий якісний опис суті взаємодії різнорівневих механізмів, задіяних у формуванні реакції біосистем на пролонговані впливи, потребує кількісного уточнення «характеристичних» доз та часів реалізації їх конкретних складових.

1.1.4. Залежність адаптації та радіоадаптації від дози та тривалості дії фактора

Незважаючи на тривалі дослідження ефектів гострого і пролонгованого опромінення з низькою інтенсивністю, досі не вдається коректно спрогнозувати наслідки цього виду впливів на організми. А знання повної якісної картини ефектів гострого і пролонгованого радіаційного впливу і кількісних параметрів їх дозових та часових залежностей необхідне для розуміння та прийняття адекватних рішень з цілого переліку теоретичних і практичних питань. Знання принципових механізмів самоорганізації захисних та адаптивних реакцій живих організмів необхідне для вирішення практичних задач нормування та оцінки ризиків хронічних довготривалих радіаційних впливів на людину і біоту та забезпечення стійкого розвитку біосфери.

З теоретичної точки зору дуже важливим є питання, чи є складні в динамічному відношенні залежності ефектів гострого і хронічного опромінення відображенням паралельного чи послідовного «увімкнення» певних збережувальних механізмів та виснаження їх потенціалу, і чи є можливим у випадку пролонгованих впливів виникнення нових механізмів захисту і відновлення, іншими словами – увімкнення процесів самоорганізації та еволюційних перетворень.

1.1.4.1. Радіоадаптація за умов гострого опромінення

Біологічними та медичними науками добре досліджені реакції на разовий вплив іонізуючого опромінення та особливості перехідного процесу, що розвивається після такого впливу. Цей перехідний процес описується так званою гомеостатичною кривою [328]. Вона має складну форму і складається з трьох фаз. Перша – нисхідна, що відображає переважання процесів розвитку пошкодження, переходить в фазу відновлення і формування нового стаціонарного рівня, до того ж вихід на цей рівень відбувається шляхом затухаючих коливань навколо певного нового стаціонарного рівня, що дорівнює чи є меншим вихідного значення досліджуваної змінної.

Часові характеристики окремих фаз різні і визначаються швидкістю досліджуваних процесів, їх характеристичними термінами. Може відбутися і так, що вибравши неадекватний час повторних оцінок значень досліджуваних параметрів, «перескочивши» перші дві фази розвитку перехідного процесу, можна потрапити на максимум коливальної кінетики і зробити висновок про гормезисну реакцію, швидку стимуляцію під впливом тієї чи іншої дози фактору. Ця особливість перехідного процесу в складно організованих біологічних системах за умови разових впливів є причиною неточностей в інтерпретації багатьох радіаційних ефектів.

Відомо, що коливальна кінетика є типовою для систем з від'ємним зворотнім зв'язком і свідчить про «запізнення» в ланцюгах зворотних зв'язків і, внаслідок цього, перерегулюванням роботи відновлюваних процесів. Таке явище добре досліджене для технічних та живих систем за умов одноразової дії «обурення» процесів організму дією стресових факторів. Слід очікувати, що вигляд гомеостатичної кривої з одним чітко вираженим песимумом та серією затухаючих коливань у висхідній її частині буде значно видозмінений для умов постійно діючого стресового фактору.

1.1.4.2. Формування адаптивної реакції за умов хронічного опромінення

Дослідження формування адаптивної відповіді при хронічному опроміненні в роботі [307] показало певні протиріччя в оцінках направленості реакції на хронічне опромінення, що може бути пов'язане не лише з різною потужністю дози, функціональним станом опромінюваного організму, але і з динамічною складністю процесу зміни радіочутливості, проходженням різних стадій, що відрізняються навіть знаком реакції.

Відомо, що складний, багатофазний характер дозових залежностей був пояснений в роботах [48, 151, 152, 286, 287] як результат взаємодії кількох таких дозових залежностей – розвитку пошкодження, індукції захисних та відновлюваних процесів. Висока ефективність малих доз цим же автором пояснюється відсутністю на перших етапах впливу «увімкнення» процесів захисту та відновлення. Ефекти хронічного опромінення з низькою інтенсивністю – найчастіше нерегулярний і коливальний тип залежності [342, 343, 346, 348-351]. Ці динамічні особливості реакцій на хронічне опромінення одночасно визначаються особливостями дозової залежності, що залежить від тривалості накопичення дози та часу, потрібного для увімкнення захисних та відновлюваних реакцій [220, 317, 336]. Таким чином, при проведенні дослідження навіть на одній експериментальній системі, але в різний час розвитку перехідного процесу, можна потрапити в різні за направленістю фази його розвитку.

Аналіз літературних джерел [348-351, 363] дозволив виділити 4 типи динамічних реакцій на хронічне опромінення:

1. Ранній прояв та монотонне зростання негативної реакції на хронічне опромінення. Такий тип реакції спостерігається в деяких результатах цитогенетичних досліджень та при виході явищ ембріонального дисгенезу;
2. Ранній прояв гормезисної реакції, що переходить у зростання негативного ефекту та виснаження компенсаторних можливостей організму;

3. Прояв негативної реакції на перших етапах впливу, що переходить в адаптивну відповідь;

4. Найбільш складний в динамічному відношенні тип відповіді – коливальна реакція з трендом як в бік адаптації при більш низькій інтенсивності опромінення, так і в бік дезадаптації за більш високої його потужності.

Пояснення складної картини залежностей динамічних ефектів хронічного опромінення є складною задачею. Узагальнення наявних даних про адаптивні (чи дезадаптивні) зміни показує існування широкого діапазону як в часі індукції цієї реакції, так і збереження змін (підвищення) радіочутливості в часі [284].

Складний, багатофазний характер дозових залежностей був пояснений в роботах О. Б. Бурлакової [289, 290] як результат взаємодії, взаємонакладання кількох дозових залежностей різних процесів – розвитку пошкодження, індукції різних за характеристичними часами захисних та відновлюваних механізмів. Висока ефективність малих доз цим же автором пояснюється відсутністю на перших етапах впливу «увімкнення» механізмів захисту та відновлення. У зв'язку з цим, ефекти хронічного опромінення з низькою інтенсивністю мають нерегулярний чи коливальний тип залежності. І. К. Коломийцева пояснює динамічні особливості реакцій на хронічне опромінення певною часовою розгорткою включення захисних та відновлюваних реакцій, що одночасно відповідають процесу накопичення дози [320]. Це дозволяє запропонувати існування взаємодії різних за молекулярними механізмами та характеристичними термінами формування стратегій зміни (зростання) радіорезистентності окремих процесів, які складають системну радіаційну відповідь організму [321].

Багатофазне розгортання у часі реакцій на хронічне опромінення дозволяє пояснити певні протиріччя в оцінці не лише інтенсивності, але знаку ефекту і часу його прояву. Спостерігаючи ефект в різний час після початку опромінення, дослідник може потрапити в різні фази розвитку процесу та зробити невірні висновки щодо його направленості. Складний характер перехідного процесу, що виникає в цьому випадку, створює значні труднощі в практиці визначення ризиків хронічних впливів [305, 306, 316, 335].

Динаміка зміни, характер кумуляції біологічних ефектів у відповідь на хронічне опромінення демонструє дуже високу ефективність даного впливу. Ефективність хронічного опромінення може на порядок і більше перевищувати ефективність гострого. Суттєво і те, що кумулятивні ефекти мають немонотонну динаміку виходу. Їх часові та дозові залежності мають складну багатofазну структуру і можуть об'єднувати фазу гормезисної реакції, зростання негативного ефекту, його зниження, адаптацію та/чи її відсутність. Характеристичні терміни динамічних цитогенетичних ефектів можуть охоплювати життя кількох поколінь, тобто мати трансгенераційний характер [283, 302, 303, 318, 329].

1.2. Механізми формування радіаційної адаптивної відповіді

Результати досліджень впливу іонізуючих випромінювань в малих дозах на живі об'єкти після Чорнобильської катастрофи поглибили наше розуміння шляхів розвитку пострадіаційних процесів в організмі, але дискусії щодо кількісного порогу дози радіації для визначення ризиків для здоров'я ще тривають. Лінійна безпорогова модель була прийнята в якості основного стандарту радіаційного захисту та оцінки ризиків протягом багатьох років, і постулює лінійну залежність від дози багатьох біологічних ефектів, вважаючи, що пошкодження, індуковані дією радіації в малих дозах, не роблять суттєвого внеску у підвищення ризику, так як в клітинах постійно виникає і відновлюється значна кількість ендегенних (спонтанних) пошкоджень геному. Але аналіз даних багатьох досліджень дозволяє вважати, що кількість пошкоджень ДНК, індукованих іонізуючим випромінюванням, лінійно зростає із дозою, а реакція клітин на такі пошкодження, ефективність репарації найбільш критичних, може мати нелінійний характер [300].

Відомо, що в індукції адаптивної відповіді задіяні різні механізми: репарація ДНК, системи антиоксидантного захисту, утворення активних форм кисню в клітині та зміна метаболічних шляхів в окисно-відновних процесах. Результати багатьох досліджень дозволяють зробити висновок, що більша частина

пошкоджень, які виникають в ДНК клітин після впливу іонізуючого опромінення, суттєво відрізняються за хімічною природою від ендогенних пошкоджень. Важливою характеристикою радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК є їх складність та кластеризація [300] і вони розглядаються як критичні пошкодження для подальшої долі клітини [76, 256, 263, 299]. З появою критичних пошкоджень ДНК, в клітинах відбувається швидкий розвиток складної розгалуженої системи молекулярно-біохімічних реакцій – клітинна відповідь на пошкодження ДНК, індукція якої пов'язана з активацією систем контрольних точок клітинного циклу, репарації ДНК, зміною експресії великої кількості генів, реконструкцією хроматину чи апоптозом клітин [47, 52, 77, 121, 223, 259, 264]. Разом з тим, ефективність репарації ДНК від складних пошкоджень в клітинах після впливу радіації в малих дозах лишається на низькому рівні, а розвиток клітинної відповіді при дії радіації в малих дозах не досягає необхідного результату через малу кількість пошкоджень, а прогресія клітин фазами циклу випереджає процеси репарації.

Це, в першу чергу, зумовлене недостатністю сигналізації, що запускає активацію систем контрольних точок клітинного циклу для його блокування, а репараційні системи не встигають завершити процес відновлення ДНК і клітини переходять до стадії мітозу з пошкодженою ДНК. Іншою причиною низької ефективності репарації ДНК в клітинах після впливу іонізуючого випромінювання в малих дозах, є наявність обмежень для доступу компонентів систем репарації до складних пошкоджень на ділянках ДНК, що упакована в компактизований хроматин.

Гіпотеза індукцибельної ДНК-репараційної SOS-відповіді в клітинах *Escherichia coli* була розроблена більш ніж 35 років тому [259] і пояснює механізми репарації таких пошкоджень, які не можуть бути відновлені іншими відомими механізмами і призводять до зупинки циклу і смерті клітини. Такі схожі системи було знайдено у всіх досліджених видів бактерій та еукаріот [20]. Отже, ці системи репарації можуть бути віднесені не до індукцибельних систем захисту, а до конститутивних. Те ж саме стосується і системи антиоксидантного захисту і

рівня активних форм кисню, адже в нормі вони також присутні в клітині і регулюють шляхи метаболізму. Тобто нема чіткої межі між конститутивним та індукцибельним захистом клітини від зовнішніх впливів, і взагалі, можливо активація саме конститутивної системи призводить до певних епігенетичних перебудов, що дозволяють клітині швидко адаптуватися і вижити саме за цих умов, тим самим підвищуючи резистентність її нащадків.

1.2.1. Роль репаративних систем у формуванні радіаційної адаптивної відповіді

Ендогенні пошкодження ДНК постійно виникають в клітині. Так, за даними Ліндаля [146, 147], в ДНК однієї клітини протягом доби може виникати 50000 одониткових розривів, 10000 ділянок без азотистих основ – апуринових та апіримідинових сайтів, 2000 окислювальних пошкоджень, 5000 алкілованих пошкоджень, 10 двониткових розривів та 10 міжниткових поперекових зшивок. Ці пошкодження в ДНК виникають в результаті гідролітичних реакцій, впливу активних форм кисню та інших реактивних метаболітів [24, 146, 147].

Активні форми кисню викликають в ДНК модифікацію основ, одониткові розриви, АП-сайти і двониткові розриви, а також пошкодження ліпідів та інших молекул. При цьому продукти окиснення ліпідів: малондіальдегід, кротон альдегід та інші, можуть взаємодіяти з ДНК із утворенням міжниткових поперекових зшивок.

Ендогенні гідролітичні пошкодження ДНК в клітині виникають за рахунок нестабільності глікозидного зв'язку між основами та дезоксирибозою та його розриву внаслідок дії ферментів ДНК-N-глікозилаз, що призводить до виникнення АП-сайтів.

Найбільш критичними пошкодженнями ДНК для клітини є двониткові розриви та міжниткові поперекові зшивки, причиною яких може бути не лише вплив активних форм кисню, але і запрограмовані перебудови геному, такі як мейотичні рекомбінації, вкорочення теломер в процесах транскрипції, реплікації

та випадкової дії ферментів метаболізму ДНК [144]. Накопичення таких ендогенних пошкоджень в ДНК не відбувається через постійне функціонування систем репарації, переважно ексцизійної [30, 76].

Іонізуюче випромінювання також викликає безліч пошкоджень ДНК різної хімічної природи в результаті безпосередньої іонізації молекул ДНК, чи опосередковано – при утворенні вільних радикалів – продуктів радіолізу води та інших внутрішньоклітинних сполук. В результаті, в клітинній ДНК виникають різноманітні пошкодження: модифікації основ, АП-сайти, ДНК-білкові зшивки, двониткові розриви, міжпоперекові зшивки, деструкція реплікативної виделки, тощо. Біологічна ефективність однакової кількості індукованих радіацією пошкоджень значно вища, ніж ендогенних, навіть спричинених сильними окисниками. Встановлено, що кількість кластерних (індукованих) пошкоджень ДНК та їх складність зростає зі збільшенням ЛВЕ випромінювання [91, 241]. Для іонізуючого випромінювання з низьким ЛВЕ кластеризація відбувається переважно на малих ділянках молекул ДНК та нуклеосом в складі хроматину, наприклад гамма-випромінювання викликає утворення двониткових розривів, 30% яких властиве кластерне формування з мінімум одним пошкодженням в безпосередній близькості від кінця розриву. Радіація з високим ЛВЕ може призводити до утворення кількох близьких двониткових розривів [88], наприклад альфа-випромінювання призводить до виходу більш, ніж 90% двониткових розривів, на кінцях яких присутні ще й поодинокі пошкодження [215, 234, 241]. З літературних даних відомо, що вірогідність виникнення ендогенних кластерних пошкоджень ДНК доволі низька [18].

Вибір шляху репарації, ефективність і точність цього процесу залежить від типу і складності пошкоджень в клітині. Від таких пошкоджень ДНК, як одониткові розриви, АП-сайти, модифікації основ, що індукуються іонізуючим випромінюванням, чи виникають ендогенно, клітини репаруються головним чином завдяки ексцизійній репарації основ [300]. Репарація від ДНК-білкових зшивок в клітинах ссавців відбувається переважно за участі системи гомологічної рекомбінації [106]. Найскладнішою є репарація від індукованих іонізуючим

випроміненням міжниткових зшивок та дволанцюгових розривів [55, 144]. Ефективність репарації від кластерних пошкоджень обмежена внаслідок виникнення певних труднощів для репараційних систем клітини [5]. Так, процеси репарації в межах кластеру можуть порушуватися на певних стадіях ексцизійної репарації, що призводить до формування додаткових двониткових розривів або неточної репарації, яка є важливою у виживаності клітин, мутагенезі та виникненні ризику малігнізації [5, 96]. В деяких дослідженнях було показано, що репарація ДНК від одноланцюгових розривів в клітинах, опромінених радіацією з високими ЛВЕ, стає менш ефективною внаслідок складності цих пошкоджень, або навіть їх об'єднання з дволанцюговими розривами [57, 96, 210].

В останні роки отримано результати, які дозволяють зрозуміти механізми розвитку клітинної відповіді на пошкодження і формування так званої адаптивної відповіді. Провідна роль в цьому процесі належить білкам з різними функціями: сенсорам, медіаторам, трансдуцерам та ефекторам [58, 86, 94]. Так, активація функціонування контрольних точок клітинного циклу має найважливіше значення. З активацією експресії генів також пов'язаний розвиток всього комплексу подій під час розвитку клітинної відповіді на пошкодження, причому зміна експресії багатьох генів відбувається по-різному: зростання чи зниження рівня, залежно від дози і часу після опромінення [58, 86], а також впливу мікроРНК, як ендогенних регуляторів [105]. Також відповідь клітини на пошкодження супроводжується реконструкцією хроматину шляхом модифікації білків, що сприяє розпізнаванню пошкоджень ДНК та їх репарації [52].

В роботі [288] автором запропонована гіпотеза щодо механізму індукції адаптивної відповіді при опроміненні клітин ссавців в малих дозах. В якості пускового механізму розглядається активація рецепторів факторів росту радіаційно-індукованими пошкодженнями плазматичної мембрани клітини з подальшою посттрансляційною модифікацією ферментів і транскрипційних факторів, що беруть участь в апоптозі та репарації ДНК.

Відомо, що ексцизійна репарація основ відновлює більшість одониткових розривів ДНК, видаляє пошкодження основ ДНК, не впливаючи на вторинну

структуру внаслідок дезамінування, метилування чи втрати основ, атакування вільних радикалів кисню чи іонізації [271]. На участь цієї репарації в адаптивній відповіді вказує те, що дія алкілюючих агентів адаптує клітину до наступного опромінення, а алкіловані основи ДНК репаруються [34, 35]. Відомо, що монофункціональний алкілюючий агент N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин активує кінази JNK та МАПК [184], які відіграють важливу роль у запропонованому в роботі [271] механізмі ініціації адаптивної відповіді, а протеїнкіназа С – АП-ендонуклеаза, яка підвищує резистентність клітин до високих доз радіації [274].

Ексцизійна репарація нуклеотидів видаляє пошкодження ДНК з відмінною від нормальної вторинної структури пари основ [271]. Іонізуюче опромінення індукує невелику кількість таких пошкоджень [74], хоча деякі, що не викликають порушення вторинної структури, також можуть бути видалені цією репарацією [198]. Певні дані свідчать на користь участі ендонуклеази ERCC1 в індукції адаптивної відповіді. На кривих виживаності клітин китайського хом'ячка радіочутливої лінії UV20 (дефект в гені, що кодує ERCC1) відсутня ділянка індукованої радіорезистентності в діапазоні доз вище 30 сГр [225]. Існує припущення, що перехід від гіперчутливості до індукованої радіорезистентності на кривих виживаності зумовлений тими ж причинами, що і індукція радіорезистентності, яка лежить в основі адаптивної відповіді [161], тому відсутність переходу в клітин, дефектних за ERCC1, свідчить про залежність цих причин від функціонування ERCC1. На даний час вважають, що певна роль репарації нуклеотидів в реалізації адаптивної відповіді не виключена, але вона вносить мінорний внесок у репарацію радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК.

Гомологічна рекомбінаційна репарація здійснює точне відновлення двониткових розривів та зшивок ДНК, використовуючи ділянки сестринських хроматид чи гомологічних хромосом, довжиною більше 200 пар основ, використовуючи два комплекси білків: RAD51, RAD52, RAD54, RP-A, BRCA1, BRCA2 (функціонує протягом синтетичної фази клітинного циклу) та RAD50, MRE11, XRS2 (переважно в пізній синтетичній та постсинтетичній фазах) [99,

271]. Білок XRCC2 визначає резистентність клітин до мітоміцину-С (індукує утворення зшивок ДНК), а вплив малих концентрацій цієї речовини викликає адаптивну відповідь до подальшого опромінення клітин у високих дозах радіації [34, 35]. В діапазоні доз гамма- та рентгенівського опромінення, за яких індукується адаптивна відповідь, запускається спрямований рух хромосом, зближення гомологів, необхідне для гомологічної рекомбінаційної репарації двониткових розривів ДНК [193, 355, 356]. Але незважаючи на дані, які свідчать про причетність цієї репарації до індукції адаптивної відповіді, однозначно стверджувати це неможна. Так, необхідна для адаптивної відповіді полі-АДФ-рибозополімераза (ПАРП) інактивує ДНК-топоізомеразу I [97], яка відіграє важливу роль в рекомбінації, а зв'язування ПАРП з розривами ДНК знижує ефективність ініціації рекомбінації в цих сайтах [147]. До того ж, взаємодія RAD51 з p53 призводить до інгібування відкріплення від ДНК [182]. Кількість білка p53 і транскрипція p53-залежних генів зростає після опромінення клітин ссавців в малих дозах [172], а неможливість відкріплення RAD51 з одної пошкодженої ділянки ДНК перешкоджає його прикріпленню до іншої пошкодженої ділянки, отже активація p53 малими дозами іонізуючого випромінювання знижує ефективність цієї репарації.

В роботі І. Зумієла запропоновано гіпотезу щодо активації адаптивної відповіді внаслідок фіксації двониткових розривів ДНК на транскрипційних факторах за типом фіксаційної моделі Редфорда [236].

Інший тип репарації двониткових розривів – негомологічне об'єднання кінців, є головним для клітин ссавців, хоча і часто супроводжується виникненням генних мутацій, делецій, хромосомних аберацій [99, 271]. Тут беруть участь два комплекси: ДНК-протеїніназний та RAD50, які працюють під час G_1 та ранньої S-фази клітинного циклу [99]. Про можливу роль цієї репарації в індукції адаптивної відповіді свідчать наступні дані: часткове відновлення дефекту V(D)J-рекомбінації у scid-мишей радіаційно-індукованим адаптивним процесом [54], відсутність індукованої радіорезистентності за доз більше 30 сГр на кривих виживаності клітин китайського хом'ячка лінії XR-V15B (хоча це може

відображати і дуже високу радіочутливість клітин) [271], тому участь цієї репарації в адаптивній відповіді не виключена, хоча і не доведена остаточно.

Роль SOS- репарації в індукції адаптивної відповіді вже давно досліджена [250] і розглядається як багатофункціональна реакція клітини на такі пошкодження, які не можуть відновитися альтернативними шляхами. Цей індукцибельний шлях репарації відносять до помилкових механізмів, що призводять до мутаційних змін і слугують джерелом генетичної нестабільності. На даний час до структур, що запускають SOS-сигнал, належить мультиферментний комплекс з унікальних ферментів репарації та індукцибельної реплікації ДНК, а також одно- та двониткові розриви ДНК [113].

В індукції адаптивної відповіді може брати участь і процес апоптозу, адже активація апоптичної смерті найбільш радіочутливих клітин популяції малими, адаптуючими дозами, сприяє зростанню радіорезистентності популяції в цілому та елімінації клітин, не здатних здолати затримку клітинного циклу [304]. В літературі існує поняття радіаційно-індукованої адаптивної відповіді за критерієм кількості апоптозів [87, 226] та затримок циклу [87]. Транскрипційний фактор AP-1 сприяє виходу клітин із затримки циклом [119], а його активність стимулюється опроміненням клітин в малих дозах [288].

Отже, ATM/ATR сигналізація одночасно з активацією систем контролю точок клітинного циклу активує репараційний процес шляхом індукції транскрипції репараційних білків, мобілізації інших компонентів, задіяних в репарації, а також модифікації білків хроматину [52, 121, 264]. Активація системи контролю точок клітинного циклу та репарація критичних пошкоджень взаємопов'язані. Складність цих пошкоджень впливає на ефективність їхньої репарації.

Судячи з вище зазначеного, адаптивна відповідь являє собою сукупність процесів, що визначають відновлення цілісності ДНК: активації репарації ДНК, видалення радіочутливої фракції клітин після адаптивного опромінення внаслідок їх високої чутливості до апоптозу, підвищення здатності клітин долати затримку клітинного циклу після впливу ушкоджуючої дози радіації. Переважання певного

процесу, або наявність в якомусь ступені кожного з них залежить від багатьох причин, наприклад, від генотипу клітин, віку та ступеню гетерогенності популяції клітин. Так, до апоптозу більш схильні старі [119] та диференційовані [265] клітини, в той час як клітини, що активно діляться (особливо в синтетичній фазі клітинного циклу), більш схильні до репарації ДНК.

1.2.2. Участь активних форм кисню та антиоксидантних систем у формуванні радіаційної адаптивної відповіді

Опромінення біологічних об'єктів внаслідок радіолізу води та інших сполук підсилює утворення активних форм кисню ($^1\text{O}_2$, O_2^* , H_2O_2 , OH^*), які ініціюють прискорення вільнорадикальних процесів окиснення, що може призвести до розвитку окисного стресу. Цьому запобігають ферментні та неферментні системи антиоксидантного захисту [257, 328, 345].

Важливий внесок у зміни радіочутливості клітини та організму в цілому роблять ураження мембранних структур внаслідок змін складу ліпідів, фосфоліпідів, ліпопротеїдних комплексів, продуктів окиснення ліпідів та антиокисної активності [296].

Ю. А. Петрович та Д. В. Гуткін у 1986 році сформулювали узагальнення щодо існування п'яти рівнів антиоксидантного захисту [345], починаючи від системного захисту клітин за рахунок значного зниження вмісту кисню в тканинах на першому рівні і до ферментативного відновлення гідропероксидів поліненасичених жирних кислот на п'ятому рівні. Також існує уявлення щодо антиоксидантів прямої (інактивують вільні пероксидні радикали, захищають мембрани фосфоліпаз або вступають в окисне фосфорилування, утворюючи зв'язок з ліпідами, що необхідно для пригнічення впливу супероксид аніону) та непрямой (гальмують перекисне окиснення завдяки стимуляції ферментативної антиоксидантної системи клітин) дії.

Тривалий час активні форми кисню (АФК) розглядалися лише як молекули, що ініціюють окислювальні пошкодження важливих макромолекул, але аналіз

останніх даних літератури свідчить про відношення внутрішньоклітинного утворення та елімінації АФК до підтримання гомеостазу шляхом окисно-відновної регуляції певних біологічних процесів [206, 285].

В роботі [361] показане р53-індуковане збільшення продукції АФК, що виникає на ранній стадії відповіді на пошкодження, передуює активації каспаз і має метаболічний характер, регулюючи чутливість клітин до р53-залежного та р53-незалежного апоптозу. В деяких випадках сигнальна функція АФК реалізується внаслідок зниження їх вмісту [143, 187]. Багаточисельними дослідженнями було показано, що рівень продукції АФК відіграє важливу сигнальну роль не лише у забезпеченні механізму підтримки постійності геному шляхом апоптозу незворотно змінених клітин, але і у забезпеченні оптимальної відповіді клітин на пошкоджуючі впливи для підтримки їх життєдіяльності саме за цих умов [247], так, наприклад, посилена продукція супероксидного аніон-радикалу може бути сигналом для проліферації клітини за відсутності екзогенних мітогенних стимулів [337].

Сигнальна роль АФК реалізується шляхом їх участі в активації двох різних шляхів внутрішньоклітинного регуляторного ланцюга: ERK-направленого каскаду, що призводить до зміни активності транскрипційних факторів, направлених на підтримання в клітині установки ріст/диференціювання, та JNK-каскаду, що призводить до стабілізації та функціональної активності р53 і, як наслідок – запуску апоптозу. JNK-кінази активуються різними стимулами: іонізуючим та УФ-опроміненням, інгібіторами білкового синтезу, ДНК-пошкоджуючими агентами, тощо [247].

Важливу роль у вирішенні долі клітини під час стресу відіграє ядерний фактор NF- κ B, що активується під впливом перекису водню і викликає транскрипційну активацію генів відповіді на стрес, в результаті чого забезпечується антиапоптичний ефект [107].

В досліджах А. М. Мазурик та ін. щодо оцінки кореляції рівня ефективного вмісту супероксидного аніон-радикалу з нативністю ДНК клітин кісткового мозку мишей, було показано, що АФК в якості сенсорної ланки беруть участь у

підтримці структури ДНК під контролем генетичної програми, забезпечуючи адаптивні зміни у відповідь на пошкоджуючі фактори середовища [262]. Таким чином, рівень їх вмісту за нормального окислювального метаболізму може впливати на вибір регуляторних програм, необхідних для життєдіяльності за конкретних умов, на визначення міри генетичної експресії даних програм, призводити до конформаційних змін ДНК.

В ряді робіт було показано виникнення адаптивної відповіді в результаті функціонування ферментів антиоксидантного захисту [332] та різних класів метаболічно активних сполук: кластеринів [336], металотіонеїнів [126], гемоксигенази-1 [323], антагоніста кальцію ТМВ-8 [208], гліюксалази [267], цикліна D1 [2, 243, 352] та інших, хоча конкретна роль цих речовин у зміні радіочутливості клітини ще не виявлена.

1.2.3. Роль неспецифічних метаболічних перебудов у формуванні радіаційної адаптивної відповіді

Як відзначено вище, одним з перших припущень щодо молекулярних механізмів, які зумовлюють адаптивні процеси, було уявлення, що зростання радіорезистентності клітини спричинене індукцією синтезу ферментів репарації у відповідь на опромінення в малій дозі [217, 218]. Але з накопиченням даних виявилось, що каскад подій, який призводить до зниження радіочутливості, ініціюється не лише опроміненням з низькою ЛПЕ, але і опроміненням нейтронами [180], дією пероксиду водню [50], солей цинку [36], блеоміцину [138] і навіть гіпертермією [34, 185, 237]. Зниження радіочутливості неопромінених клітин і цілісних організмів спостерігається в результаті передачі їм сигналів від опромінених в малій дозі подібних біологічних об'єктів [237, 298, 324]. На деяких модельних системах встановлено, що це явище корелює із зростанням в середовищі концентрації адуктів окислення ДНК [324, 356] та оксиду азоту [269].

З іншого боку, опромінення лімфоцитів людини в дозі 1 сГр підвищує стійкість клітин не лише до опромінення в високій дозі, але і до впливу блеоміцину та мітоміцину С [224].

Було виявлено, що інгібування синтезу мітоген активуючої протеїнкінази p53 та протеїнкінази-С перешкоджає формуванню адаптивної відповіді [92], клітини, мутантні за генами ферментів ексцизійної репарації, не втрачали здатності до адаптивної відповіді [150], пригнічення гена ДНК-залежної протеїнкінази також не відображалось на формуванні адаптивної відповіді [64], отже в клітині протікають певні первинні процеси, які відрізняються від індукції синтезу ферментів репарації ДНК і беруть участь у формуванні адаптивної відповіді. Збереження адаптивної відповіді після виключення певного гену свідчить не про його причетність до формування цього феномену, а про існування інших, обхідних шляхів формування адаптивної відповіді.

При дослідженні методом мікрочипів експресії генів лімфоцитів людини за умов індукції адаптивної відповіді до гамма-випромінення, було виявлено 86 генів, активність яких змінювалась після опромінення в дозі 10 сГр, але серед них не було жодного гену системи репарації ДНК, чи антиоксидантного захисту [64].

Колеман зі співавторами [49] проаналізували зміни в експресії приблизно 12500 генів при опроміненні в дозах 5 сГр+2 Гр та 2 Гр у трьох ліній лімфобластоїдних клітин людини і виявили зростання експресії, незалежно від індукції адаптивної відповіді, генів кластерів рибосом, біосинтезу білків, регуляторів клітинного циклу, тобто адаптивна відповідь не детермінується первинними змінами, що відбуваються в клітині відразу після її опромінення в малій дозі і не дає інформації про первинні процеси в опроміненій клітині. Серед виявлених метаболічних змін немає якихось специфічних для радіації, а зміни активності генів системи репарації не є домінуючими.

Наявність вище перерахованих різноманітних взаємодій вказує на те, що скоріш за все не існує унікальної індукцибельної системи, що забезпечує зниження радіочутливості клітини, адже солі цинку, нейтрони, радон та інші радіоміметрики можуть викликати такі ж первинні пошкодження ДНК, що і

гамма-промені, тим самим стимулюючи роботу репаративних систем і зростання радіорезистентності клітини. Отже, все вище зазначене призводить до висновку, що адаптивна відповідь – регуляторний феномен, стрес-реакція клітини [352], тригером для появи якої може стати або збільшення концентрації активних форм кисню, або ще невідомі метаболічні перебудови. Тобто, після опромінення в малій дозі клітина переходить в стан стресу, мобілізує всі можливі засоби (в деяких випадках, але не завжди – участь ферментів репарації) підвищення стійкості до радіаційного впливу, а який саме шлях реалізується – залежить в першу чергу від генотипу, умов проведення експерименту, тощо. Наслідком стану стресу можуть бути явища злоякісної трансформації клітин, пришвидшення проліферації, гормезис та багато іншого.

Е. Лейкявічус в своїй роботі відмітив, що пристосування клітини після впливу стресу може відбуватися за рахунок певного «підлаштування» оптимумів роботи різноманітних груп ферментів, навіть зміни спектра ензимів хаус-кіпінг системи [328]. Не протирічає цьому твердженню і дані авторів [19] щодо змін в ізоензимному складі ферментів дихального комплексу рослин внаслідок опромінення. Якщо згадати узагальнення Ю. А. Петровича та Д. В. Гуткіна про існування п'яти рівнів антиоксидантного захисту [345], то стає зрозумілим, що зміни цих ферментів є неспецифічними метаболічними перебудовами організму з метою становлення адаптації, адже дихальні ензими – ферменти генів хаус-кіпінгу.

До певних неспецифічних перебудов можна віднести і зміни в насінневих оболонках при його проростанні. Наприклад, О. П. Кравець та ін. [324] було показано зміни біохімічного складу насінневих покривів, що корелюють зі швидкістю набубнявіння і проростання насіння рослин в Чорнобильській зоні, що може свідчити про включення певних неспецифічних шляхів перебудов метаболізму для забезпечення виживання організму. Але, такий феномен також може бути пов'язаний і зі зниженням доступності кисню для зародка, що обумовлює зміни ізоензимного складу дихальних ензимів [19] і не тільки, адже

сам процес змін біохімічного складу покривів насіння охоплює цілий комплекс ферментативних процесів.

Хімічні, пов'язані з метилуванням, зміни молекули ДНК можуть прямо і/чи опосередковано впливати на становлення радіадаптації і зміну радіочутливості індивідуума. Адже саме конформація хроматину визначає його доступність для факторів транскрипції і тим самим - зміни в синтезі і спектрі ферментів у відповідь на опромінення [300]. Такі зміни можуть відбуватися як в транскрибованій частині ДНК, що є логічним, адже саме вона виступає матрицею в процесі транскрипції, так і в сателітній ДНК, яка через зміну своєї структури/конформації забезпечує таку стерічну спорідненість транскрибованої ДНК та молекулярних факторів, яка може як сприяти доступності, так і навпаки, «закривати» матрицю від дії певних негативних факторів.

1.3. Механізми епігенетичної регуляції

Проблема регуляції експресії генів – тобто активація одних і підтримання інших у стані мовчання (сайленсингу), є ключовою для розуміння процесів розвитку та функціонування живих організмів. При цьому епігенетичні аспекти регуляції розглядаються як з точки зору репресії генів еукаріот, де важливе значення має визначення механізмів, завдяки яким здійснюється ініціація та підтримка стану мовчання регуляторних генів – перемикачів розвитку, так і з точки зору тканинно- і органоспецифічних генів. У зміні експресії генів передбачається участь регуляторного механізму на основі структурних перебудов хроматину, який модулює доступність до генетичної інформації апарату транскрипції. Хроматинові структури можуть інактивувати гени чи навіть хромосоми, незважаючи на присутність транскрипційних факторів, що їх активують, за рахунок утворення гетерохроматинових доменів. За сучасними уявленнями, регуляція транскрипції генів еукаріот може бути результатом комплексних процесів, що реалізуються як на рівні взаємодії цис-діючих елементів із транскрипційними факторами, так і просторово-часових варіацій у

хроматиновому оточенні генів [130]. Хоча явище епігенетичного мовчання генів в онтогенезі еукаріот, до якого мають відношення локальні зміни структурно-функціональної організації хроматину, ще далеке від повного розуміння, значною мірою його наближує пізнання молекулярних зв'язків основних характеристик мовчазного хроматину – метилування ДНК і гістонів, а також деацетилювання останніх [46, 62, 155, 178, 252].

Подібні зміни відповідають за здійснення таких генетичних процесів, як диференційна експресія генів, геномний імпринтинг, інактивація Х-хромосоми, репресія мобільних генетичних елементів [51]. Порушення цих процесів внаслідок пошкодження епігенетичних механізмів призводить до аномалій росту та розвитку [15]. Прикладами таких захворювань у людини є хвороби, пов'язані з порушенням геномного імпринтингу [201, 340] та хроматинові хвороби [98, 115, 118, 211].

Інтенсивні дослідження регуляції активності генів різних видів мікроорганізмів, рослин, комах, тварин і людини, секвенування геномів за останні десятиліття ХХ ст. призвели до відкриття ряду епігенетичних феноменів: ефект положення, парамутація, трансекція, косупресія чи РНК-інтерференція, явище пріонізації, супресія транспозонів, геномний імпринтинг та інактивація Х-хромосоми [108, 209, 293, 364].

1.3.1. Рівні організації експресії генів

Фундаментальним механізмом, що забезпечує вибірковість експресії генів в онтогенезі еукаріот, є обмежена доступність факторів активації чи репресії транскрипції до елементів ДНК, тому важливе значення відіграє організація хроматину – досить лабільного полімеру, локальна структура якого може змінюватися у відповідь на внутрішні фактори розвитку та сигнали довкілля і тим самим сприяти чи перешкоджати доступу транскрипційного апарату до нуклеосомної ДНК.

Відомо, що основним структурним компонентом хроматину є нуклеосома, що складається з октамеру позитивно заряджених білків кор-гістонів H2A, H2B, H3 та H4 і закрученого навколо нього фрагменту ДНК довжиною 146-147 пар нуклеотидів. На сьогодні початковий погляд на нуклеосому, як стаціонарну структуру, змінився на протилежний завдяки даним про посттрансляційні модифікації гістонів, обміни гістонів в нуклеосомах, мобільність гістонових октамерів відносно послідовностей генів [166, 181, 268]. За сучасними уявленнями, порушення структури нуклеосом чи їх повторна реорганізація опосередковується різними ферментними ансамблями – хроматин-ремодуючими комплексами. До тепер описано два основні їх типи, за допомогою яких змінюється конформація хроматину: перший - включає мультибілкові комплекси з субодиницями, гомологічними ДНК-залежним АТФазам, що використовують енергію гідролізу АТФ, а другий має відношення до комплексів, які каталізують посттрансляційні ковалентні модифікації гістонів нуклеосом [181].

Незважаючи на достатньо велику кількість даних, питання щодо встановлення причинно - наслідкових зв'язків між епігенетичними феноменами і змінами в експресії генів залишається відкритим.

1.3.1.1. Модифікації гістонів та їх роль в експресії генів еукаріот

Хімічні модифікації гістонів – один із епігенетичних механізмів контролю експресії генів, відбувається шляхом метилування, ацетилювання, фосфорилювання, глікозилювання і убіквітинування гістонів з наступним протеолізом [189, 334].

Різні модифікації N-кінців гістонів можуть впливати одна на одну [252] – якщо залишок лізину ацетилований, то він може бути прометилований лише після деацетилювання. Крім того, спостерігається взаємовплив модифікацій, що зачіпають різні сайти гістонів. Наприклад, фосфорилювання H3S10 і метилування

H3K4 пригнічують метилування H3K9, фосфорилювання і ацетилювання гістонів призводять до активації транскрипції [230].

Вплив метилування гістонів на транскрипцію генів залежить від його локалізації: метилування за H3K9 пов'язане з сильним гетерохматинним пригніченням генів, а ди- і триметилування за H3K27 – головним чином з репресією генів, розташованих в еухроматині. Метилування H3 за лізином в 4 положенні, навпаки, призводить до активації генів. Різноманітність впливів метилування гістонів на транскрипцію генів пояснюється тим, що метилування змінює транскрипцію не саме по собі, а шляхом залучення інгібіторів і активаторів транскрипції. Вважається, що характер метилування гістонів являє собою «гістоновий код», який сканується іншими білками за допомогою спеціальних доменів.

В геномах рослин ідентифіковано білки, гомологічні гетерохматинним білкам дрозофіли і тварин – вони присутні у картоплі, арабідопсису і виявляють високу зв'язувальну здатність до АТ-збагачених ділянок ДНК інтронів [85, 171, 279, 280]. Функція таких білків переважно пов'язана з репресією генів у встановленні та/або підтримці стану епігенетичного сайленсингу. Передбачається, що поповнення хроматину цими білками опосередковується частково через взаємодію з лізином 9 гістону H3 і формуванням гетерохматину, що індукує сайленсинг поблизу розташованих генів [13, 85, 171, 279, 280]. Переважно ці білки є компонентами еухроматину. Дослідження їх суб'ядерної локалізації і динамічних змін показали, що за даними одних авторів, вони локалізуються назовні гетерохматинних хромоцентрів, тоді як інші автори вважають, що нерівномірно в самих хромоцентрах [85, 280].

Індивідуальні гістони, ступінь і природа їх модифікацій можуть відрізнятися між певними областями хроматину та його компонентів. Гетерохматин зазвичай розташований біля центромер і теломер, так як і його проміжні сайти, вперше виявлені у кукурудзи і є загальною характеристикою геномів рослин. Повторювані послідовності, в тому числі і транспозони, є складовими елементами гетерохматину, можуть бути розміщені по всьому геному і беруть участь в

регуляції процесів розвитку рослин. Сайленсинг призводить до утворення гетерохроматину, що поширюється від певних сайтів – таких, як мовчазні елементи ДНК, в результаті порушення бар'єру, що обмежує райони гетерохроматинового сайленсингу в нормі, і інактивує оточуючі гени, зберігаючись протягом клітинного циклу [149, 166, 314].

Зміни у метилуванні цитозину симетричних послідовностей можуть по-різному впливати на різні гістонові маркери: при втраті CpG-метилування спостерігається збагачення гетерохроматину гістоном H3, метилованим за лізином 27, що корелює з транскрипційною реактивацією, але не впливає на метилування інших лізинових залишків гістону H3; у тварин втрата CpG-метилування перицентромерних повторів призводить до підвищення метилування гістону H3 за лізином 4, але ніяк не впливає на метилування лізину 9, що вказує на існування різних механізмів регуляції [81, 177, 238, 257]. Припускається, що підтримуюче CpG-метилування запускає метилування гістонів, а високий рівень метилування H3 за лізином 9 необхідний для підтримки структури хромоцентромеру, тоді як втрата метилування в цьому положенні є результатом транскрипційної реактивації, зчепленої зі зсувом неметіллованих нуклеосом [12, 78, 116, 117, 149].

Хімічні модифікації гістонів здійснюються гістоновими ацетилазами і деацетилазами, які ідентифіковані у мультисубодиничних комплексах і спрямовані в специфічні сайти ядерної ДНК. Ацетилювання залишків лізину порушує взаємодії термінального кінця кор-гістонів з ДНК та білками, утворюючи релаксовані структури хроматину, в результаті чого відбувається експресія генів. Еухроматинові ділянки ДНК характеризуються гіперацетилованою формою гістонів, тоді як у гетерохроматині, навпаки, гістони є гіпоацетилованими [166, 268].

Відомо, що ацетиловані гістони H3 і H4 можуть збільшувати транскрипцію генів двома способами: ацетилювання сприяє переміщенню нуклеосом із промоторів, даючи доступ факторам транскрипції, або ацетиловані гістони стабілізують ансамблі транскрипційних комплексів на промоторах через білкові

фактори з бромодоменними елементами, які специфічно взаємодіють з ацетилованими кінцями гістонів [80, 246, 268].

Показано, що деацетилювання гістонів супроводжує втрату транскрипційної активності внаслідок функціонування інсуляторів, які перешкоджають промотор-енхансерним взаємодіям [45, 190].

Зазвичай деацетилази є частиною мультибілкових комплексів еукаріот, що містять транскрипційні репресори, корепресори і ряд інших білків, в деяких випадках – мають відношення до АТФ-залежних ремодулюючих білків [156, 191], та роль цих ферментів і деацетилювання в регуляції генів рослин лишається не зовсім зрозумілою, адже мало що відомо про епігенетичний контроль просторово-часової регуляції розвитку рослин, але існують дані, що динамічні і зворотні процеси ацетилювання і деацетилювання забезпечують просторово-часовий код для активації генів і їхнього мовчання [242].

1.3.1.2. Роль РНК-інтерференції в організації експресії генів

В літературі існують дані щодо наявності двох категорій коротких РНК: siRNA, які можуть бути отримані від вірусів та трансгенів, що опосередковують стійкість до вірусів і сайленсинг трансгенів шляхом деградації РНК, від промоторів генів і транспозонів, що контролюють сайленсинг шляхом модифікації хроматину; та miRNA – можуть бути отримані від міжгенних доменів геному, регулюючи експресію генів шляхом розщеплення мРНК чи інгібування трансляції [159, 164, 301, 347].

У рослин існують різні за розмірами короткі інтерферуючі РНК: довгі – 23-30 пар нуклеотидів і більш низькомолекулярні послідовності – 21-23 пари нуклеотидів, причому перші гомологічні ретротранспозонам і деяким генам. Вважається, що довгі siRNA є несуттєвими для послідовність-специфічної деградації мРНК, але їх присутність спряжена з метилуванням гомологічних ДНК, тоді як поява коротких siRNA асоціюється з деградацією мРНК, а не системним поширенням сайленсингу або метилуванням ДНК. Припускають, що

довгі siRNA беруть участь в РНК-спрямованому метилуванню ДНК, а короткі – в ініціації посттранскрипційного мовчання генів [84, 149, 159, 164, 231].

Природа РНК, які залучають механізм метилування ДНК, була висвітлена завдяки спостереженням, що з РНК-спрямованим метилуванням ДНК часто має місце сайленсинг РНК – консервативний механізм сайт-специфічної деградації РНК еукаріот. Молекулярний механізм цього явища прояснився після ідентифікації у рослин коротких інтерферуючих РНК, розміром 21-26 пар нуклеотидів, які є аналогічними сенсовим або антисенсовим ділянкам дволанцюгової ДНК [93, 301]. В подальшому для тварин було показано, що він включає процесинг ініціальних індукованих дволанцюгових ДНК - «тригерів», з утворенням багаточисельних siRNA, за участі специфічних ендонуклеаз – РНКаз III (DICER). Останні зв'язуються з білковим РНК-індукованим комплексом сайленсингу RISC і, очевидно, є провідниками у виборі і деградації довгих дволанцюгових РНК за участі DICER-рибонуклеаз. Хоча при утворенні ці siRNA є дволанцюговими короткими фрагментами з виступаючими двома нуклеотидами з обох 3'-кінців, до складу RISC вони входять в одноланцюговій формі та ідентифікують мішені мРНК за антисенсовою комплементарністю. РНКазы III гідролізують мРНК майже по центру області, комплементарній siRNA [164, 231].

Припускають, що РНК-інтерференція рослин відбувається аналогічним шляхом, проте мало що відомо про компоненти комплексу, які беруть участь в цьому процесі. Якщо дволанцюгові ДНК відповідають промоторним послідовностям, відбувається *de novo* метилування і транс-інактивація генів з гомологічними послідовностями шляхом транскрипційного мовчання, якщо ж дволанцюгові ДНК гомологічні кодуючим ділянкам, то здійснюється репресія генів шляхом РНК-інтерференції – короткі інтерферуючі РНК мають відношення до двох типів сайленсингу, що припускає існування механістичного зв'язку між ними [231].

1.3.1.3. Роль білків групи Polycomb в регуляції експресії генів

Серед білків, що мають відношення до епігенетичного сайленсингу тварин і рослин, значна увага приділяється групі Polycomb. Гени цих білків вперше було ідентифіковано при генетичному скринінгу дрізофіли, як гени, мутації яких порушували підтримку сайленсингу певних гомеобокс-генів протягом ембріогенезу. Вважається, що їх продукти сприяють підтримці профілей експресії гомеозисних генів за допомогою сайленсингу останніх у відповідних областях при розвитку ембріонів. Також білки цієї групи відіграють важливу роль у проліферації клітин – їх комплекси взаємодіють з послідовностями ДНК політених хромосом дрізофіли, що розподілені по всьому геному, здійснюючи не лише транскрипційне мовчання генів, що їх містять, але і сусідніх [40, 216].

У багатьох роботах було висловлене припущення щодо консервативності механізмів транскрипційного сайленсингу за участі цих білків для рослин, тварин і комах [40, 90, 128, 216, 231].

Явище регуляції експресії генів еукаріот, до якого мають відношення локальні зміни структурно-функціональної організації хроматину ще далеке від повного розуміння. Вважається, що транскрипційна компетенція визначається комбінацією двох модифікацій ДНК – метилування і модифікацій гістонів. Ще одним рівнем складності є ідентифіковані нещодавно низькомолекулярні РНК як можливі сигнальні молекули, які беруть участь в контролі метилування локус-специфічних послідовностей і комплекси білків групи Polycomb, які здатні підтримувати у стані мовчання ключові регуляторні гени розвитку еукаріот.

1.3.2. Роль метилування ДНК в епігенетичній регуляції

Таким чином, у відповідності до сучасних уявлень, епігенетичний статус організму визначається характером та рівнем метилування ДНК, посттрансляційними модифікаціями гістонів, присутністю ізоформ гістонів та характером упакування хроматину [83, 252]. Найбільш дослідженим

епігенетичним механізмом регуляції є метилування ДНК [294] – єдина хімічна модифікація первинної структури даної макромолекули, яка контролюється ядерним геномом і має плейотропний вплив на його структурно-функціональну організацію. Ця модифікація розширює інформаційний вміст первинних нуклеотидних послідовностей, забезпечує генетичну інформацію іншого порядку без зміни останніх і вважається епігенетичним кодом, що успадковується в процесі мітозу і мейозу.

Метилуванню підлягають залишки цитозину в положенні 5, що призводить до пригнічення транскрипції в зоні метилованого промотора [69, 294]. У тварин подібна модифікація може відбуватися лише в CG-послідовності. У рослин 5-метилцитозин знайдено також у CNG-послідовностях, де N – будь-який нуклеотид, і в CXX-послідовностях, де X – будь-який нуклеотид крім гуанозинфосфату. Найбільш густому метилуванню підлягають часті повтори, а рівень їх метилування корелює зі ступенем їх репресії.

Відомо, що 5mC є мутагенним чинником через можливість його спонтанного дезамінування і перетворення на тимін, тому ферментативна модифікація цитозину розглядається як гаряча точка мутагенезу. Такі мутації є причиною зникнення деяких CpG-послідовностей із генів та геномів різних організмів, що дає підставу вважати ферментативну модифікацію цитозину одним із основних шляхів природного мутагенезу в еволюції. Таким чином, метилування ДНК розглядається в якості одного з можливих не тільки епігенетичних, але і мутагенних факторів, які беруть участь в реалізації генетичних програм розвитку еукаріот та нестабільності їх геномів. Інша запропонована функція цього процесу пов'язана із захистом геному від чужорідної генетичної інформації – ДНК трансгенів, РНК вірусів, віроїдів та розповсюдження мобільних генетичних елементів.

Хоча функція метилування ДНК є предметом активного дослідження вже понад півстоліття, її значення залишається дискусійним питанням. Тільки в останні роки з розвитком та удосконаленням молекулярно-генетичних методів досліджень та методології генетичної інженерії намітилися конкретні шляхи

експериментального обґрунтування та вдосконалення основних ідей і гіпотез, що були запропоновані після її відкриття.

Ідею щодо участі метилування в регуляції експресії генів було висловлено ще 1964 року [359], а через десятиліття запропоновано гіпотезу, згідно якої програмоване метилування та деметилування ДНК промоторів генів може регулювати їх експресію у процесі розвитку еукаріот. Ряд експериментальних даних свідчить на її користь, проте цей великий фактичний матеріал носить, головним чином, корелятивний характер як для тварин, так і для вищих рослин. У протипагу гіпотезі «метилування - розвиток» існують експериментальні дані щодо контролю розвитку регуляторними шляхами, які є консервативними у еукаріот – кореляції між метилуванням і репресією генів, описані у тварин, є не причиною, а наслідком транскрипційної інактивації.

На сьогодні відоме залучення метилування в контроль клітинного циклу, що підтверджується наявністю зупинки в G_0 -S-фазі, зумовленої зменшенням кількості метилтрансферази, а не деметилуванням ДНК [167].

Встановлено зв'язок метилування ДНК зі зменшенням експресії генів рослин в присутності дуплікованих неалельних генів [207].

Про важливість ферментативної модифікації цитозину найпереконливіше свідчать генетичні дослідження, в яких спрямованими мутаціями, або введенням генів метилтрансфераз в антисенсовій орієнтації, було зменшено загальний рівень метилування ДНК. В результаті спостерігається ряд аномальностей у розвитку рослин, проте вони лишаються життєздатними, тоді як мутанти тварин, гомозиготні за геном метилтрансферази чи геном, що кодує білок MeCP2 (який специфічно зв'язується з метилованими CpG -послідовностями ДНК), не здатні завершувати ембріогенез [200]. Різний ефект зменшення рівня метилування рослин і тварин не є дивним, адже першим притаманний ряд особливостей розвитку, визначених різними життєвими стратегіями високоорганізованих представників цього царства.

1.3.2.1. Особливості метилування ДНК рослин і участь цього процесу в епігенетичній регуляції

Метилування ДНК виявлене у багатьох організмів – від бактерій і одноклітинних еукаріот до вищих еукаріот. Основним типом модифікації первинної структури ДНК тварин є метилування цитозину, в той час як у геномі однодольних і дводольних рослин хоч і рідко, але зустрічаються мінорні основи 6-метил-аденіну [292]. Особливістю вищих рослин є високий рівень метилування їхньої ДНК – до 30-50% залишків цитозину, в той час як у тварин – до 8% [31, 60, 292]. Метиловані залишки цитозину присутні у симетричних (CpG, CpNpG, де N – будь-яка основа відмінна від гуаніну), доля яких переважає і може складати до 80%, та асиметричних (CpNpN) мотивах, які переважно локалізовані в окремих локусах хромосом та індивідуальних генах [69, 112, 179, 205, 207, 261]. CpG- і CpNpG-сайти забезпечують симетрію для підтримуючого метилування залишків цитозину в обох полінуклеотидних ланцюгах ДНК. Асиметричні мотиви не мають такої здатності і їх присутність у геномі при клітинному поділі зберігається шляхом ферментативної модифікації *de novo* [69, 89, 258, 282, 292]. Багатьма дослідниками було встановлено, що в ДНК рослин CpApG- і CpTpGp-мотиви мають більше 80% метилованих залишків цитозину, в той час як у CpCpG-сайтах лише половина зовнішніх залишків цитозину ферментативно модифікована [89].

В геномі багатьох вищих рослин ферментативній модифікації можуть одночасно піддаватися як зовнішні, так і внутрішні залишки цитозину тринуклеотиду CpCpG, що показане для геному пшениці, жита, конвалії [89, 282, 292]. На думку Мазіна і Ванюшина [331] більшість метилованих залишків цитозину у CpG- і CpNpG-мотивах може входити до складу трьох родин паліндромів: РУРУ, УУРР, УУРУРР (Р – пурин, У – піримідин), в той час як все різноманіття метилованих послідовностей могло виникнути в результаті мутаційних змін 5-метилцитозину на тимін, що відбуваються внаслідок дезамінування 5mC у «прототипних» ділянках кожної з родин: G5mCCC5mC, 5mC5mCGG, 5mC5mCG5mCGG.

В тотальній ДНК рослин інтенсивно метилованими можуть бути цитозинові залишки в багатьох мотивах – сайти впізнавання рестриктаз HpaII, SmaI, PstI значною мірою метиловані в ДНК жита, HpaII, PstI, EcoRII, PvuII – в ДНК пшениці і тютюну [139], SalI, SacII, SmaI, PstI, EcoRII, PvuII – у ДНК картоплі, SmaI, PstI, SalI, PvuII – у соняшника і цукрового буряка [331, 358, 359]. Показано високий рівень ферментативної модифікації у CpG-, CpApG-, CpTrpG-сайтах, тоді як зовнішній залишок цитозину тринуклеотиду CpCpG метиловано меншою мірою. ТанDEMно повторювані послідовності ДНК детально охарактеризовано у геномах жита, кукурудзи, рису, гарбуза, цибулі, арабідопсису та інших культур, де встановлено високий рівень метилування CpG- та CpNpG-мотивів ДНК [127, 129, 233]. Крім цього, залишки цитозину можуть бути метилованими також у GrApTrpC-мотивах (сайт впізнавання MboI і Sau3AI), наприклад однієї з повторюваних послідовностей ДНК ячменю – HvRT, яка містить мономер, розміром 118 п.н. і представлена $7 \cdot 10^5$ копіями [16].

Кількісні розходження в рівні метилування рослин і тварин частково можуть бути обумовлені підвищеною інтенсивністю метилування CpNpG-мотивів ДНК рослин, але не менш важливе значення мають і розходження в структурно-функціональній організації нуклеотидних послідовностей геномів представників цих двох царств. По-перше, високий вміст повторюваних послідовностей в ДНК багатьох вищих рослин (до 80-90% від загальної кількості), по-друге, структурні гени рослин переважно представлені мультигенними родинами, що включають від кількох сотень – тисяч членів, розташованих в тому самому, чи в інших локусах, а їх експресія регулюється в часі і просторі; деякі представники таких генів не функціонують в життєвому циклі рослин. До інших особливостей геному рослин, пов'язаних з високим рівнем модифікації цитозину, відносяться поліплоїдизація і винятково широке варіювання кількості ядерної ДНК. Однак, загальна кількість різноманітних генів, що функціонують як у рослин, так і у тварин складає 3-5%, внаслідок чого можлива участь метилування у становленні і підтримці певного стаціонарного рівня транскрипційно-активних доменів хроматину вищих організмів.

Незважаючи на те, що геноми багатьох рослинних видів мають високий рівень метилування, у них також ідентифіковано близько розташовані області неметилованої ДНК – CpG-острівці [43, 53, 165]. Значну кількість таких мотивів містить ДНК кукурудзи, пшениці, жита, тютюну; такі області нерідко зв'язані з промоторними ділянками генів, зокрема дегідрофлаванол-4-редуктази, алкогольдегідрогенази, сахарозсинтетази, FIE кукурудзи [53, 358, 359].

Порівняльне, з використанням ПЛР методів, вивчення геномів рослин і тварин, показало, що повторювані елементи в них, як правило, метиловані, але для рослин характерна відсутність ферментативно модифікованих залишків цитозину в екзонах такої ДНК [196]. На думку авторів цієї роботи в рослинах специфічно метилуються транспозони, тобто, на відміну від тварин, здійснюється диференційне метилування структурних генів і транспозонів. Іншими дослідниками було показано, що в арабідопсиса на фоні високого рівня метилування перицентромерного гетерохроматину, повторюваних послідовностей і продукуючих siRNA доменів, одна третина функціональних генів в межах областей, що транскрибуються, містить 5mC і лише 5% генів мають метиловані залишки цитозину у промоторах [158, 194]. Крім ендогенних генів часто ферментативно модифікуються як промоторні, так і кодуючі області транскрипції [65].

В рослинах метилування ДНК обмежене, головним чином, ядерним геномом, тому існує думка, що для функціонування пластоми і геному мітохондрій непотрібно додаткового рівня генетичного контролю. Однак, надалі з'явилися повідомлення, що в ДНК пластид деяких видів рослин наявні модифіковані азотисті основи, поява яких корелює з диференційною експресією ряду генів хлоропластів і амілопластів і може бути механізмом для координованого контролю хлоропластного і ядерного геномів [122].

При дослідженні функції метилування в переміщенні мобільних генетичних елементів, було висловлено цікаву думку щодо контролю поширення транспозонів в геномі завдяки послідовностям, відмінним від CpG [122]. Суттєвим моментом, здатним з'ясувати функцію метилування асиметричних

мотивів ДНК рослин, є ідентифікація цитозин-С5-ДНК-метилтрансфераз та сигналів, що здійснюють селективну ферментативну модифікацію цитозину в окремих доменах геному.

Таким чином, ферментативній модифікації переважно підлягають симетричні і несиметричні мотиви ендегенних генів рослин, трансгенів і їх ядерного оточення; також не виключеним є напівметилування залишків цитозину на одному з ланцюжків подвійної спіралі ДНК. Метиловані залишки цитозину розподілені у геномі нерівномірно, найбільший вміст їх у гетерохроматинових ділянках центромер, теломер та районах ядерцевого організатора; значно метилованою виявилася ДНК мобільних елементів геному і генів рРНК, але на фоні відносно високого рівня метилування рослинної ДНК, промотори генів переважно неметиловані.

1.3.2.2. ДНК-метилтрансферази рослин

Принципове значення для розуміння ролі 5мС як складового компоненту епігенетичних явищ у процесах розвитку еукаріот має розшифрування механізмів *de novo* і підтримуючого метилування ДНК, ключове положення в яких займають ферменти ДНК-метилтрансферази (МТ). Ці ферменти було відкрито 1963 року спочатку у бактерій, а потім – у еукаріот [282]; метилування відбувається лише за участі МТ в процесі їх синтезу при реплікації [70, 292].

Модифікація і цитозину, і аденіну в ДНК відбувається в ході реакції ковалентного приєднання метильної групи у положенні 5 піримідинового, чи 6 пуринового кілець азотистих основ, з утворенням 5мС і 6мА відповідно і S-аденозилгомоцистеїну [70, 282]. Донором метильної групи виступає S-аденозил-L-метіонін, або метилкобалаїн у деяких бактерій [282]. Під час підтримуючого метилування його профіль у CpG- та CpNpG-мотивах передається в обидві дочірні нитки метилтрансферазами, які в реплікативній вилці переважно метилують напівметиловану ДНК, тоді як протягом *de novo* метилування ферментативній модифікації підлягають попередньо неметиловані залишки

цитозину. Для симетричних послідовностей достатньо, щоб метилування *de novo* відбулося один раз, після чого ферментативна модифікація проходить за рахунок активності підтримуючих метилтрансфераз [6, 23, 69].

Спираючись на гомології амінокислотних і/або полінуклеотидних послідовностей, а також передбачувані функції, метилтрансферази рослин і тварин згруповані в 4 класи: Dnmt/MET1, Dnmt2, Dnmt3, CMT – останній характерний лише для рослин. Вважається, що Dnmt2-клас представлений поки що лише MT тварин, але існують літературні дані щодо наявності в арабідопсису полінуклеотидної послідовності, здатної кодувати поліпептид, гомологічний білку Dnmt2 тварин [21, 39, 69, 183]. Вважається, що підтримуюче метилування в симетричних послідовностях рослин здійснюється ферментами класу Dnmt1/MET1 і CMT, в той час як метилування *de novo* симетричних та асиметричних послідовностей – Dnmt3 [21, 39, 183].

У більшості досліджених MT еукаріот область з консервативними мотивами злита з більшою регуляторною N-амінотермінальною ділянкою, що відсутня в прокаріот. Така область вперше була ідентифікована у Dnmt1 миші, а також виявлена в MET1 і CMT арабідопсису і виконує функцію спрямовування MT до реплікативної вилки під час синтетичної фази клітинного циклу [68, 111, 203]. Дані про те, яким чином відбувається метилування ДНК, обмежені, і стосуються переважно тварин. Вважають, що воно спряжене з реплікацією ДНК, адже експресія гена DNMT1 регулюється в клітинному циклі, цей фермент локалізований в реплікативній вилці, а його інгібування може призводити до інгібування ініціації реплікації ДНК [167]. Відомо, що DNMT1 є компонентом мультибілкового комплексу реплікації – ДНК-синтасоми, який у безклітинній системі повністю підтримує напівконсервативну реплікацію ДНК; зв'язаний з цим комплексом фермент виявляє як підтримуючу, так і *de novo* метилтрансферазну активність. Також одержані дані вказують, що метилування ДНК міцно спряжене з реплікацією через фізичну взаємодію DNMT1 та кор-компонентів реплікативного комплексу [254].

Метилтрансферази рослин мають широку варіабельність молекулярних мас: у зародках пшениці – 50 кД, у проростках цього ж виду – 85 кД, відносно низьку масу має МТ культивованих клітин рису, а з проростків гороху та рослин арабідопсису було виділено відносно високомолекулярні ферменти – 160 кД [297]. Метилування ДНК у ядрах клітин рослин може контролюватися фітогормонами, що продемонстровано для МТ зародків і проростків пшениці – деякі регулятори росту рослин підвищували рівень метилування ДНК на 30-65% *in vitro* у присутності ядерного екстракту [297].

Arabidopsis thaliana – перший вид рослин, в якому було ідентифіковано кДНК, що відносяться до родини генів метилтрансфераз MET1, і показано, що МТ еукаріот можуть кодуватися родинною генів [68, 70, 101, 109, 163]. Спочатку було виділено гени METI і METII і показано наявність у них N-амінотермінальної регуляторної ділянки, гомологічної такій самій ділянці у тваринних МТ на 24%, більш високий ступінь гомології характерний для каталітичної області ферменту – 50%. На даний момент відомо, що гени родини MET1 включають 5 членів, 4 з яких частково охарактеризовані. Два гени, METIIa і METIIІ тісно зчеплені, тоді як два інших – METI і METIIb розташовані в різних локусах. METI картований на хромосомі 5 в положенні 68,9; передбачається, що ці гени виникли від загального прашура через серії його дуплікацій. Особливістю цього класу метилтрансфераз, на відміну від тварин, є відсутність у їхніх білках цистеїн-збагаченого цинк-зв'язуючого домену і делеції з 40-41 амінокислотних залишків в області розпізнавання, а також наявність «кислої» області - можливо, саме ці відмінності і визначають *de novo* метилазну активність METI [70, 167, 204]. Відомо, що фермент MET1 здійснює головним чином підтримуюче метилування ДНК арабідопсису, існують суперечливі дані щодо передбачуваної ролі METIIІ у метилуванні [70, 125].

Серед відомих ферментів, що каталізують реакцію метилування, клас хромометилаз є специфічним для рослин. Відмінною структурною особливістю його є наявність хромодомену, представники знайдені як в одно- так і в дводольних рослинах. Вважається, що хромометилази – спеціалізований тип

підтримуючих МТ, які представляють рослинному геному іншу можливість для розповсюдження метилованих залишків цитозину, а саме, метилування симетричних та/або несиметричних послідовностей [39, 70, 120, 183]. Амінокислотні послідовності СМТ відмінні від МЕТ1 завдяки відсутності 750 амінокислотних залишків в N-термінальному регуляторному домені [240]. Порівняльне вивчення амінокислотних послідовностей хромометилаз кукурудзи ZMET2, ZMET5 і арабідопсису СМТ1, СМТ2, СМТ3 показало наявність консервативних I, IV, VI, VIII, IX, X мотивів [183].

В літературі є суперечливі відомості щодо зв'язку між метилуванням ДНК та гістонів, активно розвивається ідея, що короткі інтерферуючі РНК здатні запускати метилування несиметричних послідовностей хромометилазами, окрім метилування залишків лізину гістону H3 [41, 42, 110, 148, 176, 239].

У рослин, як і у тварин, *de novo* метилування ДНК виконують метилтрансфери класу Dnmt3, що відрізняються від тваринних будовою консервативних каталітичних мотивів [38, 39, 258]. Вважають, що гени цих метилтрасфераз необхідні для встановлення, а не підтримання процесу мовчання генів, і відповідають за підтримуюче метилування асиметричних послідовностей ДНК [38, 39, 164].

Більшість відомих генів метилтрансфераз рослин експресується як у вегетативних, так і у генеративних органах, але найвищий рівень експресії характерний для меристематичних тканин. Наприклад, експресія гена ZMET1 кукурудзи відбувається виключно в активно проліферуючих клітинах апексів, що припускає зв'язок транскрипції гена з реплікацією; також було доведено, що рівень метилування ДНК селективно зменшується під час холодowego стресу [232, 258].

Крім ферментативного приєднання метильних груп до залишків цитозину ДНК-метилтрансферазами, у геномі еукаріот 5мС може піддаватися ферментативному видаленню. Така реакція досліджена значно менше, і взагалі вважалася малоімовірною у зв'язку з тим, що для утворення цитозину із 5мС необхідне розщеплення С-С зв'язку, що є термодинамічно не вигідним. Один з

механізмів видалення CH_3 груп включає розрив лабільного глікозидного зв'язку між 5мС та дезоксирибозою у ланцюзі ДНК з наступним заміщенням його на цитозин і вивільненням метанолу [203, 273].

В літературі наводяться дані щодо існування інших ферментів і білкових факторів, які також беруть участь в метилуванні ДНК. Наприклад, у рослин ідентифікована аденін-N-6 ДНК-метилтрансфераза, яка в присутності S-аденозин-L-метіоніну метилує перший залишок аденіну симетричної послідовності одно- та дволанцюгового субстрату, надаючи перевагу першому. Припускається, що цей фермент здійснює модифікацію мітохондріальної ДНК і може брати участь в реплікації ДНК мітохондрій рослин [66].

До білкових факторів, які беруть участь в метилуванні, відносяться локус DDM1, що кодує SW12/SNF2-родинні білки, які впливають на структуру хроматину у метилованих областях геному, метилтрансферази гістонів, Polycomb білки, siRNA [360].

1.3.3. Метилування ДНК і нестабільність геному

Нормальний розвиток рослин і переважної більшості тварин є неможливим без метилування ДНК. Проте, 5мС є мутагенним чинником через можливість його спонтанного дезамінування і перетворення в тимін [360]. Зміни стану метилування ДНК тварин і рослин можуть бути пов'язані з різними процесами генетичної нестабільності. Про це, зокрема, свідчать дані, що гіпометилування, викликане обробкою клітин 5-азацитидином, чи втрата функції ДНК-метилтрансфераз призводить до зростання швидкості мутацій генів і нестабільності хромосом [314], тому є підстави вважати, що метилування мобільних генетичних елементів і сателітних повторів забезпечує захист проти транспозицій, дуплікацій і рекомбінацій.

Відомо, що структурна нестабільність трансгенних локусів може бути пов'язана з анеуплоїдією. Зокрема, в трансгенних локусах анеуплоїдних ліній тютюну крім перебудов хромосом спостерігається епігенетичне мовчання генів, і

в цьому бере участь метилування ДНК [72, 73, 360]. Також існують дані, що утворення поліплоїдів супроводжується епігенетичними змінами, де однією з детермінант є метилування цитозину, а підвищення рівня нестабільності геному супроводжується гіперметилуванням сайт-специфічних послідовностей геному кормового буряка [70, 314].

У зв'язку з питанням нестабільності геному привертають до себе увагу тандемні повторювані послідовності ДНК, нестабільні у еукаріот. Підвищений рівень мінливості в культурі *in vitro* рослин спостерігається в тандемно повторюваних послідовностях ДНК [145, 235]. В багатьох випадках генетична нестабільність повторюваних послідовностей – це наслідок різних клітинних стресів і є причиною ряду захворювань людини [79, 360].

В цілому, незважаючи на мутагенну природу 5mC, ця ферментативна модифікація є необхідним компонентом функціонування геному еукаріот, забезпечуючи як його стабільність, так і можливий захист від несприятливих факторів довкілля.

Таким чином, узагальнюючи сучасні відомості відносно ролі ензиматичного метилування ДНК, цей процес є одним із найважливіших механізмів біологічної регуляції, відіграючи ключову роль в ряді епігенетичних процесів: геномному імпринтингу, диференціюванні, апоптозі і морфогенезі. Встановлено провідну роль цього процесу в епігенетичних змінах, формуванні і стабілізації структури хроматину.

1.4. Регуляція експресії генів та метилування ДНК при дії стресових факторів

Можливість організмів пристосовуватися до умов довкілля, що змінюються, є важливою складовою процесу самоорганізації всього живого. Реакція на дію стресових факторів – системний процес, що об'єднує розвиток пошкодження, повне чи часткове відновлення вихідного стану і зміни чутливості до наступного

впливу фактору, що проявляється або в адаптації, або в сенсибілізації організму і включає в себе різноманітні реакції [188, 217].

Існують незначні, але вагомі дані про зміну профілю метилування (гіперметилування), пов'язаного з перепрограмуванням метаболізму за умов адаптації до абіотичного стресу.

1.4.1. Зміна рівня метилування при дії різних стресових факторів

Під епігенетичним стресом мається на увазі зміна в розподілі профілей метилування CpG-послідовностей в геномі, які модифікують структуру хроматину та/чи стан активності генів. Одержані дані щодо наявності механізмів захисту від епігенетичного стресу в клітинах хребетних тварин [203]. Існує припущення, що зупинка реплікації ДНК в G₀-S-фазі клітинного циклу захищає геном від глобального деметилування внаслідок відсутності чи істотного зменшення білка метилтрансферази DNMT1 – порушення в мРНК гена цієї метилтрансферази зупиняють реплікацію ДНК в різних положеннях протягом синтетичної фази. Аргументом на користь саме зупинки реплікації ДНК є той факт, що даний механізм не індукується 5-азадезоксцитидином, який, як відомо, пригнічує метилування ДНК шляхом утворення ковалентного комплексу метилтрансферази з ДНК і поступової втрати 5мС в кожному циклі поділу клітини, але не зменшує *de novo* синтез білка цього фермента [167]. Таким чином, зупинка в G₀-S-фазі зумовлюється зменшенням кількості метилтрансфераз, а не деметилуванням ДНК. Автори цього припущення вважають, що механізм стресової відповіді існує в клітинах для захисту ДНК проти помилок у її метилуванні і координації геномної та епігеномної інформації [203].

Останні дослідження вказують на наявність певних змін в рівні і профілі метилування за умов біотичного [1, 95] та різних форм абіотичного стресу – посухи [95], сольового [1, 95, 141, 281, 292] та абіотичного стресів [44].

Так, наприклад, в присутності йонів бору спостерігались зміни в метилуванні ДНК соняшника [292], обробка біхроматом калію індукувала ферментативну

модифікацію цитозину в ДНК рослин ріпаку [141], за анаеробних умов вирощування спостерігалися успадковані зміни в профілях метилування ДНК мобільних генетичних елементів рису [44], до того ж, дані варіації мали місце лише у метилуванні транспозонів і ретротранспозонів, на відміну від структурних генів. Метилування ДНК може бути пов'язане зі зменшенням експресії ендегенних генів рослин в присутності дуплікованих неалельних генів. Так, для генів *Sn* та *R* кукурудзи, що регулюють шлях біосинтезу антоціанів і кодують тканинно-специфічні продукти, гомологічні транскрипційним активаторам, було показано, що в присутності гена *R* ген *Sn* стає транскрипційно мовчазним. Цей процес опосередкований метилуванням симетричних і асиметричних залишків цитозину в промоторних ділянках мовчазних генів [207].

Л. Жонгом та ін. у 2009 р. було достовірно підтверджено наявність змін в профілях метилування пшениці внаслідок впливу сольового стресу [281]. На основі багаторічних польових досліджень [277] було показано, що вплив різних кліматичних умов призводить до зростання різноманітності профілей метилування популяцій *Jatropha curcas* L., що проявляється у значних відмінностях метилування CpG-сайтів та цитозинових острівців.

Отже, існуючі дані про зміни в профілі і рівні метилування ДНК внаслідок впливу різних стресових факторів, ще не мають точного обґрунтування і пояснення їх біологічного сенсу. Поліфункціональність феномену метилування ДНК дозволяє припустити різні сценарії участі цього процесу і в розвитку стресової реакції організмів – активізація мобільних генетичних елементів, запуск процесу геномної нестабільності, та формування активних захисних реакцій, пов'язаних з реорганізацією метаболізму.

1.4.2. Напрямки змін у метилуванні ДНК при хронічному та гострому опроміненні

Молекулярною основою особливостей хронічного низькодозового опромінення є активізація сигнальних шляхів передачі інформації про індукцію

пошкодження: затримка пересування клітин циклом, ініціація сигнальної трансдукції і транскрипції, репарація ДНК – які відрізняються від тих, що характерні для великих доз і викликають прояв різних радіобіологічних ефектів, до яких відносять радіоадаптивну відповідь [29, 37, 103, 154, 173, 197, 221], «ефект свідка» [59, 135, 174, 186, 222], радіаційно-індуковану нестабільність геному [104, 170, 276], канцерогенез [255].

Відомо, що хронічне опромінення навіть у відносно низьких дозах суттєво впливає на індукцію мутацій, що призводять до втрати ферментної активності чи зміни структури синтезованих білків [27, 75, 114], а хронічне опромінення з потужністю дози $0,2 \cdot 10^{-4}$ Гр/добу, індукує мутації в алозимних локусах з частотою, що перевищує контрольний рівень в 3,6 рази [317].

Вже зазначалося, що метилування – поліфункціональний процес, який бере участь в розвитку та реалізації стресових реакцій організму, тому логічно припустити, що профіль та рівень метилування ДНК буде змінюватися при радіаційному впливі.

На сьогодні існують досить обмежені дані щодо зміни у метилуванні залежно від дози опромінення [49, 133, 134, 192], його тривалості [133, 136].

Ковальчук І. зі співавторами [134] встановили наявність глобального гіперметилування ДНК сосни в умовах Чорнобиллю, залежного від дози радіації, поглиненої деревами. На думку авторів, цей феномен може розглядатися, як захисна реакція рослин, що запобігає геномній нестабільності, забезпечуючи життєздатність організму в екстремальних умовах довкілля. Саме на рослинах було отримано перші дані щодо зв'язку гіперметилування ДНК і адаптації до абіотичного стресу [134]. Ці дані не протирічать даним Колемана зі співавторами щодо зростання рівня метилування ДНК лімфобластів людини за умов низькодозового хронічного опромінення, що веде до зміни радіочутливості.

Показані значні відмінності в змінах профілей метилування при хронічному опроміненні в малих дозах та гострому опроміненні. Відомо, що гіпометилування ДНК спостерігається при гострому опроміненні у великих і малих дозах [61, 136]. У зв'язку з появою даних щодо дозової залежності гіпометилування було

запропоновано розглядати цей показник як біомаркер радіаційного ураження і змін радіочутливості [124].

Таким чином, узагальнюючи сказане, відмітимо, що на сьогодні дослідження ролі метилування ДНК в радіобіологічних реакціях обмежено виявленням лише основних тенденцій.

Останні дані припускають участь в процесах метилування Ріві-білків та ріRNA, що дозволяє припустити існування складної, ієрархічної системи взаємозв'язку між пошкодженнями біологічних макромолекул та хімічними модифікаціями ДНК [4, 251].

Таким чином, за останні десятиліття біологічними та медичними дослідженнями було відкрито ряд механізмів, задіяних в реалізації відповіді організму на дію біотичних та абіотичних стресових факторів. Важливу роль в цій складній ієрархічній системі відіграє феномен метилування ДНК, як поліфункціональний процес, задіяний як в розвитку пошкодження (наприклад активізація мобільних генетичних елементів, ініціація нестабільності геному), так і в формуванні активних захисних реакцій, пов'язаних з перебудовою метаболізму.

Поява методу мікрочипів обумовила революцію в дослідженні змін в експресії генів при дії різноманітних стресових факторів. Отримані дані непрямим чином підтверджують взаємозв'язок змін профілю метилування транскрибованої ДНК зі зростанням чи зниженням експресії великих груп генів, метаболічних перебудов та змін, спираючись на поведінку різних маркерів стійкості до впливу стресових факторів [11, 49, 217].

Встановлені зміни рівня і профіля метилування ДНК у відповідь на дію різних стресових факторів, ще потребують подальшого уточнення біологічного сенсу останніх. Одним з перших необхідних етапів дослідження можливої ролі цього процесу в реакціях на стрес є оцінка змін профілю метилування в різних за функціями послідовностях ДНК – сателітних і транскрибованих, і зв'язок цих змін з поведінкою біомаркерів реакцій на стрес та експресією генів.

1.4.3. Явища адаптації та метилування ДНК. Здобутки та напрямки подальших досліджень

Дослідження явищ адаптації – підвищення стійкості організму після дії невисоких доз чинників продовжується не одне десятиріччя. Основними здобутками феноменологічного етапу цих досліджень став ряд узагальнень про залежність цього процесу від цілої низки факторів.

Багатий фактичний матеріал вказує на залежність адаптації – виникнення та стійкості цього стану від часу дії чинника, що підтверджується існуванням трьох основних часових форм стратегії адаптації: негайної, акліматизації чи акліматизації та еволюційної [363]. Встановлено значний вплив на процес виникнення стану адаптованості дози чинника, потужності та інтервалу між послідовними сеансами його дії. Наприклад, при хронічному чи гострому опроміненні, або опроміненні у малих дозах виникають суттєво різні ефекти.

Відомо, що за умов гострого опромінення перехідний процес реакції організму на стрес описується гомеостатичною кривою [328] складної форми, що складається з трьох фаз: низхідної, що відображає переважання процесів розвитку пошкодження; фази відновлення і формування нового стаціонарного рівня, вихід на який відбувається шляхом затухаючих коливань навколо певного нового стаціонарного рівня, що дорівнює чи є меншим вихідного значення досліджуваної змінної. Ефекти хронічного опромінення з низькою інтенсивністю найчастіше мають нерегулярний або коливальний тип залежності, які визначаються тривалістю накопичення дози, потрібної для увімкнення захисних та відновлюваних реакцій. Такі залежності пояснюються, як результат взаємодії, взаємонакладення кількох дозових залежностей різних процесів – розвитку пошкодження, індукції захисних та відновлюваних механізмів. При цьому висока ефективність впливу малих доз пояснюється відсутністю на перших етапах впливу «увімкнення» механізмів захисту та відновлення. У зв'язку з цим, ефекти хронічного опромінення з низькою інтенсивністю мають нерегулярний чи коливальний тип залежності, що відповідає процесу накопичення дози.

На різних модельних об'єктах, включаючи цілісні організми, встановлено, що прояв адаптивної відповіді залежить від генетичних, онтогенетичних та фізіологічних особливостей організму, а у випадку вивчення реакцій клітини – від фази клітинного циклу в якій відбувається опромінення. При цьому складна система реакцій, що обіймає фізіологічну адаптацію, може призводити до таких коливань рівня ендogenous фонду радіорезистентності, що може призвести до послідовного підвищення та зниження частот цитогенетичних аномалій на фоні відносно постійного рівня дії ушкоджуючого агента навіть у генетично однорідних об'єктів [291].

Виявлено можливість перехресної або неспецифічної адаптації, тобто одночасного підвищення стійкості до дії інших стресових чинників. Явище так званої крос-адаптації спостерігали між впливом радіації та металів [71], хімікатів [26, 168] і гіпертермії [162, 249], такі дані навели на думку, що явище адаптації є лише складовою загальної відповіді цілісного організму на стрес [25].

Одночасно з розвитком та удосконаленням цитогенетичних та молекулярно-біологічних методів проходить дослідження механізмів адаптації на різноманітних біологічних системах. Здобутки різних галузей біології цілком органічно ставили питання про зв'язок змін (підвищення) радіостійкості із проходженням – стимуляцією чи індукцією репаративних та антиоксидантних процесів.

З використанням методу мікрочипів на багатьох експериментальних системах встановлено стимуляцію або зміну експресії каскаду великих груп генів, що відносяться саме до репаративної системи та системи антиоксидантного захисту. Також показана можливість взаємодій з іншими регуляторними механізмами клітини. Зокрема, при індукції систем антиоксидантного захисту, спостерігається гальмування клітинного циклу (що збільшує час для репарації) та участь сигнальних шляхів – цитокінів, кластеринів, активація протейнінази С в формуванні адаптивної відповіді. Показано, що для активації певних груп генів, пов'язаних з репарацією ДНК та стресовою реакцією клітин, необхідна активація

полі-АДФ-рибозополімерази, індукція синтезу цілої низки білків, що не приймають безпосередньої участі у репараційних процесах.

Зазначимо, що одержані на різних модельних об'єктах дані вказують на участь як конститутивних, так і індукцибельних механізмів захисту та відновлення біологічних систем від радіаційних впливів, але потенціал кожного з них та взаємозв'язок у формуванні пострадіаційної системної відповіді залишається малодослідженим. Особливо цей висновок відноситься до цілісного організму, кожний рівень організації якого має власні механізми відновлення та адаптації, взаємодія яких і визначає формування системної відповіді на стрес.

Узагальнюючи сучасні відомості відносно ролі ензиматичного метилування ДНК, відмітимо, що цей процес є одним із найважливіших механізмів біологічної регуляції, відіграє ключову роль в ряді епігенетичних процесів: геномному імпринтингу, диференціюванні, апоптозі і морфогенезі. Встановлено провідну роль цього процесу в епігенетичних змінах, формуванні і стабілізації структури хроматину.

Хоча функція метилування ДНК і є предметом активного дослідження вже понад півстоліття, її значення залишається дискусійним питанням. Тільки в останні роки з розвитком та удосконаленням молекулярно-генетичних методів досліджень та методології генетичної інженерії намітилися конкретні шляхи експериментального обґрунтування та вдосконалення основних ідей і гіпотез, що були висунуті після відкриття цього явища. Особливо зроблений висновок стосується питання про зв'язок метилування ДНК і змін у стійкості організмів до чинників стресу. Обмежені дані, що існують на сьогодні, дають досить недиференційовану картину участі процесу метилування у розвитку реакцій на біотичний і абіотичний стрес, зокрема на опромінення. При цьому відомо, що гостре опромінення у високій дозі веде до процесу масивного деметилування, подібно тому, як це відбувається в онкотрансформованій клітині. За умов хронічного опромінення та в умовах віддалених радіаційних впливів спостерігається підвищення рівня метилування. Ці факти вказують на те, що зміни рівнів та профілів метилування можуть спостерігатися як на етапах

розвитку ураження, так і відновлення, і адаптації. Важливо й те, що методичні підходи, які були використані при вивченні змін у метилуванні ДНК не дозволяли виявлення того, у яких послідовностях ДНК – сателітних, чи тих, що транскрибуються, цей процес відбувався.

Сателітна ДНК є невід’ємною компонентою геному еукаріот [123]. Вона складається з тандемно організованих повторів, не кодує білків, не транскрибується, але в ній встановлено присутність промоторів деяких генів, активних на ранніх етапах ембріогенезу [248]. Рівень метилування цитозину в цій ДНК дуже високий – це явище пов’язують з пригніченням активності мобільної ДНК, але біологічна роль змін рівня і профілів метилування цієї частини макромолекули та участь цього процесу в зміні стійкості організму на сьогодні практично невідома.

Отже, існуючі дані про зміни в профілі і рівні метилування ДНК внаслідок впливу різних стресових факторів, ще не мають точного обґрунтування і пояснення їх біологічного сенсу. Поліфункціональність феномену метилування ДНК дозволяє припустити різні сценарії участі цього процесу і в розвитку стресової реакції організмів – активізації мобільних генетичних елементів, запуску процесу геномної нестабільності, і в формуванні активних захисних реакцій, пов’язаних з реорганізацією метаболізму і зміною стійкості цілісного організму.

Важливо й те, що сучасні дані свідчать, про відсутність чіткої межі між конститутивним та індукцибельним захистом клітини від зовнішніх впливів, і взагалі, можливо активація саме конститутивної системи призводить до певних епігенетичних перебудов, що дозволяють клітині швидко адаптуватися і вижити саме за цих умов, тим самим підвищуючи резистентність нащадків. Такі епігенетичні зміни можуть реалізовуватися шляхом регуляції активності генів певними епігенетичними механізмами: метилуванням ДНК, модифікаціями гістонів, активізацією мікроРНК через зміну конформації транскрибованої ДНК, або якимось чином залучати сателітну ДНК до цього процесу з подальшим її опосередкованим впливом на ДНК, що транскрибується.

Наступне ключове питання відноситься до взаємозв'язку формування адаптивних реакцій і змін у характері – рівнях і профілях метилування обох форм ДНК. З погляду на величезний обсяг експериментальних даних, що вказують на різноманітні за своїм часом індукції форми радіадаптації, на сьогодні відсутні відомості відносно швидкості та характеру зміни як рівнів, так і профілів метилування відмінних за своїм функціональним значенням послідовностей ДНК.

Одним з найважливіших питань в дослідженні явища адаптації, тобто підвищення стійкості організму та/або окремих біологічних процесів, є його зв'язок з вихідною, ендегенною стійкістю. Відомо, що явище ендегенної радіостійкості визначається багатьма факторами, сполучення яких, з погляду на сучасне надбання радіобіології, визначає ендегенний фон радіостійкості організму. У зв'язку з цим невід'ємним питанням, що виникає при аналізі ролі процесу метилування ДНК у визначенні стійкості та її підвищенні при адаптації є його зв'язок з «початковими умовами» - станом стійкості організму і характером метилування ДНК до дії стресового фактору.

Перелік сформульованих питань став основним при виконанні дисертаційної роботи, мета якої - виявлення ролі метилування ДНК як складової епігенетичної регуляції радіадаптації рослин до іонізуючого та УФ-С випромінювань.

Для реалізації поставленої мети в роботі вирішували такі завдання:

1. Дослідити участь процесів метилування сателітної та ДНК, що транскрибується, як складових епігенетичної регуляції при формуванні радіоадаптивної реакції.

2. Виявити залежність переходу від підтримуючого метилування до метилування ДНК *de novo* від проміжку часу між послідовними сеансами гострого УФ-С опромінення та дослідити вплив збільшення цього інтервалу на прояви адаптивної реакції і зміни профілів метилування.

3. Виявити особливості метилування *de novo* функціонально різних послідовностей ДНК при формуванні радіоадаптивної реакції за різних режимів опромінення: «адаптивне - ударне», хронічне, комбіноване опромінення;

4. Дослідити зв'язок активності проростання насіння із станом метилування обох форм ДНК, радіочутливістю та радіостійкістю проростків.
5. Оцінити зв'язок адаптивного потенціалу рослини із вихідним станом метилування обох функціональних форм ДНК.
6. Дослідити щільність статистичного зв'язку між змінами профілів метилування ДНК та радіорезистентності рослин за показником частоти хромосомних аберацій за різних режимів опромінення.

ГЛАВА 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика гібридів кукурудзи, використаних у роботі

Вихідним матеріалом для досліджень слугували 2 гібриди кукурудзи *Zea mays* L. – Поліський 177 МВ і Титан 220 СВ, оригінаторами яких є Інститут фізіології рослин та генетики НАН України та Черкаський інститут агропромислового виробництва УААН. Ці гібриди занесено до Державного Реєстру гібридів рослин України з 1999 (Поліський) та 2000 року (Титан) і рекомендовано для вирощування на зерно і силос в зонах Лісостепу, Степу і Полісся [338, 339].

Біологічні характеристики гібридів. Титан 220 СВ – середньоранній гібрид з вегетаційним періодом від 113 до 120 днів. Рослини в середньому висотою до 215-230 см, на головному стеблі 10-12 надземних вузлів і 16 листків. Качан циліндричної форми, формується на висоті 75-80 см, довжина 18-21 см, маса 220-250 г, 16 рядів зерен, добре озернена верхівка. Зерно кременисто-зубоподібне, жовтого кольору, маса 1000 зерен 280-300 г [339].

Поліський 177 МВ – ранньостиглий гібрид з вегетаційним періодом від сходів до повної стиглості – 99-108 днів. Рослини в середньому висотою 218-225 см, надземних вузлів на стеблі – 11-12, листків – 14-15. Качан циліндричної форми, формується на висоті 80-85 см, маса – 215-223 г, 16 рядів зерен, добре озернена верхівка. Зерно кременисто-зубоподібне, жовтого кольору, маса 1000 зерен – 232-240 г [338].

Оцінки радіобіологічних характеристик гібридів. Перед плануванням циклу експериментальних досліджень було проведено оцінки радіобіологічних характеристик гібридів кукурудзи, використаних в роботі. Відомо, що частота цитогенетичних аномалій (Аб, %) є визнаним маркером радіаційного впливу [220]. Оцінювали три важливі цитогенетичні параметри: частоту цитогенетичних

аномалій, їх спектр (хромосомні чи хроматидні аберації та їх види) та мітотичний індекс (МІ, %), залежно від дози опромінення.

В якості пошкоджуючих доз використовували гостре УФ-С-опромінення 3-добових проростків двох гібридів кукурудзи: Поліський 177 МВ і Титан 220 СВ за допомогою опромінювача бактерицидного ОБН-150М (Україна) з лампами Philips Special TUV 30 W, потужність дози - $6,25 \text{ Вт/м}^2$, довжина хвилі УФ-С – 253 нм. Застосовані дози: 1 кДж/м^2 , 3 кДж/м^2 , $6,2 \text{ кДж/м}^2$, $7,2 \text{ кДж/м}^2$ та 9 кДж/м^2 .

На рис. 2.1 наведено дозові залежності частоти цитогенетичних аномалій (Аб, %) для гібридів Поліський 177 М і Титан 220 СВ. Як видно з графіку, криві дуже відрізняються між собою. За всього діапазону використаних доз спостерігається зростання Аб, % відносно контролю для Поліського гібриду. Цікаво, що доза в $7,2 \text{ кДж/м}^2$ спричиняє більшу Аб, % ніж доза в 9 кДж/м^2 . Це можна пояснити активізацією функціонування пунктів перевірки клітинного циклу і успішною репарацією ДНК від пошкоджень.

Для гібриду Титан характерна немонотонна дозова залежність, що характеризується кількома екстремумами за частотою цитогенетичних аномалій. Перший – при дозі 1 кДж/м^2 , характеризується її зниженням відносно контрольного варіанту. Такий результат пояснюється активізацією роботи систем репарації ДНК опромінених клітин. Другий екстремум – при дозі $6,2 \text{ кДж/м}^2$ характеризується максимальною Аб, %, що може бути спричинене арештом клітинного циклу для забезпечення якісної репарації і виходом G_0 -клітин із стану спокою для відновлення клітинного складу меристематичної тканини. Дози $7,2$ та 9 кДж/м^2 спричиняють поступове зниження частоти цитогенетичних аномалій, можливо внаслідок відновлення ДНК пошкоджених опроміненням клітин.

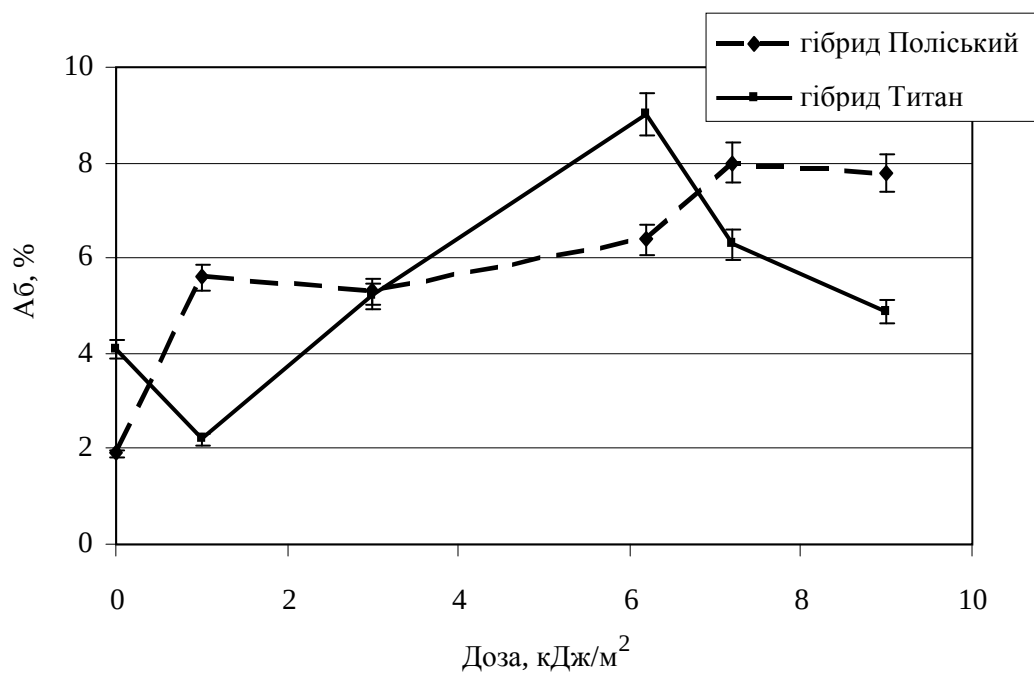


Рис. 2.1. Дозові залежності частоти цитогенетичних аномалій (Аб, %) для гібридів Поліський 177 МВ і Титан 220 СВ.

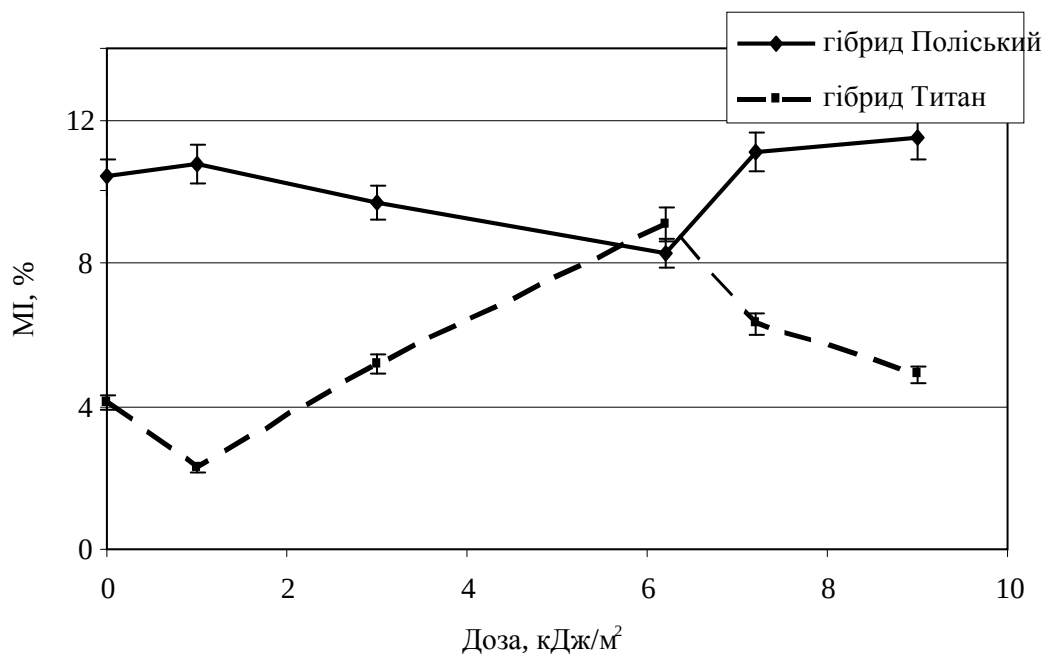


Рис. 2.2. Дозові залежності виходу мітотичного індексу (МІ, %) для гібридів Поліський 177 МВ і Титан 220 СВ.

Отже, вигляд таких дозових залежностей Аб, % може бути спричинений по-перше, гетерогенністю меристематичної тканини, так як до її складу входять клітини, що діляться і ті, що перебувають в стані спокою; по-друге – стратегією організму відновити клітинний склад меристеми. Адже при опроміненні і пошкодженні ДНК клітин запускаються системи репарації і зупиняється клітинний цикл для оптимального відновлення структури ДНК [312, 313].

Аналіз залежності МІ, % від дози опромінення для дослідних гібридів наведено на рис. 2.2. Поліський характеризується достовірним зростанням МІ, % на 4 добу після опромінення в дозах 1, 7,2 та 9 кДж/м², що може бути пов'язане з виходом в клітинний цикл клітин, що перебували в стані спокою, або активізацією швидкої SOS-репарації.

Співставлення цього показника з Аб, % (рис. 2.1) показує, що останній параметр зростає відносно контролю, отже нормальної повноцінної репарації не відбувається і чек-пойнти клітинного циклу не функціонують в повному обсязі. Опромінення в дозах 3 та 6,2 кДж/м² характеризується, навпаки, зниженням МІ, % відносно контролю і високою Аб, %. Такий феномен можна пояснити арештом клітин, що діляться мітотично і зупинкою клітинного циклу.

Показники МІ, % для Титану при дозі 3 кДж/м² ілюструють достовірне зростання цього параметру відносно контролю і порівняно низьку Аб, % (рис. 2.1-2.2), можливо, внаслідок відновлення меристемою свого клітинного пулу за рахунок клітин в стані спокою. Подальше спадання цитогенетичних показників свідчить або про виснаження меристеми і загибель клітин, або про арешти мітотичних клітин в пунктах перевірки.

Співвідношення цитогенетичних аномалій визначали за наступними критеріями: походження аберацій – хромосомні чи хроматидні, а також тип аномалій – мости, фрагменти, хромосоми чи хроматиди, що відстають.

На рис. 2.3 зображено співвідношення Аб, % за різних доз опромінення.

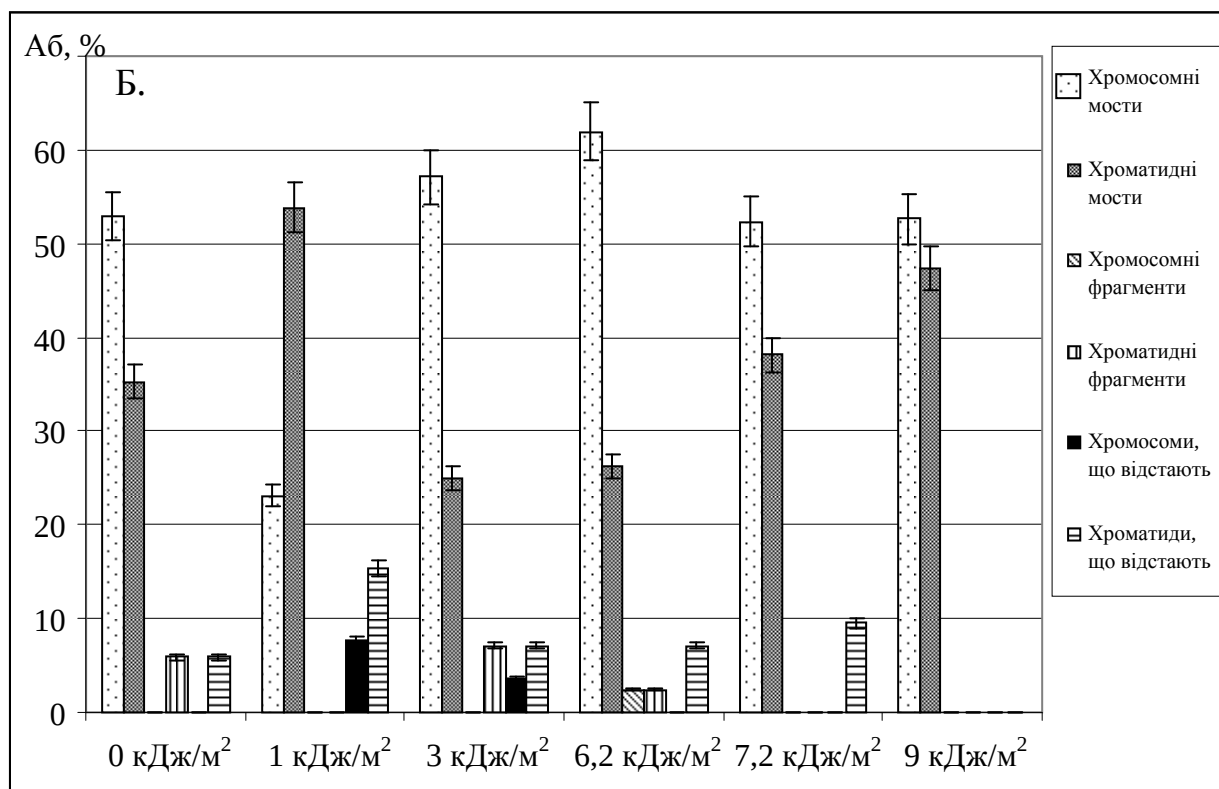
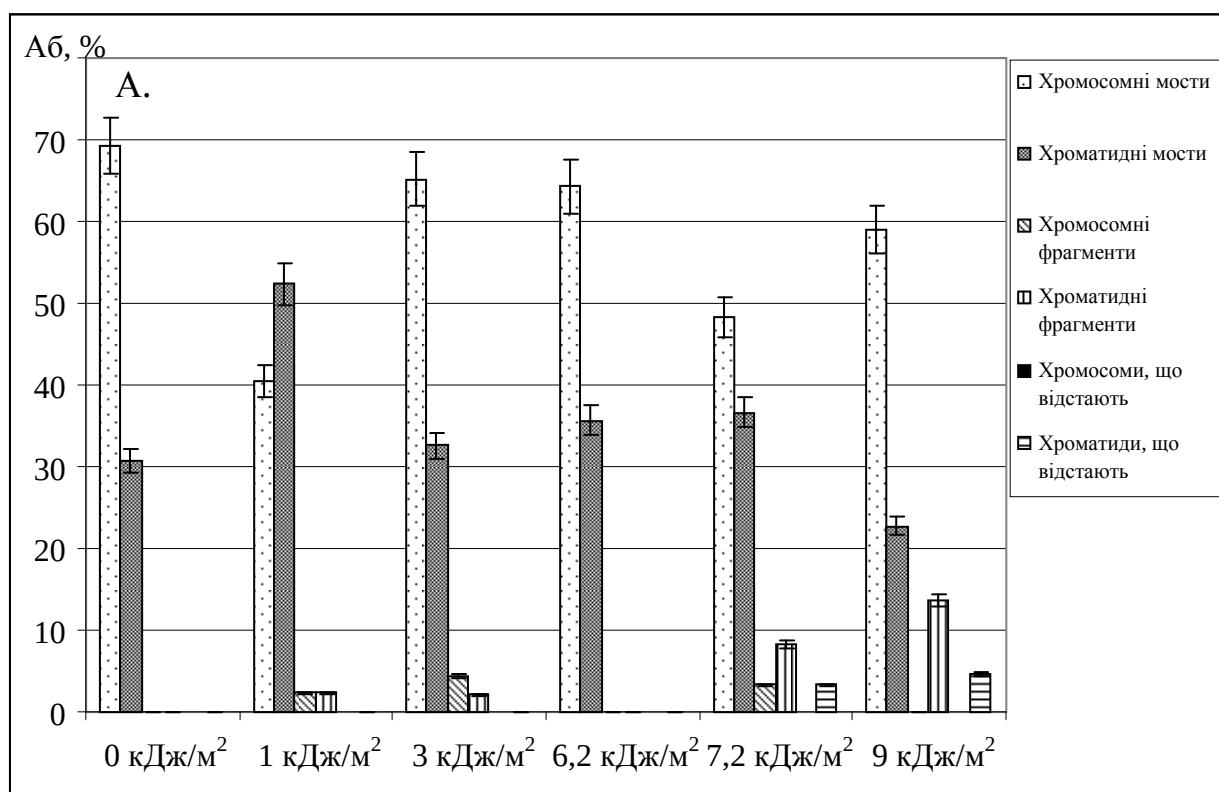


Рис. 2.3. Співвідношення цитогенетичних аномалій за різних доз опромінення для гібридів Поліський 177 МВ (А) і Титан 220 СВ (Б).

Для обох гібридів характерна поява великої кількості мостів – як хромосомних, так і хроматидних: для Поліського найбільша Аб, % для контрольного, неопроміненого варіанту, в усіх дослідних варіантах цей показник нижчий відносно контролю (рис. 2.3, А). Для Титану найбільша частота таких аномалій характерна при опроміненні в дозі 6,2 кДж/м², що корелює з пошкоджуючим впливом даної дози (рис. 2.2, Б-2.3, Б).

Для Титану характерний більш широкий спектр цитогенетичних аномалій – як у контролі, так і в дозах до 7,2 кДж/м², а опромінення в дозі 9 кДж/м² стимулювало появу лише хромосомних і хроматидних мостів (рис. 2.3, Б).

Для Поліського, навпаки, опромінення в дозі 9 кДж/м² призвело до широкого спектру аномалій – хроматидних фрагментів і хроматид, що відстають (рис. 2.3, А). Найвужчий характерний для опромінення в дозі 6,2 кДж/м².

Порівняння спектру хромосомних аберацій за умов гострого УФ-С-опромінення з аналогічним показником, що одержано за умов хронічного гамма-опромінення свідчить, що відмінності між ними полягають у відсутності за останніх умов виходу хроматидних фрагментів.

2.2. Режими опромінення та методи проведення досліджень

В дослідженнях було викростано насіння і 3-7-добові проростки двох гібридів кукурудзи: Поліський 177 МВ і Титан 220 СВ. При проведенні дослідів дотримувались оптимальних для проростання насіння і проростків умов. Насіння пророщували на піддонах зі зволженим фільтрувальним папером, в термостаті за температури +22-+24⁰С. Проростки висаджували на решітки, які розташовували на ємкостях, заповнених вістояною чистою водою таким чином, щоб корені проростка була занурені в воду повністю. При проведенні опромінення проростки переносили на ємність без води. Повторюваність кожного експерименту – семикратна-восьмикратна.

Режими опромінення. Гостре фракціоноване УФ-С-опромінення проростків з різними часовими інтервалами; гостре опромінення в режимі

«адаптивна – ударна доза» з різними часовими інтервалами; хронічне опромінення насіння; комбіноване опромінення: УФ-С-опромінення проростків, що походили з попередньо гамма-опроміненого сухого насіння. Для гострого УФ-С-опромінення використовували опромінювач бактерицидний ОБН-150М (Україна) з лампами Philips Special TUV 30 W, потужність дози - 6,25 Вт/м², довжина хвилі УФ-С – 253 нм. В якості джерела хронічного гамма-опромінення насіння використовували скляну ємність з розчином солі ¹³⁷CsCl, потужність дози складала 12,9 мкА/кг.

В першій серії експериментів було застосовано такі варіанти:

- 1 – контроль (проростки, що не опромінювалися);
- 2 – 1 год (проростки, що отримали послідовні фракції опромінення з інтервалом 1 год);
- 3 – 4 год (проростки, що отримали послідовні фракції опромінення з інтервалом 4 год);
- 4 – 1 доба (проростки, що отримали послідовні фракції опромінення з інтервалом 1 доба);
- 5 – 0 год (проростки, що отримали повну дозу при одномоментному опроміненні).

При використанні комбінованого опромінення, тобто хронічного гамма-опромінення сухого насіння з наступним гострим УФ-С-опроміненням проростків, дослідження проводили з використанням гібриду Титан.

Проростки, отримані як з попередньо гамма-опроміненого сухого насіння (накопичена доза – 4-4,5 Гр), так і неопроміненого насіння, опромінювали УФ-С в режимі «адаптивна-ударна доза» з використанням двох часових інтервалів між опроміненнями – 4 години і 1 доба. В результаті отримані дві групи проростків – без попереднього гамма-опромінення (НО) насіння і з попередньо гамма-опроміненого насіння (ПО). Експеримент включав 12 варіантів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1.

Дослідні варіанти другої серії експериментів

Варіанти		Хронічне гамма- опромінення		Опромінення УФ-С в режимі «адаптивне-ударне»			Часовий інтервал між адаптивним і ударним опромінення ми	
		ПО	НО	АД	УД	ПД	$\Delta t=4$ год	$\Delta t=24$ год
1.	НО, контроль		+					
2.	НО, АД		+	+				
3.	НО, АД+УД, $\Delta t=4$ год		+	+	+		+	
4.	НО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3)		+			+		
5.	НО, АД+УД, $\Delta t=24$ год		+	+	+			+
6.	НО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5)		+			+		
7.	ПО, контроль	+						
8.	ПО, АД	+		+				
9.	ПО, АД+УД, $\Delta t=4$ год	+		+	+		+	
10.	ПО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9)	+				+		
11.	ПО, АД+УД, $\Delta t=24$ год	+		+	+			+
12.	ПО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11)	+				+		

Дослідження впливу початкового стану метилування обох форм ДНК на радіостійкість рослини і подальший розвиток адаптивної реакції проведене шляхом виділення в довільній вибірці насіння гібриду кукурудзи Поліський 177

МВ субпопуляції, які мають різну швидкість проростання, з подальшим УФ-С опроміненням в різних режимах кожної із них.

Проростаюче насіння було розділене на 3 групи. До субпопуляції, що проростає швидко, (ШП) було віднесене насіння, що проростає через добу після замочування, до насіння середньої швидкості проростання (СП) те, що проростає між першою та другою добою, до субпопуляції з повільною швидкістю проростання (ПП) - насіння, яке проростає на третю добу набульбавіння.

Третя серія експерименту включала 6 варіантів (табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

Дослідні варіанти третьої серії експериментів

Варіанти		Гостре УФ-С опромінення в дозі 7,2 кДж/м ²		Групи проростків, залежно від швидкості проростання		
		опромінені	неопромінені	ШП	СП	ПП
1.	ШП		+	+		
2.	ШП+УФ-С	+		+		
3.	СП		+		+	
4.	СП+УФ-С	+			+	
5.	ПП		+			+
6.	ПП+УФ-С	+				+

В останній серії експериментів при комбінованому УФ-С-опроміненні епігенетично-різних проростків в режимі «адаптивна-ударна доза» з різними часовими інтервалами, використовували насіння і проростки гібриду Поліський 177 МВ. На другу добу проростаюче насіння було розділене на 3 групи, залежно від швидкості проростання: ШП, СП, ПП.

Тридобові проростки опромінювали УФ-С в режимі «адаптивна-ударна доза» з використанням часових інтервалів в 4 години та 1 добу. Експеримент включав 18 варіантів (табл. 2.3).

Таблиця 2.3.

Дослідні варіанти четвертої серії експериментів

Варіанти		Групи проростків, залежно від швидкості проростання			Опромінення УФ-С в режимі «адаптивне-ударне»			Часовий інтервал між адаптивним і ударним опроміненнями	
		ШП	СП	ПП	АД	УД	ПД	$\Delta t = 4$ год	$\Delta t = 24$ год
1.	ШП, контроль	+							
2.	ШП, АД	+			+				
3.	ШП, АД+УД, $\Delta t = 4$ год	+			+	+		+	
4.	ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3)	+					+		
5.	ШП, АД+УД, $\Delta t = 24$ год	+			+	+			+
6.	ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5)	+					+		
7.	СП, контроль		+						
8.	СП, АД		+		+				
9.	СП, АД+УД, $\Delta t = 4$ год		+		+	+		+	
10.	СП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9)		+				+		
11.	СП, АД+УД, $\Delta t = 24$ год		+		+	+			+
12.	СП, ПД		+				+		

	(одночасно з опроміненням варіанта 11)								
13.	ПП, контроль			+					
14.	ПП, АД			+	+				
15.	ПП, АД+УД, Δt=4год			+	+	+		+	
16.	ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9)			+			+		
17.	ПП, АД+УД, Δt=24год			+	+	+			+
18.	ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11)			+			+		

Цитогенетичні дослідження проводили на апікальній меристемі кореня. Відбір проб для цитогенетичного аналізу проводили на 4 добу після опромінення. Після відокремлення від кореня, апекси занурювали в фіксатор Бродського (оцтова кислота : етиловий спирт : формалін = 0,3 : 1 : 3) на дві години. Після цього промивали 70% етиловим спиртом (3-4 рази). Мацерацію проводили за допомогою лужного гідролізу 20% NaOH протягом 2 годин; відмивали дистильованою водою 15 хвилин. Для фарбування застосовували суміш ацетоорсеїну та соляної кислоти (ацетоорсеїн : 1 М HCl= 1: 1) протягом 16-18 годин. Пофарбований матеріал промивали 45%-ою CH₃COOH, а потім – готували давлені препарати. Використовували по 10 паралельних проб та аналізували по 5-10 тис. клітин. Беручи до уваги специфіку рослинних тканин, дослідження хромосомних аберацій проводили анафазно-телофазним методом. Вибірка клітин в анафазі кожного препарату складала не менше 300-350.

Молекулярні методи дослідження. ДНК виділяли з пагонів 6-добових проростків кукурудзи з використанням набору реагентів DiatomTM DNA Prep100

на базі NucleoS-сорбенту. Використовували стандартний протокол для виділення ДНК фірми-постачальника.

Вимірювання концентрації отриманого розчину ДНК проводили на спектрофотометрі BioPhotometer Plus Eppendorf v.1.35 з використанням стандартної методики [7].

Рестрикційний аналіз проводили в чотириканальному ДНК-ампліфікаторі «Терцик». Використовували 3 типи рестриктаз: MspI (5'...C*CGG...3'), HpaII (5'...CCGG...3') та MboI (5'...GATC...3') (фірма Fermentas, Німеччина) за стандартним протоколом фірми-постачальника.

Складові реакції рестрикції наведено в таблиці 2.4. Умови проведення реакції рестрикції: 16 год за температури 37°C, зупинка реакції - 20 хв за 65°C (для HpaII та MboI) і 20 хв за 80°C (для MspI).

ПЛР, як і реакцію рестрикції, проводили в чотирьохканальному ДНК-ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», Москва). Використовували праймери до мінісателітних послідовностей ISSR (inter simple sequence repeat 15-сорто, послідовність - 5'-AC-AC-AC-AC-AC-AC-AC-AC-<C>-3'), а також праймери до транскрибованих послідовностей ITS1 (internal transcribed spacer 1, послідовність - 5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3'), та ITS4 (internal transcribed spacer 4, послідовність - 5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'). Обидва типи праймерів синтезовані фірмою «Metabion» (Німеччина). Використовували набір реагентів GenPak[®] PCR Core – ліофілізовані сухі суміші, готові для ампліфікації ДНК. Складові ПЛР наведено в таблиці 2.5.

Ампліфікація з ISSR-праймерами складалася з наступних етапів: початкова денатурація 5 хв за температури 94°C, 40 циклів; денатурація за температури 94°C - 45 сек, відпалювання праймерів 52°C - 45 сек, елонгація за температури 72°C - 90 сек; кінцева елонгація тривала 7 хв за температури 72°C [244].

Таблиця 2.4

Складові реакції рестрикції і сайти впізнавання рестриктаз

Рестриктаза і сайт впізнавання	Складові реакції				Загальний об'єм*
	Ферме нт	10х буфер Tango	геномн а ДНК	деіоніз ована вода	
HpaII 5'...C↓CGG...3' 3'...GGC↑C...5'	0,2 од. (0,3 мкл)	2 мкл	500 нг (5 мкл)	17,7 мкл	25 мкл
MboI 5'...C*↓GATC.....3' 3'.....CTAG↑*C...5'					
MspI 5'...C↓*CGG...3' 3'...GGC*↑C...5'	0,6 од. (0,9 мкл)			17,1 мкл	

*Суміш вкривали 20 мкл вазелінової олії

ПЛР з використанням ITS-праймерів складалася з наступних етапів: початкова денатурація протягом 1,5 хв за 94°C, 5 циклів; потім – додатково 40 циклів денатурації за температури 94°C - 15 сек; відпалювання праймерів – за температури 55°C - 15 сек та елонгація при 72°C - 15 сек. Наступне - «закріплення»: денатурація за температури 94°C - 10 сек, відпалювання праймерів за умов 55°C - 10 сек; елонгація за умов 72°C - 10 сек; кінцева елонгація - 5 хв при 72°C [14].

Отримані продукти ПЛР та рестрикційного аналізу розділяли в 1,0% агарозному гелі з ТБЕ-буфером в присутності бромистого етидію і візуалізували на UV-трансілюмінаторі. При постановці електрофорезу в лунки гелю вносили однаковий об'єм продуктів ПЛР та рестрикції – 5 мкл. В якості маркерів молекулярної ваги використовували GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use

Таблиця 2.5

Складові полімеразної ланцюгової реакції

	ISSR-ПЛР	ITS-ПЛР
Тaq-полімераза, інгібована для «швидкого старту»	1 од.	
PCR-розчинник	10 мкл	
MgCl ₂	2,5 мМ	
dNTP	по 200 мкМ	
Праймер	ISSR – 0,1 мМ (1,6 мкл)	ITS1 – 0,1 мМ (0,8 мкл)
		ITS4 – 0,1 мМ (0,8 мкл)
геномна ДНК	200 нг (2 мкл)	
вода деіонізована	6,4 мкл	
Загальний об'єм суміші*	20 мкл	

*Суміш вкривали 20 мкл вазелінової олії

(Fermentas), з довжиною фрагментів 1000, 750, 500, 250 і 50 пар нуклеотидів; FastRuler 10000-500 bp High-Range DNA Ladder ready-to-use (Fermentas) з довжиною фрагментів 10000, 4000, 2000, 1000 і 500 пар нуклеотидів; FastRuler 1500-50 bp Low-Range DNA Ladder ready-to-use (Fermentas), з довжиною фрагментів 1500, 850, 400, 200 і 50 пар нуклеотидів.

Методи статистичного аналізу. Статистичну обробку отриманих даних, включаючи обчислення лінійної кореляції Браве-Пірсона та рангової кореляції Спірмена виконували з використанням традиційних методів статистичного аналізу [325] у електронних таблицях Office Excel.

ГЛАВА 3

ЗВ'ЯЗОК ЗМІН ПРОФІЛІВ МЕТИЛУВАННЯ ДНК З РАДІОСТІЙКІСТЮ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ФРАКЦІОНОВАНОГО ОПРОМІНЕННЯ РОСЛИНИ

Дослідження, що здійснюється на цілісній рослині, повинно враховувати існування ієрархічної структури захисних реакцій організму та різницю у часах їх розвитку. Наприклад, відомо, що репарація одониткових розривів здійснюється за 1-4 години, а двониткових – за 24 години [300], швидкість відновлення клітинного поділу після опромінення займає від 3 до 7 діб [308].

Тому запропонована схема експерименту поєднує різні часові інтервали між фракціями опромінення (1, 2, 4, 24 години) з подальшим дослідженням динаміки цитогенетичних показників протягом декількох діб і направлена на виявлення ключових – популяційних, клітинних та внутрішньоклітинних процесів розвитку ураження і відновлення, а також має вказати на їх зв'язок з тією частиною епігенетичних змін, які пов'язані з процесами метилування ДНК.

3.1. Оцінка мітотичного індексу та частоти хромосомних аберацій

Одержані дані свідчать, що при фракціонованому опроміненні у повній дозі від 6,2 до 9 кДж/м² для всіх інтервалів між фракціями через добу спостерігається різке зниження відсотку мітотичних клітин, що відображає зупинку у «точках перевірки» (checkpoints) руху клітин циклом. Вивчення динаміки цитогенетичних показників залежно від часу після опромінення при фракціюванні дози 7,2 кДж/м² (3,6+3,6 кДж/м²) з інтервалами між фракціями 1, 2, 4 години та 1 доба свідчить про складну динаміку МІ, % та Аб, % (рис. 3.1, А-Г).

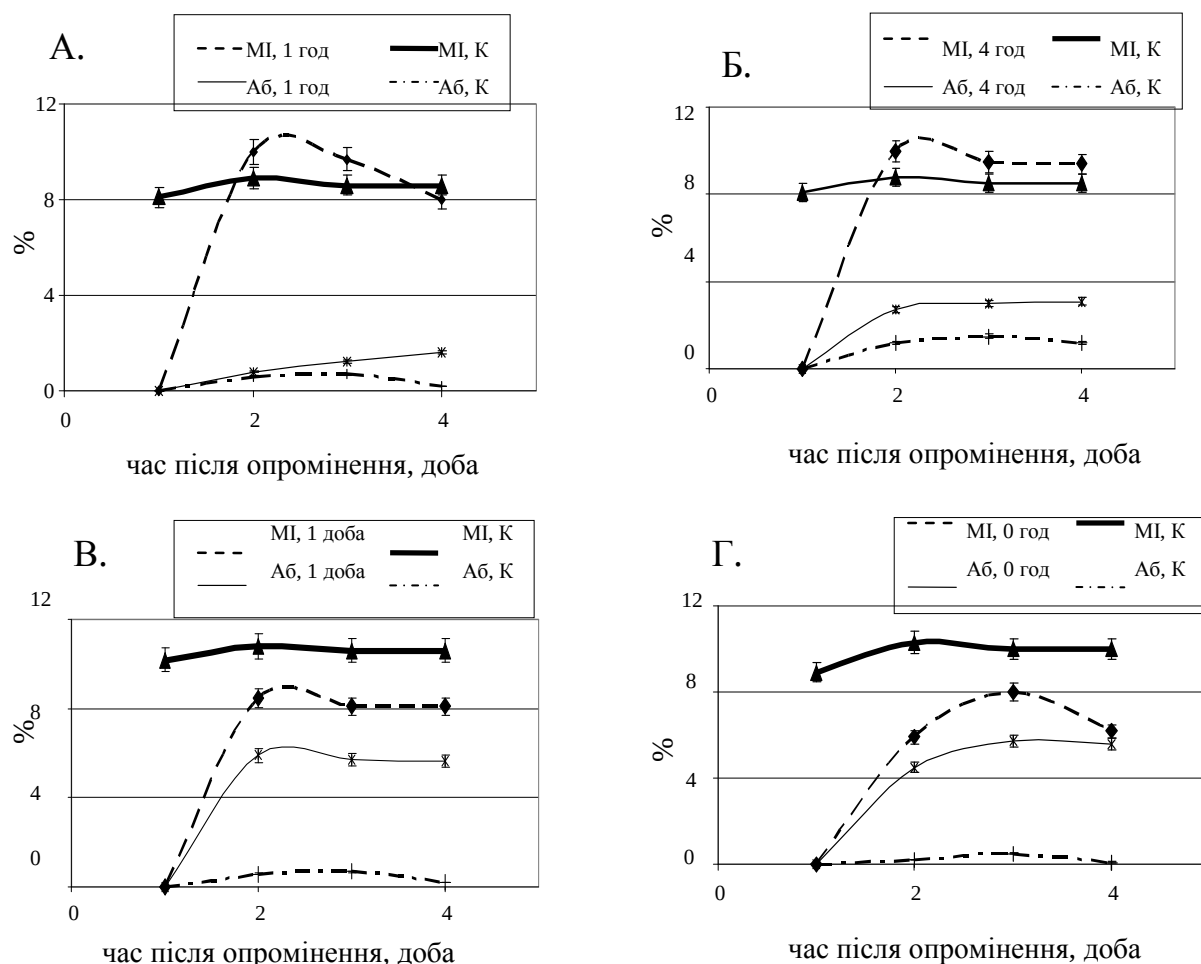


Рис. 3.1. Динаміка цитогенетичних показників при фракціюванні УФ-С опромінення в дозі 7,2 кДж/м². А – інтервал між фракціями 1 година, Б – інтервал між фракціями 4 години, В – інтервал між фракціями 1 доба, Г – інтервал між фракціями 0 годин.

На другу – третю добу після опромінення затримка змінюється значним зростанням цих показників («хвилею мітозів») (рис. 3.1, А-Г) з наступним зниженням і поверненням до стану, близького до стаціонарного на 4 добу, значення якого визначається інтервалами між фракціями і дозою опромінення (рис. 3.2). Відповідно зростання долі клітин, що перебувають у фазі мітозу, спостерігаються і зміни частоти хромосомних аберацій. За цим критерієм (рис. 3.2) відсутнє монотонне зростання відносної радіорезистентності залежно від часу між фракціями, що очікувалось би при функціонуванні відомих

внутрішньоклітинних механізмів зміни цього показника, наприклад, зростанні ефективності репарації чи антиоксидатних процесів.

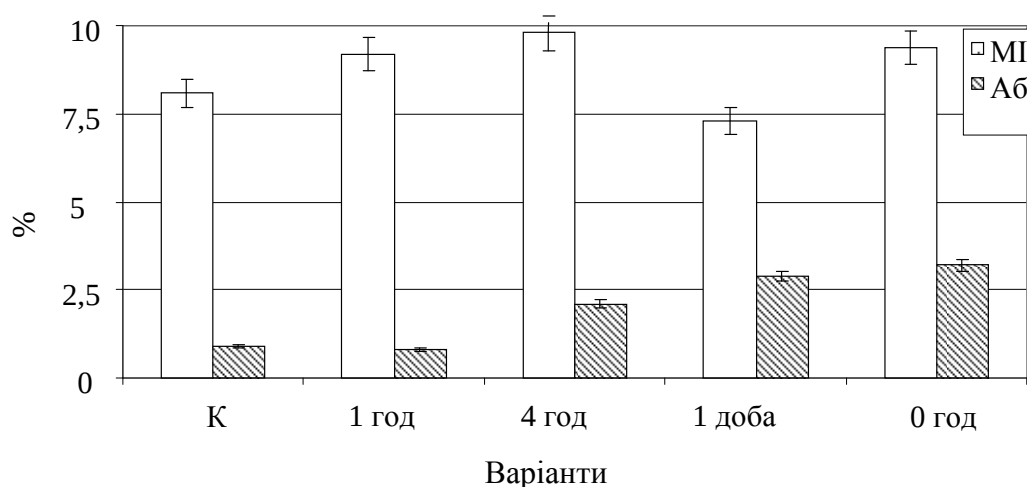


Рис. 3.2. Вплив тривалості міжфракційного інтервалу на мітотичний індекс (МІ, %) та частоту хромосомних аберацій (Аб, %) на 4 добу після фракціонованого УФ-С опромінення в сумарній дозі 7,2 кДж/м².

Отже, отримані дані вказують, що при інтервалах між фракціями в 1 та 4 години відбувається активізація поділу клітин для відновлення меристематичних тканин або вихід клітин спокою з G₀ фази. Щодо інтервалу між фракціями в 1 добу, не відбувається достовірного зростання мітотичного індексу, що може бути пов'язане із довшим перебуванням клітин в точках перевірки клітинного циклу (checkpoints).

На рис. 3.3 зображена динаміка цитогенетичних параметрів при фракціюванні дози 9 кДж/м² з інтервалами між фракціями 1 година (рис. 3.3, А), 4 години (рис. 3.3, Б), 1 доба (рис. 3.3, В) та без фракціювання, тобто коли опромінення в повній дозі відбувалось одномоментно (рис. 3.3, Г). Проби відбирали в різний час після опромінення: на 1, 2, 3 та 4 добу. При фракції 4 години спостерігається чітке зниження мітотичного індексу відносно контрольного варіанту, що може свідчити про блокування клітинного циклу і зупинку клітин для перевірки цілісності ДНК; найнижча частота хромосомних

аберацій, порівняно з іншими варіантами, може вказувати на загибель усіх опромінених клітин і відновлення наповнення меристеми непошкодженими клітинами, що перебували в стані спокою (рис. 3.3, Б).

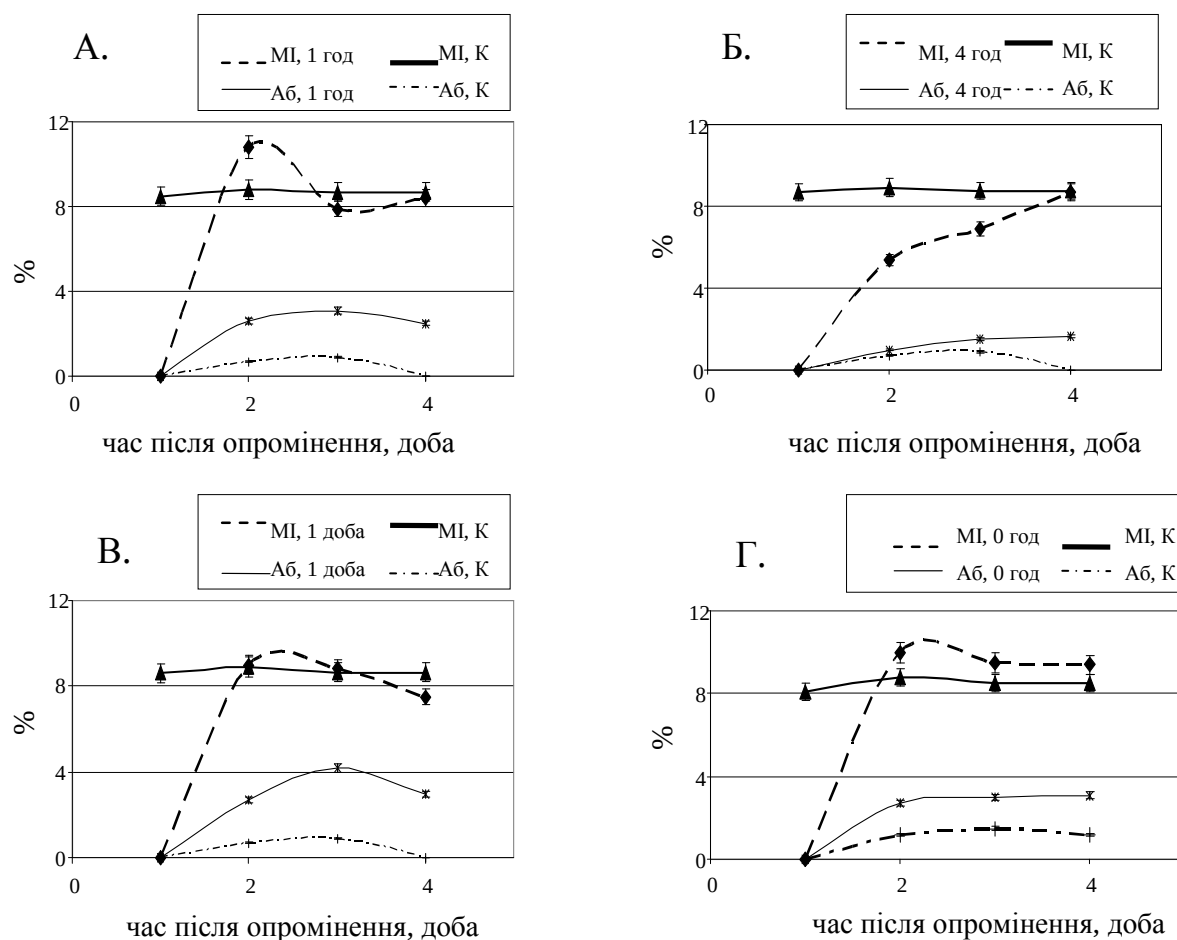


Рис. 3.3. Динаміка цитогенетичних показників при фракціюванні УФ-С опромінення в дозі 9 кДж/м². А – інтервал між фракціями 1 година, Б – інтервал між фракціями 4 години, В – інтервал між фракціями 1 доба, Г – інтервал між фракціями 0 годин.

Судячи з рис. 3.3 (А-Г) для всіх варіантів характерні хвилі мітозів, що може бути пов'язано із зняттям арешту клітинного циклу і виходом в нього клітин, які перебували на стадії перевірки. Гістограма (рис. 3.4) показує, що за критерієм Аб, % не спостерігається монотонного зростання радіочутливості зі зростанням часу між фракціями, що слід очікувати при функціонуванні відомих внутрішньоклітинних механізмів зміни радіочутливості, наприклад збільшення

ефективності репарації чи антиоксидатних процесів. Це змушує повернутися до найважливішого теоретичного питання про механізми суттєвої нелінійності і немонотонності відповіді біосистем на дію стресового фактору.

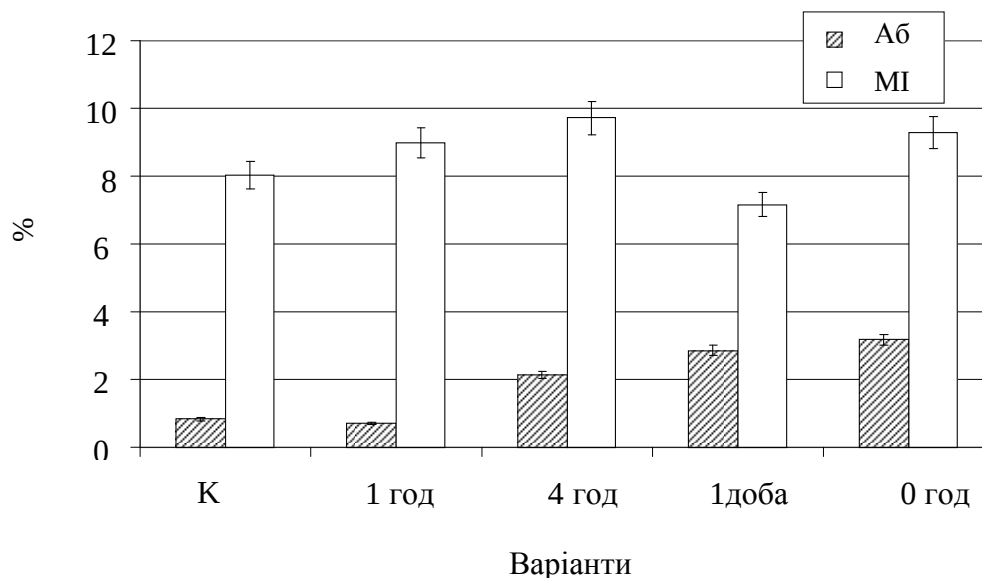


Рис. 3.4. Вплив тривалості міжфракційного інтервалу на мітотичний індекс (МІ, %) та частоту хромосомних аберацій (Аб, %) на 4 добу після фракціонованого УФ-С опромінення в сумарній дозі 9 кДж/м².

Результати свідчать, що при фракціонуванні дози з інтервалом 1-4 години спостерігаються пропорційне зростання МІ, % і Аб, %, не характерних для інтервалу між послідовними фракціями, що дорівнює 1 добі.

Інтерпретуючи ці явища слід враховувати не лише можливості змін в активності внутрішньоклітинних захисних і репараційних процесів після першого опромінення, але і особливості будови твірних тканин рослин [313, 319]. Меристема є гетерогенною тканиною за кількома показниками. По-перше, це асинхронна популяція з достатньо рівномірним розподілом клітин по клітинному циклу, які перебувають в різних функціональних станах і, у зв'язку з цим, мають різну радіочутливість [309]. По-друге, в меристемі знаходяться клітини в стані спокою: стовбурові клітини центру спокою і невелика частина клітин, розподілених в меристемі дифузно [311]. Для таких систем потенційно можливі

три механізми виникнення «хвилі мітозів», що спостерігаються після їх затримки у зв'язку з опроміненням:

1. Різке зростання тривалості мітозу;
2. Перехід до поділу клітин спокою, які менше пошкоджені опроміненням;
3. Пришвидшене проходження мітотичного циклу пошкодженими клітинами, що в момент опромінення перебувають в радіочутливих фазах циклу, без достатнього завершення репараційних процесів чи помилкової репарації.

Очевидно, що лише в останньому випадку будуть спостерігатися прямо пропорційні зміни між мітотичним індексом та частотою хромосомних аберацій. Для кількісного підтвердження цього припущення доцільно провести статистичну оцінку взаємозв'язку між цими показниками.

3.2. Статистичний аналіз взаємозв'язку частоти цитогенетичних аномалій та мітотичного індексу за умов фракціонованого опромінення

Для кількісної перевірки прямопропорційного зв'язку між цими двома цитогенетичними показниками, було проведено оцінку коефіцієнта лінійної кореляції Браве-Пірсона [330]. Ці оцінки, здійснені для невеликих вибірок ($p < 30$), досліджених в даних експериментах, свідчать, що при фракціюванні дози 7,2 кДж/м² та інтервалі між фракціями 1 година (рис. 3.5. А) має місце високе значення коефіцієнта кореляції ($R=0,79$) між мітотичним індексом та виходом хромосомних аберацій при рівні значущості $\alpha=1\%$. При інтервалі між послідовними фракціями, що дорівнює 4 години (рис. 3.5, Б), значення коефіцієнта кореляції та рівня значущості знижуються ($R=0,67$, $\alpha=5\%$). При інтервалі між фракціями 1 доба відбувається подальше зниження коефіцієнта кореляції: $R=0,39$ при $\alpha=5\%$ (рис. 3.5, В). Це вказує на перехід до активної проліферації клітин спокою, а зростання чутливості за показником виходу хромосомних аберацій, може свідчити про вплив другої фракції опромінення

(через 1 добу) на групу клітин, що синхронно перейшли до активного поділу зі стану спокою.

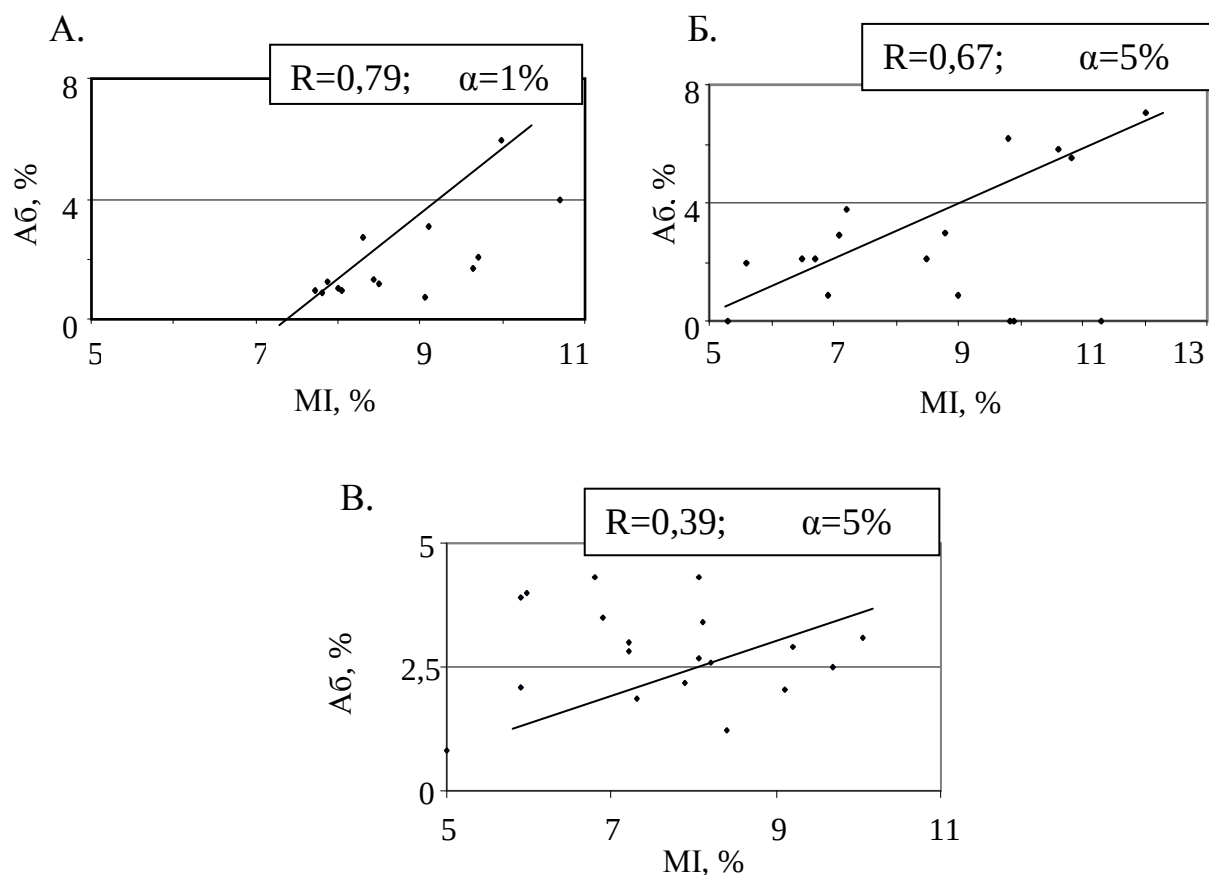


Рис. 3.5. Кореляція між мітотичним індексом (MI, %) та частотою хромосомних аберацій (Ab, %) при різних інтервалах між фракціями дози в 7,2 кДж/м². А – інтервал між фракціями 1 година, Б – інтервал між фракціями 4 години, В – інтервал між фракціями 1 доба.

Синхронність такого переходу, тобто одночасне проходження всіма резервними клітинами радіочутливих фаз циклу, співпадає з моментом повторного опромінення, що й може зумовлювати той факт, що адаптивний ефект найменш виражений саме при цьому інтервалі між фракціями.

При опроміненні у дозі 9 кДж/м² та інтервалі між фракціями 1 година коефіцієнт лінійної кореляції між MI, % та Ab, % становить $R=0,44$ при рівні значущості $\alpha=1\%$ (рис. 3.6, А). При інтервалі між послідовними фракціями, що

дорівнює 4 години, значення коефіцієнта кореляції та рівня значущості далі знижуються ($R=0,24$, $\alpha=5\%$) (рис. 3.6, Б).

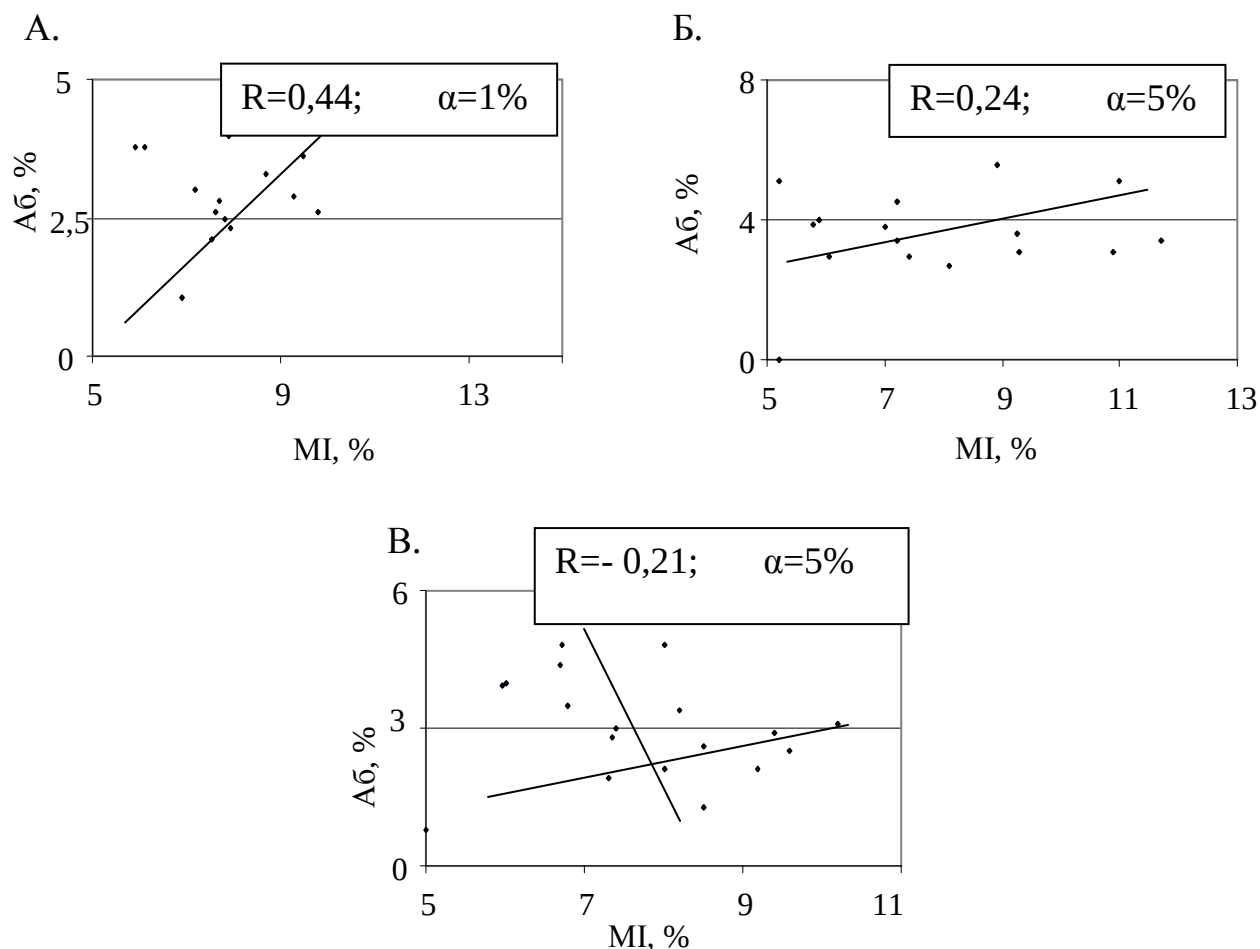


Рис. 3.6. Кореляція між мітотичним індексом (MI, %) та частотою хромосомних аберацій (Ab, %) при різних інтервалах між фракціями дози в 9 кДж/м². А – інтервал між фракціями 1 година, Б – інтервал між фракціями 4 години, В – інтервал між фракціями 1 доба.

При інтервалі між фракціями 1 доба спостерігається від'ємне значення коефіцієнта кореляції: $R = -0,21$ при $\alpha=5\%$ (рис. 3.6, В). Це вказує на зниження ефективності першого репопуляційного механізму, пов'язаного зі скороченням часу знаходження уражених клітин у фазі перевірки.

Таким чином, одержані дані і їх статистичний аналіз свідчать про співіснування у меристематичних тканинах двох форм репопуляції, активізація яких залежить як від дози, тобто ступеню ураження, так і від інтервалу між

послідовними фракціями опромінення [313, 326]. Перша, «швидка», спостерігається при застосуванні порівняно невисоких доз і з меншим інтервалом між фракціями. Вона пов'язана з пришвидшеним переходом до мітозу клітин з незавершеною чи помилковою репарацією, що й призводить до високої кореляційної залежності між показниками мітотичного індексу та виходом нестабільних хромосомних аберацій. Друга, що спостерігається при більшому інтервалі між послідовними впливами і більш високій дозі, але також на фоні «хвилі мітозів», пов'язана з активацією клітин спокою та їхнім переходом до поділу, або з поєднанням обох процесів [229].

3.3. Вплив гострого фракціонованого УФ-С-опромінювання на зміну профілю метилування функціонально різних послідовностей ДНК

Дослідженнями цитогенетичних параметрів зареєстровано достовірну зміну радіостійкості проростків кукурудзи залежно від УФ-С опромінення з різними інтервалами між фракціями. Статистичний аналіз вказує на існування двох форм репопуляційного відновлення. Наступним кроком була перевірка вихідних профілів метилування ДНК та їх зміну залежно від опромінення УФ-С в режимі фракціювання.

На рис. 3.7. наведено електрофореграму контролю нативності виділеної ДНК. Ці дані свідчать про відсутність значущої фрагментації ДНК, яка мала б місце при апоптозі, індукованому УФ-С опроміненням.

Електрофореграми розділення продуктів ампліфікації нативної ДНК з ISSR (рис. 3.8, А) та ITS праймерами (рис. 3.8, Б) свідчать про відсутність відмінностей між контролем та всіма дослідними варіантами, незалежно від умов опромінення. Це вказує на відсутність фрагментації виділеної ДНК.

Електрофореграма розділення продуктів ISSR ампліфікації з MboI ендонуклеазою (рис. 3.9, А) свідчать про незначні відмінності в профілі метилування контрольних і опромінених зразків.

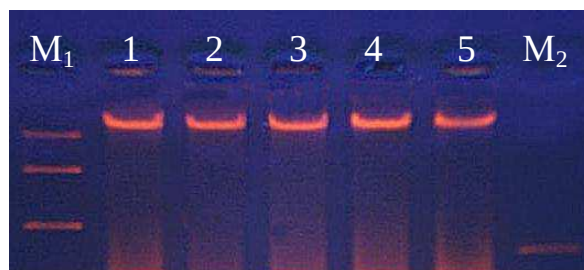


Рис. 3.7. Електрофореграма контролю нативності ДНК. M_1 – FastRuler High-Range DNA Ladder ready-to-use, 10000-500 bp; 1 – контроль; 2 – інтервал між фракціями – 1 год; 3 – інтервал між фракціями – 4 год; 4 – інтервал між фракціями – 1 доба; 5 – опромінення в повній дозі, або інтервал між фракціями – 0 год; M_2 – FastRuler Law-Range DNA Ladder ready-to-use, 1500-50 bp.

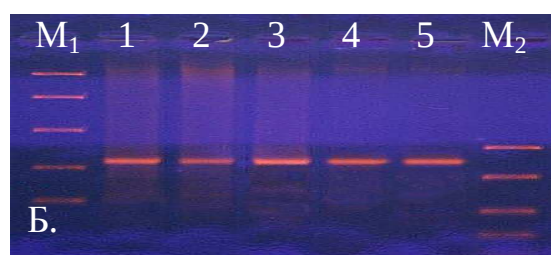
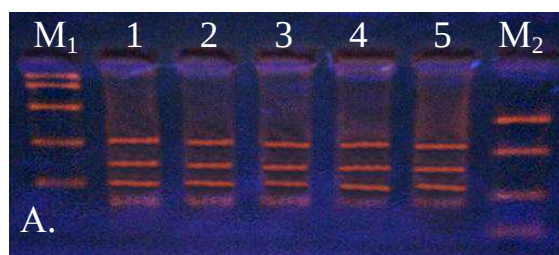


Рис. 3.8. Електрофореграми розділення продуктів ампліфікації нативної ДНК з ISSR- (А) та ITS- (Б) праймерами. M_1 – FastRuler High-Range DNA Ladder ready-to-use, 10000-500 bp; 1 – контроль; 2 – інтервал між фракціями – 1 год; 3 – інтервал між фракціями – 4 год; 4 – інтервал між фракціями – 1 доба; 5 – опромінення в повній дозі, або інтервал між фракціями – 0 год; M_2 – FastRuler Law-Range DNA Ladder ready-to-use, 1500-50 bp.

Найбільш явні відмінності, що проявляються у вигляді додаткових ампліконів з більшою молекулярною масою, спостерігаються між контролем і варіантами, що відповідають опроміненню в повній дозі і повторному опроміненню через 1 добу. Це може вказувати на зменшення кількості сайтів рестрикції MboI (зниження рівня метилування в цих ділянках ДНК).

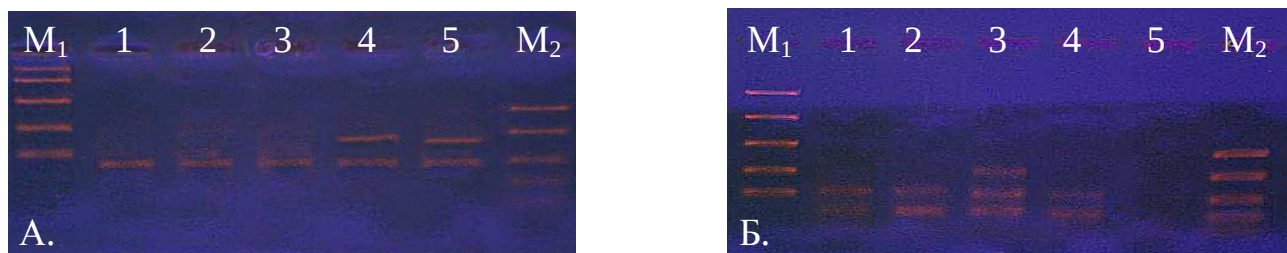


Рис. 3.9. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації з ISSR (А) та ITS (Б) праймерами рестриктів реакції з MboI ендонуклеазою. M₁ – FastRuler High-Range DNA Ladder ready-to-use, 10000-500 bp; 1 – контроль; 2 – інтервал між фракціями – 1 год; 3 – інтервал між фракціями – 4 год; 4 – інтервал між фракціями – 1 доба; 5 – опромінення в повній дозі, або інтервал між фракціями – 0 год; M₂ – FastRuler Low-Range DNA Ladder ready-to-use, 1500-50 bp.

Співставлення цього результату з даними цитологічного аналізу (рис. 3.4) показує, що ці варіанти відповідають найвищій частоті цитогенетичних аномалій. Розділення продуктів ампліфікації рестриктів інших ендонуклеаз не виявили відмінностей між всіма варіантами досліджу.

Електрофореграми розділення продуктів ампліфікації з ITS праймерами рестриктів реакції з MboI ферментом (рис. 3.9, Б) також показують відмінності в профілі метилування не лише між контрольними і опроміненими зразками, але і серед варіантів, опромінених з різними інтервалами між фракціями. Найбільш явні відмінності спостерігаються між контролем і варіантами, що відповідають опроміненню в повній дозі та з інтервалом між фракціями в 4 години. При цьому інтервалі спостерігається ускладнення структури ампліконів, пов'язане з появою високомолекулярного амплікону, що свідчить на користь зниження метилування сайтів рестрикції MboI ферменту при одночасному опроміненні у повній дозі 7,2 кДж/м².

Електрофореграми розділення продуктів ампліфікації з HpaII ферментом (рис. 3.10, А) свідчать про відмінності в профілі метилування контрольних і опромінених зразків. Найсуттєвіша різниця спостерігається між контролем і варіантом, що відповідає опроміненню в повній дозі. Спрощення спектру ампліконів за рахунок зменшення низькомолекулярних ампліконів свідчить також

про зменшення сайтів рестрикції HpaII ферменту при дозі опромінення 7,2 кДж/м².

Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації рестриктів реакції з MspI ферментом (Б) показує відмінності в профілі метилування не лише контрольних між контрольними і дослідними варіантами, але й між варіантами опроміненими у різних режимах .

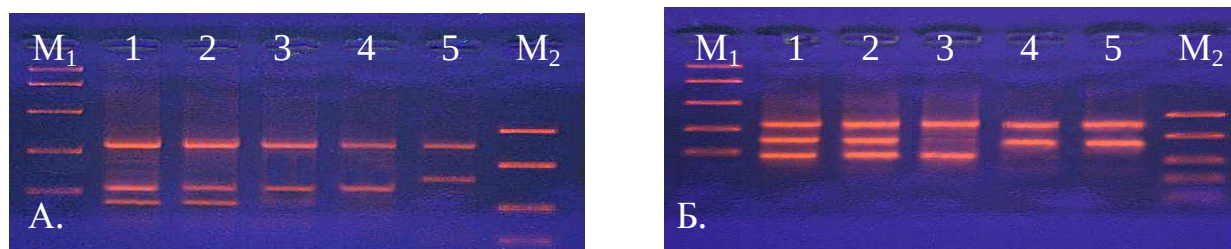


Рис. 3.10. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації з ITS праймерами рестриктів реакції з HpaII (А) та MspI (Б) ендонуклеазами. М₁ – FastRuler High-Range DNA Ladder ready-to-use, 10000-500 bp; 1 – контроль; 2 – інтервал між фракціями – 1 год; 3 – інтервал між фракціями – 4 год; 4 – інтервал між фракціями – 1 доба; 5 – опромінення в повній дозі, або інтервал між фракціями – 0 год; М₂ – FastRuler Low-Range DNA Ladder ready-to-use, 1500-50 bp.

Найбільша різниця спостерігається між контролем і варіантами, що відповідають опроміненню в повній дозі та з інтервалом між фракціями 1 доба. Спрощення структури ампліконів, пов'язане зі зникненням низькомолекулярних бендів, свідчить про зменшення сайтів рестрикції MspI ферменту при дозі 7,2 кДж/м².

Перерахунок довжин рестрикційних фрагментів різних варіантів дослідів наведено у таблиці 3.1. Аналіз одержаних електрофореграм свідчить про відсутність змін профілів метилування порівняно з контролем у варіанта з інтервалом між послідовними фракціями 1 година, що відповідає цитогенетичним даним на користь репопуляції в меристемі за першим «швиким» механізмом. Перехід до включення у репопуляцію клітин спокою відповідає змінам у профілі метилування, особливо по сайтам рестрикції MboI-ендонуклеази. Цей результат

може розглядатися як перехід від підтримуючого метилування до метилування *de novo*.

Подальший аналіз електрофореграм підтверджує, з одного боку, встановлений у дослідженнях інших авторів факт зменшення метилування сателітної ДНК за певними сайтами рестрикції, у даному випадку – MboI-ендонуклеази за умов опромінення у режимах, що викликають найбільше ураження, тобто у повній дозі та з інтервалом між фракціями у 24 години.

Таблиця 3.1

Довжини рестрикційних фрагментів (п.н.) одержані у першій серії експериментів.

Варіанти	Рестриктази		
	HpaII	MspI	MboI
Контроль	1200, 550, 230	1200, 750, 450	510, 390, 350
інтервал між фракціями 1 год	1200, 550, 230	1200, 750, 450	510, 390, 350
інтервал між фракціями 4 год	1200, 550	1200, 450	1050, 510, 390, 350
інтервал між фракціями 1 доба	1200, 550	1200, 750	700, 510, 390, 350
інтервал між фракціями 0 год	1200, 375	1200, 750	700, 390

Спостерігається поява рестрикційних фрагментів довжиною у 1050 та 700 п.н. Зникнення низькомолекулярних рестрикційних фрагментів ДНК, що транскрибується, довжиною у 230 п.н. спостерігається у варіантах з інтервалом між фракціями опромінення у 4 та 24 години та при одномоментному опроміненні у повній дозі, тобто при зниженні та відсутності адаптивної реакції організму згідно частоти хромосомних аберацій. Про це свідчить деметилування і за

сайтами активності HpaII-рестриктази. Враховуючи відомості про механізми і типи метилування ДНК, одержані дані свідчать про збереження підтримуючого метилування транскрибуємої і сателітної ДНК за умов формування адаптивної реакції при інтервалі в одну годину між послідовними фракціями опромінення, що відображає підвищення радіорезистентності за рахунок конститутивних механізмів. Відмінність спектру метилування відносно контролю у варіанта з 4-годинним інтервалом між фракціями опромінення свідчить про включення механізму метилування *de novo*, що, у випадку ДНК, що транскрибується, може відображати включення індукцйбельної компоненти механізмів, які беруть участь у адаптації. Зниження вмісту низькомолекулярних фрагментів у варіантів з 24 – годинним інтервалом між фракціями та при опроміненні у повній дозі вказує на часткове деметилування, що підтверджує результати цитогенетичного аналізу про виникнення найбільшого ураження.

Найскладнішим для інтерпретації є зміна профілів метилування сателітної ДНК. На даний час найдослідженішим механізмом, що пояснює зміни рівней/профілей метилування сателітної ДНК, є зміна активності мобільних елементів геному. Особливо це суттєво для кукурудзи, так як приблизно 50% її сателітної ДНК представлено мобільними елементами [123]. Але активізація останніх в соматичних клітинах є рідкісною подією і має виключно негативні наслідки.

На даний час функціональну важливість сателітної ДНК пояснюють концепції, які відводять їй важливу роль в просторовій організації хроматину [137]. Дослідженнями останніх років встановлено визначальну роль конформації хроматину в ефективності ініціації і проходження репараційних процесів [300]. Цей фактор є ключовим також при копіюванні теломерних ділянок, кон'югації хромосом під час мейозу і при гомологічній репарації подвійних розривів. Також встановлено наявність в сателітній ДНК промоторних ділянок ряду генів, ефективність функціонування яких можлива лише за умов певної конформації хроматину [248].

Таким чином, за встановленими змінами у профілях метилування сателітної і ДНК, що транскрибується, можуть знаходитися різні функціональні механізми виникнення адаптивної реакції. Зміни профілей метилування ДНК, що транскрибується, можуть свідчити про зміни експресії певних груп генів. Зміни профілей сателітної ДНК можуть впливати на структурну організацію хроматину, доступність ДНК як ушкоджуючим факторам, так і факторам репарації та транскрипції.

Заклучна частина

Отримані в даній серії експериментів результати свідчать про різноманітність перебудов профілів метилування як ДНК, що транскрибується, так і сателітної, які залежать від дози та часу між послідовними сеансами опромінення. Найбільш повно виражена адаптивна реакція організму згідно Аб, %, спостерігається при інтервалі у 1 та 4 години між послідовними сеансами опромінення. Спектри рестрикційних фрагментів свідчать про збереження підтримуючого метилування при інтервалі між фракціями в 1 годину та певне переключення на метилування *de novo* при інтервалі в 4 години. Відмінність спектрів рестрикційних фрагментів, одержаних для різних варіантів досліду, відображають тісну взаємодію внутрішньоклітинних та репопуляційних процесів у змінах радіорезистентності рослин, включаючи зміни онтогенезу клітин спокою, що підтверджено статистичним аналізом. Зміни в профілі метилування не тільки послідовностей ДНК, що транскрибуються, а й сателітних, свідчать про можливість участі перебудов характеру метилування останніх у змінах резистентності клітини.

Наступним етапом досліджень є продовження вивчення зв'язку характеру перебудов профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК із формуванням адаптивної реакції цілісної рослини. При цьому будуть використані інші режими опромінення, які широко використовуються в радіобіології: гостре УФ-С-опромінення в режимі «адаптивне-ударне», хронічне опромінення та комбіноване опромінення.

ГЛАВА 4

РАДІОАДАПТИВНА ВІДПОВІДЬ ЗА УМОВ ГОСТРОГО, ХРОНІЧНОГО ТА КОМБІНОВАНОГО ОПРОМІНЕННЯ

З метою виявлення залежності метилування ДНК *de novo* при формуванні адаптивної реакції від умов радіаційного впливу були використані різні режими опромінення: «адаптивне - ударне», хронічне, комбіноване опромінення. Увага була сфокусована на відмінностях реакції в умовах широковідомого в лабораторних дослідженнях режиму - «адаптивне - ударне опромінення» організмів, що опромінюються вперше, та організмів, що на зародковій стадії підпали хронічному гамма-опроміненню, тобто мають «історію» накопичення дози, «біохімічну і цитогенетичну пам'ять» про цей процес. Залучаючи в дослідження рослинні організми, що походять з хронічно гамма-опроміненого насіння, варто розглядати всі особливості їх реакцій на гостре УФ-С-опромінення як кумулятивні ефекти, характер яких виявляється у процесі дослідження.

Як описано у 2 главі, хронічне опромінення проводили протягом різних термінів; насіння знаходилося в повітряносухому стані, накопичена доза становила від 4 до 4,5 Гр при потужності дози у 12,9 мкА/кг. Інтервали між сеансами гострого УФ-С-опромінення складали 1 год, 4 год і 1 доба, що дозволяє оцінити, хоч і дуже обмежено, комплекс процесів, які включаються у пострадіаційні реакції цілісної рослини. Відмінність у режимах гострого впливу полягала у неоднакових дозах послідовних сеансів опромінення - адаптивна доза складала 1 кДж/м², ударна доза – 6,2 кДж/м², потужність дози - 6,25 Вт/м², $\lambda = 253$ нм.

Дослідження, проведене таким чином, дає можливість проаналізувати характер змін цитогенетичних показників меристеми кореня проростків з опроміненого насіння і оцінити, як формування цитогенетичного кумулятивного ефекту впливає на формування радіоадаптивної відповіді на рівні клітинної популяції. Співставлення змін профілів метилування ДНК із

змінами частоти цитогенетичних аномалій дозволить встановити їх зв'язок із формуванням адаптованості цих двох груп рослинних організмів.

4.1. Оцінка мітотичного індексу та частоти хромосомних аберацій

На рис. 4.1-4.2 наведено дані щодо змін у частоті хромосомних аберацій у меристемі коренів проростків попередньо гамма-опромінених (ПО) та неопромінених (НО) за умов накопиченої дози гамма-опромінення 4 Гр (рис. 4.1, А), 4,3 Гр (рис. 4.1, Б) та 4,5 Гр (рис. 4.2). Змін у формуванні адаптивної відповіді проростків з насіння без попереднього опромінення не спостерігається при повторних проведеннях експерименту. При нагромадженні дози хронічного опромінення реакція на гостре опромінення змінюється у проростків із ПО насіння: підвищується «лікувальний» ефект адаптуючого опромінення, адаптивна відповідь зменшується і зникає при дозі 4,5 Гр хронічного опромінення (рис. 4.2). Вплив в адаптивній дозі спричиняє «лікувальний ефект» на проростки з ПО насіння за частотою хромосомних аберацій. Поведінка цитогенетичних показників дуже відрізняється для проростків, отриманих з ПО (рис. 4.2) та НО насіння. Отримані при повторних експериментах значення відрізняються кількісно, але якісно дають схожу тенденцію: опромінення ПО проростків в режимі «адаптивне-ударне», призводить до слабо вираженого лікувального ефекту, знижуючи вихід хромосомних аберацій.

Режим впливу «адаптивна, через 4 години – ударна доза» призводить до появи адаптивної відповіді у проростків без попереднього опромінення, чого не спостерігається при інтервалі в 1 добу. У проростків з ПО насіння адаптивна відповідь була відсутня при обох інтервалах між адаптивним і ударним опроміненнями. Пояснення такого феномену можливе з точки зору гетерогенності клітинного складу меристематичної тканини і у зв'язку з цим,

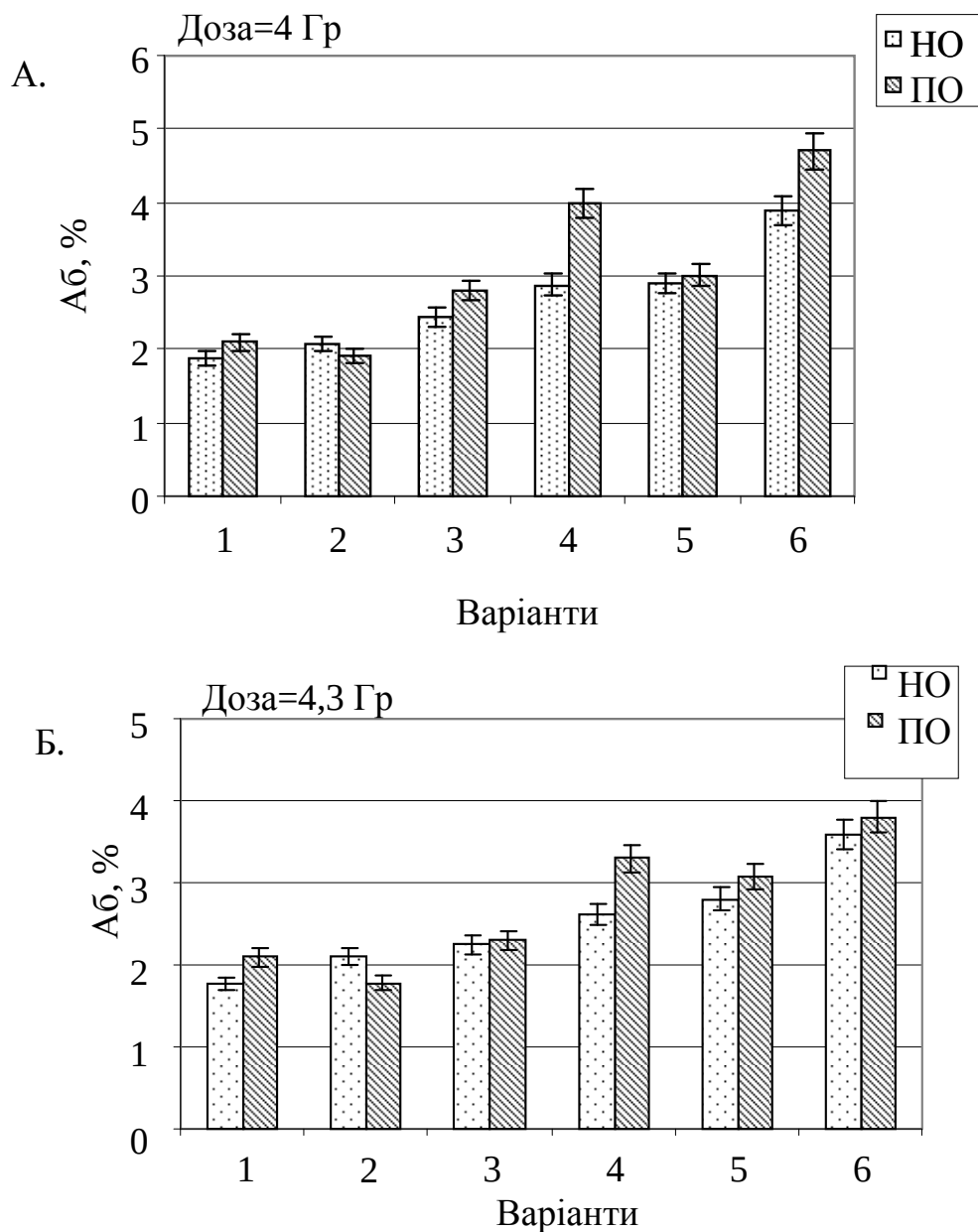


Рис. 4.1. Зміни у частоті хромосомних аберацій (Аб, %) у меристемі коренів проростків, що походять з попередньо гамма-опроміненого (ПО) та неопроміненого насіння (НО). А – накопичена доза гамма-опромінення 4 Гр; Б – накопичена доза гамма-опромінення 4,3 Гр. 1 – контроль; 2 – 1 кДж/м²; 3 – 1 кДж/м² + 6,2 кДж/м² через 4 год після адаптивної дози; 4 – повна доза 7,2 кДж/м², одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі; 5 – 1 кДж/м² + 6,2 кДж/м² через 1 добу після адаптивної дози; 6 – повна доза 7,2 кДж/м² одночасно з варіантом 5.

наявністю двох форм репопуляційного відновлення, – проаналізоване в попередньому розділі [137, 310, 313].

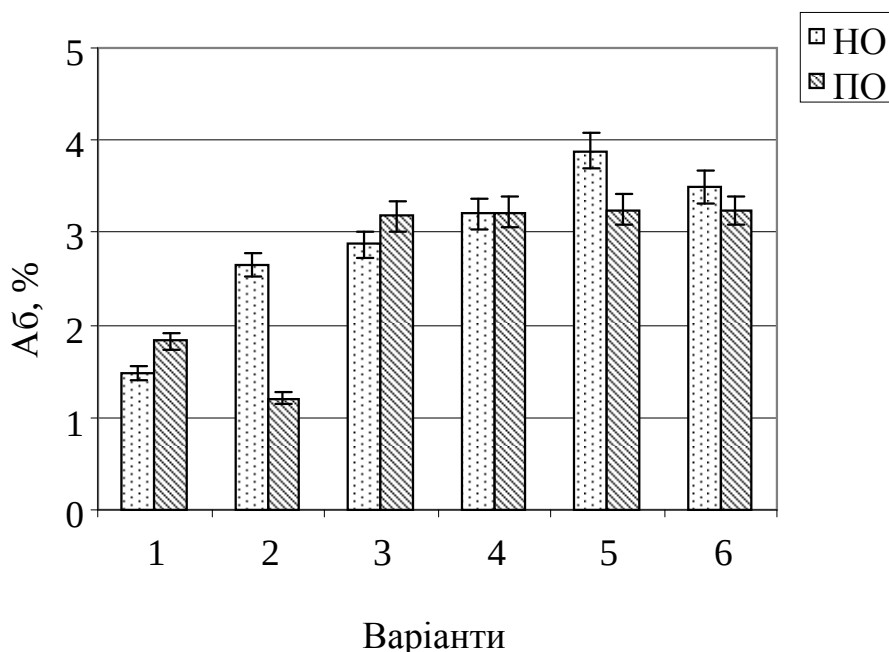


Рис. 4.2. Зміни у частоті хромосомних аберацій (Аб, %) у меристемі коренів проростків з насіння попередньо опроміненого гамма-променями (ПО) та неопроміненого (НО). Накопичена доза гамма-опромінення 4,5 Гр. 1 – контроль; 2 – 1 кДж/м²; 3 – 1 кДж/м² + 6,2 кДж/м² через 4 год після адаптивної дози; 4 – повна доза 7,2 кДж/м², одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі; 5 – 1 кДж/м² + 6,2 кДж/м² через 1 добу після адаптивної дози; 6 – повна доза 7,2 кДж/м² одночасно з варіантом 5.

4.2. Статистичний аналіз взаємозв'язку частоти цитогенетичних аномалій та мітотичного індексу проростків кукурудзи, одержаних з попередньо хронічно гамма-опроміненого та неопроміненого насіння

Для перевірки припущення про готовність клітин стану спокою перейти до поділу при опроміненні ПО проростків з інтервалом між «адаптивним-ударним» опроміненням в 4 години, було проведено оцінку коефіцієнта лінійної кореляції Браує-Пірсона (рис. 4.3, А-Б).

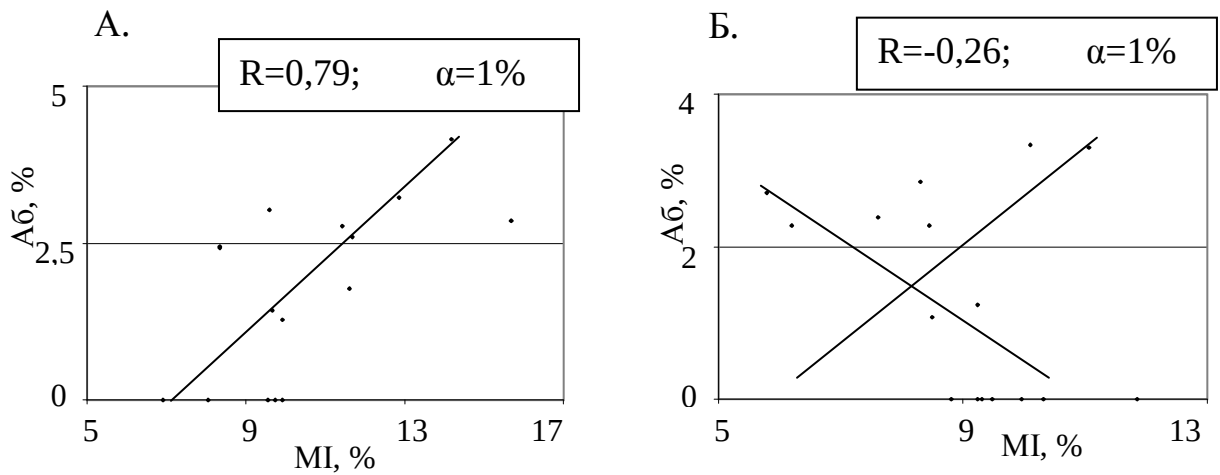


Рис. 4.3. Кореляція між значеннями мітотичного індексу (МІ, %) та частотою хромосомних аберацій (Аб, %) при інтервалі 4 години між «адаптивним-ударним» опроміненням. А – проростки з попередньо неопроміненого насіння (НО), Б – проростки з попередньо опроміненого насіння (ПО).

Згідно прийнятих в статистичному аналізі критеріїв [330], оцінки, отримані в даних експериментах ($p < 30$), свідчать, що при інтервалі 4 години між «адаптивним-ударним» опроміненням для проростків з попередньо неопроміненого насіння (рис. 4.3, А) спостерігається висока, як і у попередній серії експериментів, кореляція ($R=0,79$) між показниками мітотичного індексу та частотою нестабільних хромосомних аберацій при рівні значущості $\alpha=1\%$. Для проростків, отриманих з попередньо опроміненого насіння (рис. 4.3, Б), характерне низьке від'ємне значення лінійної кореляції ($R=-0,26$) при рівні значущості $\alpha=1\%$.

Пояснення такого феномену, як і у попередній серії експериментів, можливе з точки зору урахування гетерогенності клітинного складу меристематичної тканини і, у зв'язку з цим, наявністю двох форм репопуляційного відновлення. Низьке значення коефіцієнта лінійної кореляції Браує-Пірсона ($R=-0,26$) вказує на репопуляційне відновлення меристеми за рахунок клітин спокою, що свідчить про «готовність» цих клітин перейти до поділу вже при незначному інтервалі між фракціями. Цю «готовність» можна розглядати як кумулятивний ефект - результат

попереднього хронічного опромінення насіння, формування «цитогенетичної і біохімічної» пам'яті про тривале дозове навантаження. Можливо це пов'язано з накопиченням вільних радикалів, що відбувається і у сухому насінні та зниження їх здатності до рекомбінації, що, у свою чергу, пов'язано із зниженням їх рухливості в умовах підвищеної в'язкості середовища [228].

4.3. Метилування ДНК при радіоадаптивній відповіді на гостре УФ-С опромінення проростків кукурудзи, одержаних з неопроміненого та попередньо хронічно гамма-опроміненого насіння

Різні стратегії відновлення клітинного складу меристеми пов'язані з різноманітним профілем метилування функціонально різних послідовностей ДНК як серед ПО та НО проростків без додаткового гострого УФ-С опромінення, так і серед проростків, опромінених з різними інтервалами між адаптивною і ударною дозами. Дані молекулярно-генетичного аналізу свідчать про наявність перебудов електрофореграм, що відповідає змінам спектрів ампліконів і залежить від сайтів рестрикції певного ензиму (тобто оточення метилованого цитозину), типу і режиму опромінення, що підтверджується і паралелізмом у змінах цитогенетичних параметрів.

Найбільші зміни профілю метилування при опроміненні спостерігаються у сателітних послідовностях ДНК проростків, що походять з попередньо гамма-опроміненого насіння (рис. 4.4, А-В).

Електрофореграма розділення продуктів ISSR-ампліфікації рестриктів MboI (рис. 4.4, А) свідчить про різноманітну зміну профілей метилування ДНК залежно від режиму впливу. Співставлення позицій 1 (проростки з НО насіння) і 7 (проростки з ПО насіння) показує значні відмінності в спектрі ампліконів. Спостерігається значне ускладнення електрофореграми внаслідок появи ампліконів меншої та середньої маси. Суттєвим є те, що варіанти 9-12 показують ідентичні спектри; тут можливі паралелі з однаковим виходом хромосомних аберацій в цих самих варіантів.

Електрофореграма ISSR-ампліфікації рестриктів MspI (рис. 4.4, Б) також вказує на різні зміни профілей метилування ДНК, залежно від режиму впливу. Варіанти 1 і 7 (проростки з НО та ПО насіння відповідно) характеризуються відмінними спектрами ампліконів. Як відзначено вище, ці варіанти мають принципово різну поведінку цитогенетичних параметрів (рис. 4.1-4.2).

При попередньому гамма-опроміненні насіння електрофореграма ускладнюється за рахунок появи ампліконів нижчої молекулярної маси, що свідчить про зростання кількості сайтів рестрикції MspI ферменту. Спостерігається значна відмінність електрофореграми варіанта 8 (проростки з ПО насіння, що отримали адаптивну дозу), який демонструє гормезисний ефект за показником частоти хромосомних аберацій (рис. 4.1-4.2). Суттєво, що варіанти 9-12 характеризуються ідентичними спектрами ампліконів, як і з ферментом MboI (рис. 4.4, А).

Електрофореграма ISSR-ампліфікації рестриктів HpaII (рис. 4.4, В) показує меншу залежність спектра ампліконів від режиму впливу. Помітні відмінності варіантів 1 та 7 (проростки з НО та ПО насіння відповідно) внаслідок меншої кількості фрагментів високої молекулярної маси. Спостерігається значна відмінність електрофореграм варіантів 9 та 10-12, які відповідають практично однаковому виходу хромосомних аберацій.

Електрофореграми ITS-ампліфікації нативної ДНК свідчать про відсутність будь-яких відмінностей в профілі метилування ДНК, що транскрибується (рис. 4.5), що підтверджує нативність виділеної ДНК, адже сублетальні пошкодження, які могли б мати місце після впливу УФ-С, проявилися би внаслідок проведення ПЛР у вигляді додаткових низькомолекулярних ампліконів на електрофореграмі.

Відмічено, що електрофореграми ампліфікації рестриктів різних ендонуклеаз ДНК, що транскрибується, (рис. 4.6-4.7, А-Б) характеризуються ідентичним за молекулярною масою спектром ампліконів, як серед варіантів

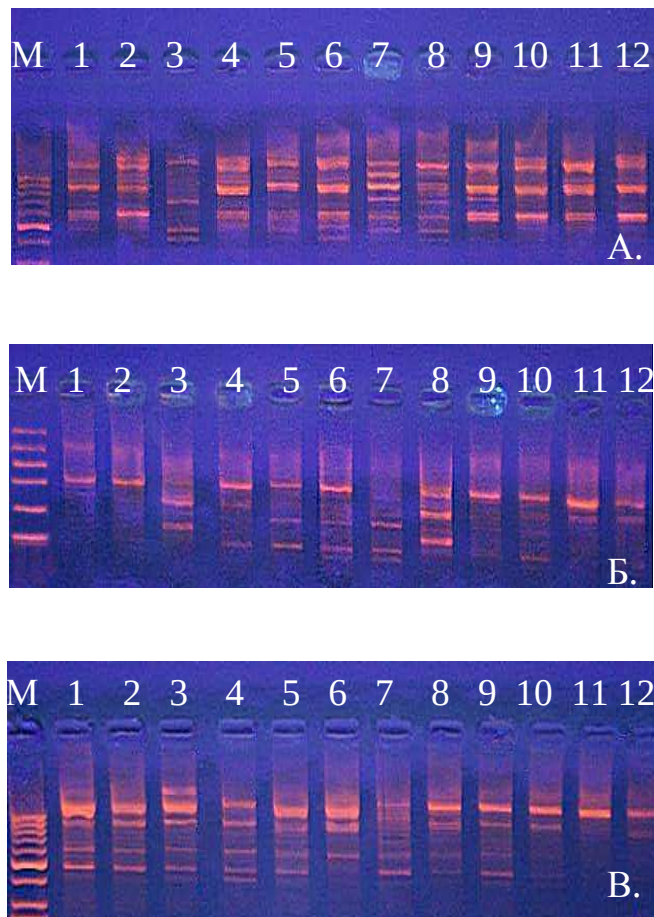


Рис. 4.4. Електрофореграми ISSR-ампліфікації рестриктів MboI (А), MspI (Б) та HpaII (В). М – GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50 bp; 1 – НО, контроль; 2 – НО, АД; 3 – НО, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – НО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3); 5 – НО, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – НО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5); 7 – ПО, контроль; 8 – ПО + АД; 9 – ПО, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 10 – ПО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9); 11 – ПО, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 12 – ПО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11).

з різними рестриктазами, так і в порівнянні з електрофореграмою ампліфікації нативної ДНК.

Такі результати свідчать про незмінність профілей метилування ДНК, що транскрибується, при УФ-С опроміненні проростків з НО та ПО насіння з використанням інтервалу між дозами 4 години (рис. 4.6, варіанти 3 і 7 та рис. 4.7, позиції А-Б, варіанти 3 і 7) та при використанні лише адаптивної дози 1

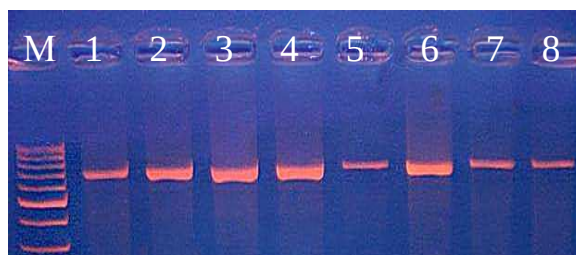


Рис. 4.5. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації з ITS праймерами нативної ДНК.

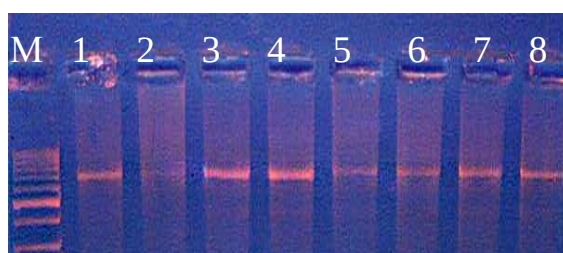


Рис. 4.6. Електрофореграма розділення продуктів ITS-ампліфікації рестриктів реакції з MspI ферментом.

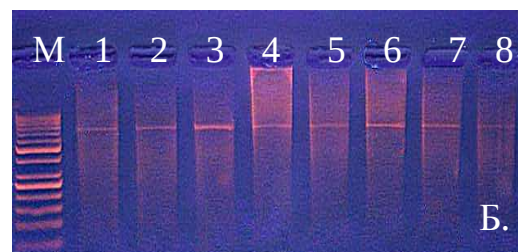
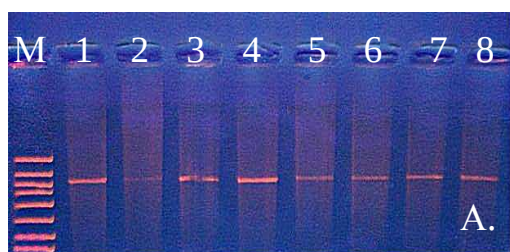


Рис. 4.7. Електрофореграми розділення продуктів ампліфікації з ITS праймерами рестриктів реакції з MboI (А) та HpaII ферментом (Б).

Підписи до рис. 4.5-4.7: М – GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50 bp; 1 – НО, контроль; 2 – НО, АД; 3 – НО, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – НО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3); 5 – ПО, контроль; 6 – ПО, АД; 3 – ПО, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ПО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3).

кДж/м² (рис. 4.6, варіанти 2 і 6 та рис. 4.7, позиції А-Б, варіанти 2 і 6). Така поведінка ДНК може свідчити про незмінність її конформації у відповідь на дію опромінення.

Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації з ITS праймерами рестриктів реакції з MboI ферментом (рис. 4.8) свідчить про значні відмінності в профілі метилування проростків з ПО насіння за сайтами, що відповідають активності цього фермента як між контрольним і дослідними зразками, так і серед гамма-опромінених варіантів.

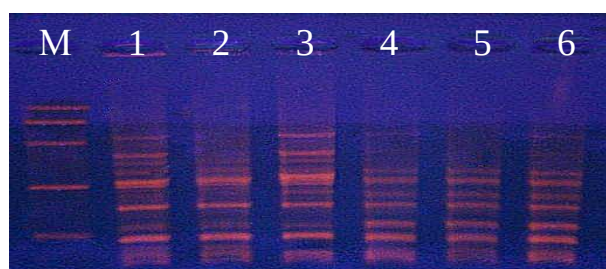


Рис. 4.8. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації з ITS праймерами рестриктів реакції з MboI ферментом. М – FastRuler High-Range DNA Ladder ready-to-use; 1 – ПО, К; 2 – ПО, АД; 3 – ПО, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ПО, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3); 5 – ПО, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – ПО, ПД(одночасно з опроміненням варіанта 5).

Майже ідентичні спектри ампліконів характерні лише для контрольного варіанту і варіанту, що отримав адаптивну дозу і через 4 години ударну (позиції 1 і 3). Ці дані підтверджуються даними з рис. 4.4-4.6, які також свідчать про незмінність профілей метилування транскрибованої ДНК при інтервалі між дозами в 4 години відносно контрольних варіантів і картини метилування нативної ДНК. Інші варіанти характеризуються зникненням високомолекулярних ампліконів, що свідчить про зниження кількості сайтів метилування, специфічних для активності MboI-фермента при опроміненні (позиції 2, 4-6 електрофореграми рис. 4.4, та табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Довжини рестрикційних фрагментів (п.н.), отриманих у другій серії експериментів

Варіанти	Рестриктази		
	HpaII	MspI	MboI
1. НО, К	1100, 900, 850, 600, 500	900, 700	1100, 850, 600
2. НО, АД	1100, 900, 850, 600, 500	700, 650, 550	1200, 1100, 850, 600
3. НО, АД+УД, $\Delta t=4$ год	1300, 1100, 900, 850, 600, 500	700, 650	1100, 850, 725, 500, 400
4. НО, ПД	1200, 900, 850, 600, 500, 420	700	1100, 850, 600
5. НО, АД+УД, $\Delta t=24$ год	1100, 900, 600, 500	700, 550, 500, 450	1100, 850, 400
6. НО, ПД	1100, 900, 500	700, 550, 500, 450	1100, 850, 600, 400
7. ПО, К	1200, 1000, 850, 600, 500	700, 550, 500, 450	2000, 1600, 1500, 1200, 1100, 1000, 850, 800, 725, 600, 550, 500, 450, 300
8. ПО, АД	1100, 900, 850, 600, 500	700, 650	1100, 850, 800, 725, 600, 550, 500, 450, 300
9. ПО, АД+УД, $\Delta t=4$ год	1100, 900, 850, 600, 500	700, 500	1500, 1100, 900, 850, 600, 500
10. ПО, ПД	1100, 900, 850	700, 450	1100, 900, 850, 800, 600, 500, 300
11. ПО, АД+УД, $\Delta t=24$ год	1100	650, 500	1100, 900, 850, 800, 700, 600, 300
12. ПО, ПД	1100, 900	700, 650	1100, 900, 850, 800, 600, 500, 300

Отже, дані молекулярно-генетичного аналізу свідчать про зміни профілів метилування, що відповідає змінам спектрів рестрикційних фрагментів і залежить від сайтів рестрикції певного ензиму (тобто оточення метилованого цитозину); типу і режиму опромінення, що пов'язане із даними цитогенетичних досліджень.

Найбільші зміни профілю метилування спостерігаються у сателітних послідовностях ДНК проростків, що походять з попередньо гамма-опроміненого насіння. Число рестрикційних фрагментів досягає 14; ускладнення спектру відбувається як за рахунок появ високомолекулярних ампліконів (2000 п.н.), так і за рахунок ампліконів, маса яких нижче контрольних зразків (300 п.н.). Для цього варіанту дослідження характерно незначне підвищення частоти хромосомних аберацій порівняно до неопроміненого контролю. «Лікувальний» ефект за цим маркером проявляється у загальному зниженні числа ампліконів і інтервалу варіювання їх довжин за рахунок зникнення високомолекулярного амплікону, що свідчить про підвищення метилування по цим сайтам.

Одержані результати вказують не тільки на можливість тісного взаємозв'язку між перебудовами профілів метилування сателітної ДНК і рівнем ураження цієї макромолекули, що проявляється у частоті цитогенетичних аномалій. Значні зміни спектрів рестрикційних фрагментів свідчать про більший внесок метилування ДНК *de novo* у формування пострадіаційної відповіді саме за умов хронічного опромінення.

4.4. Кореляційний аналіз взаємозв'язку змін частоти хромосомних аберацій та варіювання профілей метилування ДНК

Для кількісної оцінки взаємозв'язку змін профілів метилування сателітної ДНК та частоти хромосомних аберацій за різних впливів були застосовані різноманітні принципи ранжування варіацій електрофореграм і проведено розрахунки коефіцієнта рангової кореляції Спірмена між

градаціями перебудов електрофореграм і виходом хромосомних аберацій з використанням декількох підходів для виділення цих градацій.

Існує кілька значимих кількісних характеристик змін профілю метилування, що можуть бути зареєстровані на електрофореграмах:

1. Відмінності в загальній кількості ампліконів.

При цьому можливі наступні варіанти:

а) відмінності в їх молекулярній масі, тобто положення відносно смуг маркера на електрофореграмі, але в межах розміру ампліконів контрольного зразка; кількість нових ампліконів чи зникнення ампліконів контрольного зразка може бути різним;

б) поява ампліконів, маса яких виходить за межі як більшої, так і меншої маси контрольних ампліконів;

2. Зміна інтенсивності забарвлення смуг, що вказує на зміну кількості фрагментів ампліконів однієї маси;

3. Об'єднання перерахованих вище кількісних показників.

Різне поєднання цих показників може підвищити можливості градацій змін профілей метилування і оцінку кореляції між ступенем зміни профілю метилування і частотою хромосомних аберацій.

Наведені в табл. 4.2 значення статистичного взаємозв'язку свідчать про існування значущої позитивної ($R_s=0,89$, $\alpha = 0,05$) кореляції між рангами, що відповідають кількості ампліконів і частотою хромосомних аберацій для експериментів з УФ-С опроміненням і використанням MboI рестриктази, а також незначущої позитивної кореляції для варіантів з цим типом опромінення і рестрикції ферментами MspI та HpaII. При цьому має місце незначуща від'ємна кореляція для варіантів з комплексним опроміненням та використанням трьох рестриктаз.

Таблиця 4.2.

Кореляція між кількістю ампліконів та частотою хромосомних аберацій
при різних режимах опромінення

Режим опромінення	Коефіцієнт рангової кореляції, Rs		
	MspI	HpaII	MboI
гостре опромінення в режимі «адаптивна – ударна доза» з різними часовими інтервалами	0,81	0,19	0,89*
комбіноване опромінення: УФ-С опромінення проростків, що походили з попередньо гамма-опроміненого сухого насіння	-0,49	-0,71	-0,77

Рівень значущості: $\alpha=0,05$

На наступному етапі використовували другий принцип (критерій) градування відмінностей електрофореграм за наступними показниками:

- 0- відсутність відмінностей з контрольним зразком;
- 1- різниця в кількості ампліконів, маси яких знаходяться в межах мас ампліконів контрольного зразка;
- 2- різниця в кількості ампліконів, маси яких знаходяться в межах мас ампліконів контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг, що відповідає різній кількості фрагментів одного амплікона;
- 3- різниця в кількості ампліконів, маси яких виходять за межі мас ампліконів контрольного зразка;
- 4- різниця в кількості ампліконів, маси яких виходять за межі мас ампліконів контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг.

Таблиця 4.3.

Кореляція між градаціями електрофореграм за другим критерієм та частотою хромосомних аберацій

Режим опромінення	Коефіцієнт рангової кореляції, Rs		
	MspI	HpaII	MboI
гостре опромінення в режимі «адаптивна – ударна доза» з різними часовими інтервалами	0,84	0,77	0,94*
комбіноване опромінення: УФ-С опромінення проростків, що походили з попередньо гамма-опроміненого сухого насіння	0,54	0,54	0,71

Рівень значущості: $\alpha=0,05$

Таким чином, цей спосіб ранжирування зміни профілей метилування підвищив значення коефіцієнтів кореляції, не змінивши їх значущість для варіантів без попереднього гамма-опромінення і відобразився в позитивній, але незначущій кореляції для варіантів з попередньо опроміненим насінням.

Наступним кроком було провести градацію електрофореграм за показниками:

0 - відсутність відмінностей з контрольним зразком;

1 - різниця в кількості ампліконів (n), маса яких знаходиться в межах маси ампліконів контрольного зразка, $n \leq 3$;

2 - різниця в кількості ампліконів (n), маса яких знаходиться в межах маси ампліконів контрольного зразка, $n \leq 3$ + відмінність в інтенсивності забарвлення смуг;

3 - різниця в кількості ампліконів ($n > 3$), маса яких знаходиться в межах маси ампліконів контрольного зразка;

4 - різниця в кількості ампліконів ($n > 3$), маса яких знаходиться в межах маси ампліконів контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг;

5 - різниця в кількості ампліконів ($n \leq 3$), маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка;

6 - різниця в кількості ампліконів ($n \leq 3$), маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг;

7 - різниця в кількості ампліконів ($n > 3$), маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка;

8 - різниця в кількості ампліконів ($n > 3$), маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг.

Таблиця 4.4.

Кореляція між градаціями електрофореграм за третім критерієм та частотою хромосомних аберацій

Режим опромінення	Коефіцієнт рангової кореляції, R_s		
	MspI	HpaII	MboI
гостре опромінення в режимі «адаптивна – ударна доза» з різними часовими інтервалами	0,97*	0,92*	0,86
комбіноване опромінення: УФ-С опромінення проростків, що походили з попередньо гамма-опроміненого сухого насіння	0,23	0,77	0,83

Рівні значущості: $*\alpha=0,05$

Розрахунки свідчать про існування високої достовірної кореляції (табл. 4.2-4.4) між частотою хромосомних аберацій за різних форм радіаційного впливу і варіаціями профілей метилування сателітної ДНК.

Цей зв'язок може свідчити, по-перше, про не випадковість профілю виникнення подвійних розривів ДНК, що є основою формування аберацій та може залежати від профілів метилування різних зон ДНК. По-друге, зміни профілів метилування ДНК можуть відігравати певну роль у ремоделюванні хроматину через зміни спорідненості фрагментів нуклеосомної чи лінкерної ДНК, до гістонів.

Ремоделювання хроматину в цілому при змінах профілю метилування сателітної частини ДНК робить можливим включення/стимуляцію різних захисних і відновлюваних процесів за рахунок змін доступності ДНК, що транскрибується, до факторів репарації і транскрипції. У відповіді рослинної клітини на стрес зміна профілей метилування сателітної ДНК прямо і/чи опосередковано бере участь в індукційних захисних реакціях, тобто може бути невід'ємною складовою епігенетичної регуляції [227, 354]. Відомо, що участь сателітної ДНК в захисних реакціях може бути пов'язана з гомологічною репарацією подвійних розривів та змінами ефективності проходження контрольних фаз клітинного циклу, що у свою чергу може бути відображенням змін у рівні спорідненості цієї частини ДНК з різними функціональними групами білків при змінах профілів метилування.

Отже, різні профілі метилування сателітної ДНК, зумовлюючи різний характер ремоделювання хроматину, можуть виявитися одним з ключових факторів епігенетичної регуляції процесів клітини.

Отримані результати вказують на два можливі механізми участі метилування сателітної ДНК в зміні адаптованості клітини до дії опромінення. Обидва механізми реалізуються через вплив метилування ДНК на структурні характеристики хроматину. Адже саме конформація хроматину визначає його доступність для факторів транскрипції і тим самим визначає зміни в синтезі і спектрі ферментів у відповідь на опромінення [300]. Такі

зміни можуть відбуватися як в транскрибованій частині ДНК, що є логічним, адже саме вона виступає матрицею в процесі транскрипції, або навіть і в сателітній частині ДНК, яка через зміну конформації частини хроматину забезпечує таку стерічну спорідненість транскрибованої ДНК та молекулярних факторів, яка може як сприяти доступності, так і навпаки, «закриванню» матриці від дії певних негативних факторів.

Заклучна частина

В результаті проведення даної серії експериментів показано значиму відмінність формування адаптивної реакції у проростків, що походять з неопроміненого та попередньо гамма-опроміненого насіння. Ця різниця проявляється на цитогенетичному і молекулярному рівнях. Для проростків, що походять з попередньо опроміненого насіння, характерні значно різноманітніші зміни профілю метилування ДНК як за відсутності додаткового гострого УФ-С-опромінення, так і при його застосуванні. Це свідчить про переключення метилування ДНК з режиму підтримки у режим *de novo*. Згідно із цитогенетичними даними та їх статистичним аналізом для цих варіантів спостерігається другий механізм репопуляційного відновлення меристеми, пов'язаний із зростанням «готовності» переходу до мітотичного поділу клітин «спокою». В той же час у проростків з попередньо опроміненого насіння адаптивна відповідь не була чітко сформованою при обох інтервалах між адаптивним і ударним опроміненнями.

Суттєво, що дані молекулярно-біологічного аналізу показали значні зміни профілей метилування саме сателітної ДНК як серед проростків з НО та ПО насіння, так і серед варіантів з різними інтервалами між адаптивною і ударною дозами; суттєвих змін в профілі метилування ДНК, що транскрибується, не відбувається. Це може непрямым чином свідчити на користь припущення, що у виявлених радіаційних ефектах ключову роль відіграють структурні механізми.

Проведений кореляційний аналіз з використанням різних критеріїв варіювання спектрів рестрикційних фрагментів дозволяє зробити висновок про існування кількісного взаємозв'язку між частотою хромосомних аберацій як інтегральною відповіддю організму на стрес та змінами в профілях метилування ДНК. Зміна профілів метилування сателітної ДНК не має випадкового характеру, що дає можливість припустити, що за цим явищем стоять певні механізми, які відіграють роль у визначенні радіочутливості і радіостійкості клітини.

Проведення двох серій експериментів з використанням декількох різних режимів опромінення свідчить, що зміни профілей метилування ДНК носять складний характер і безпосередньо пов'язані із змінами радіостійкості рослинного організму і охоплюють різні рівні його організації. Внаслідок виявлення такого щільного взаємозв'язку між цими характеристиками наступна стадія нашого дослідження пов'язана із визначенням можливого зв'язку між радіочутливістю рослини, її адаптивним потенціалом і вихідним станом метилування ДНК, що транскрибується та сателітної ДНК.

ГЛАВА 5

ЗВ'ЯЗОК РАДІОСТІЙКІСТІ РОСЛИН З ВИХІДНИМ ПОЛІМОРФІЗМОМ ПРОФІЛІВ МЕТИЛУВАННЯ ДНК

Відомо, що одним із факторів, що визначають радіочутливість тваринних і рослинних організмів і їх підсистем є активність метаболічних процесів. Констатація цього явища відображена у класичному узагальненні Бергоньє–Трибондо і неодноразово підтверджувалась у різноманітних радіобіологічних експериментах на біологічних об'єктах різного рівня організації [308].

Варіювання активності процесів спостерігається на всіх рівнях організації живих систем: генетично однорідна популяція рослин має неоднакову швидкість росту, тривалість клітинного циклу характеризується певним розподілом, у насіння, сформованого в популяції генетично однорідних рослин, чи навіть на одній рослині, швидкість проростання теж характеризується розподілом [67, 100, 102, 202, 245, 266].

З метою дослідження впливу початкового стану метилування обох форм ДНК на вихідний рівень хромосомних аберацій (у контролі) та радіорезистентність організму були проведені експерименти, що враховували природну варіабельність довільної вибірки насіння по часу проростання з моменту його ініціації.

5.1. Цитогенетичні характеристики проростків з насіння, що проростає з різною швидкістю

Дослідження проводили на проростках кукурудзи сорту Поліський 177 МВ. Оцінка впливу початкового стану метилування обох форм ДНК на радіостійкість рослини і подальший розвиток адаптивної реакції проведене шляхом виділення в довільній вибірці насіння кукурудзи субпопуляцій, які мають різний час проростання, з подальшим опроміненням в різних режимах

кожної із них. До субпопуляції, що проростає швидко, (ШП) було віднесене насіння, що проростає через добу після замочування, до насіння середньої швидкості проростання (СП) те, що проростає між першою та другою добою, до субпопуляції з повільною швидкістю проростання (ПП) - насіння, яке проростає на третю добу набування.

Тридобові проростки опромінювали УФ-С у пошкоджуючій дозі 7,2 кДж/м².

Аналіз експериментального матеріалу свідчить про існування значних відмінностей цитогенетичних показників у трьох виділених груп проростків, особливо між групами ШП та ПП. При повторях експерименту спостерігалися нестійкі значення цитогенетичних параметрів у групи СП (рис. 5.1). Майже завжди група ШП характеризується більш високим вихідним значенням мітотичного індексу, а найбільш лабільний цей показник у групи СП, може навіть перевищувати значення цього показника для ШП групи.

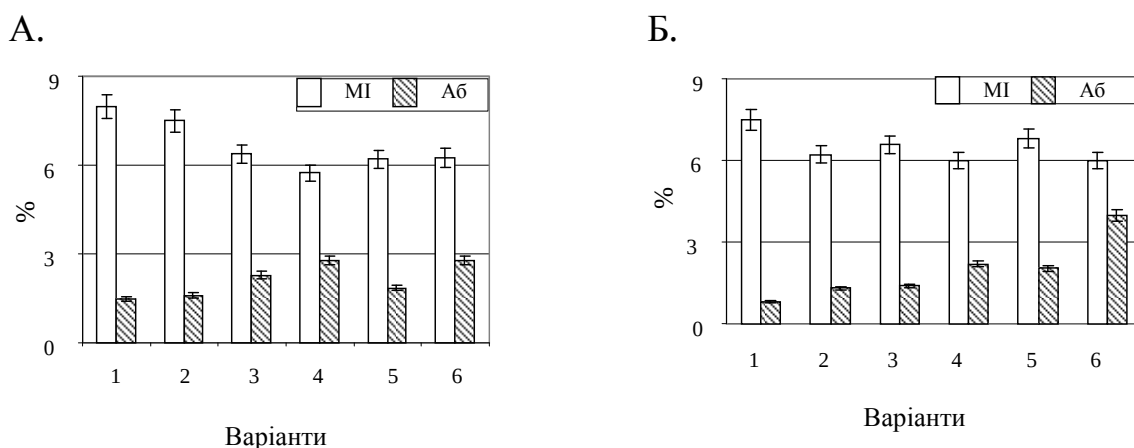


Рис. 5.1. Цитогенетичні параметри меристеми коренів проростків з різними швидкостями проростання при УФ-С-опроміненні в дозі 7,2 кДж/м². А – літо; Б – осінь; МІ – мітотичний індекс; Аб – частота хромосомних аберацій; 1 – ШП; 2 – ШП+УФ-С; 3 – СП; 4 – СП+УФ-С; 5 – ПП; 6 – ПП+УФ-С.

Дуже різноманітною є реакція виділених груп на УФ-С-опромінення: для проростків з групи ШП є можливим гормезисний, чи «лікувальний» ефект опромінення за частотою хромосомних аберацій.

Отримані результати семи повторів експерименту свідчать про залежність поведінки цитогенетичних показників від сезону, протягом якого проводилось дослідження. В усіх повторах досліду найсуттєвіші відмінності МІ, % спостерігались між групами швидко та повільно проростаючих проростків (рис. 5.1, А-Б). Значні відмінності Аб, % виявилися в групах ШП та ПП проростків. Найнестійкішою є поведінка групи проростків, що проростили з середньою швидкістю, для якої значення МІ, % може бути як нижче аналогічного показника повільно проростаючих, так і перевищувати його значення для швидко проростаючих. Даний результат вказує на відсутність суттєвого взаємозв'язку між швидкістю проростання та швидкістю поділу клітин і, зокрема – мітотичним індексом. Відомо, що проростання визначається як розтяганням клітин зародка, так і поділом останніх – процесами, що майже одночасно розпочинаються і проходять паралельно.

Найвищі значення мітотичного індексу відносно контролю серед всіх груп проростків з різними швидкостями проростання спостерігаються влітку (рис. 5.1, А), а частота хромосомних аберацій, навпаки, має тенденцію до зростання восени (рис. 5.1, Б). Така поведінка цитогенетичних характеристик може відображати певне конформаційне різноманіття молекули ДНК, існування більшої чи меншої її доступності факторам транскрипції і реплікації в умовах формування насіння.

Можливими факторами виникнення епігенетичного поліморфізму зародків є терміни і погодні умови запилення квіток, розташування насіння у колосі чи початку – адже це визначає доступність і кількість метаболітів при формуванні ендосперму, ступені розвитку зародків на одній рослині [56, 100, 102, 202, 266]. Всі ці фактори впливають на формування епігенетично різних

програм, включаючи формування різного профілю метилування як ДНК, що транскрибується, так і сателітної ДНК [227, 228, 326].

5.2. Вплив гострого фракціонованого УФ-С-опромінення на зміну профілю метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків з різних епігенетичних груп

Оцінка цитогенетичних параметрів проростків з різних епігенетичних груп показала певні відмінності мітотичного індексу та частоти хромосомних аномалій всередині цих груп, залежно від сезону та УФ-С-опромінення. Наступним було проведення молекулярно-біологічного аналізу, дослідження змін профілей метилування функціонально різних частин ДНК і встановлення взаємозв'язку між ними.

Електрофореграма контролю нативності виділеної ДНК, наведена на рис. 5.2, показує відсутність значної фрагментації ДНК, яка могла б виникнути внаслідок апоптозу, індукованого УФ-С опроміненням.

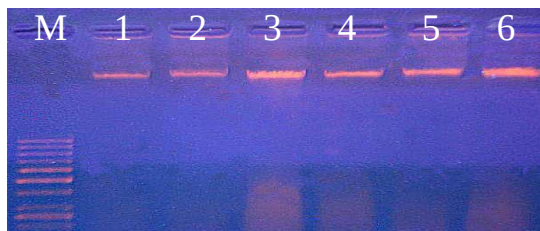


Рис. 5.2. Електрофореграма нативності виділеної ДНК. М – GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50 bp; 1 – ШП; 2 – ШП+УФ-С; 3 – СП; 4 – СП+УФ-С; 5 – ПП; 6 – ПП+УФ-С.

Аналіз електрофореграм розділення продуктів ISSR та ITS ампліфікації нативної ДНК показав відсутність відмінностей між всіма експериментальними варіантами (рис. 5.3, А-Б). Це є не лише підтвердженням високого рівня нативності виділеної ДНК та цілісності її

первинної структури, але і свідчить про те, що наступна участь молекул в ПЛР не призвела до виявлення прихованих пошкоджень, наприклад однониткових розривів, кількість та положення яких може коливатися залежно від функціонального стану проростків та УФ-С-опромінення.



Рис. 5.3. Електрофореграми розділення продуктів ампліфікації нативної ДНК з ITS (А) та ISSR (Б) праймерами. М – GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50 bp; 1 – ШП; 2 – ШП+УФ-С; 3 – СП; 4 – СП+УФ-С; 5 – ПП; 6 – ПП+УФ-С.

Електрофореграма ITS ампліфікації рестриктів реакції з MspI ендонуклеазою (рис. 5.4, А) показує відмінності в профілі метилування проростків з різними швидкостями проростання (варіанти 1, 3, 5). Найбільш явні відмінності спостерігаються між ШП проростками та іншими варіантами.



Рис. 5.4. Электрофореграми ITS ампліфікації рестриктів реакції з MspI (А) і MboI (Б) ферментами. М – GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50 bp; 1 – ШП; 2 – ШП+УФ-С; 3 – СП; 4 – СП+УФ-С; 5 – ПП; 6 – ПП+УФ-С.

Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації з ISSR праймерами рестриктів реакції з MspI ферментом (рис. 5.5, А) ілюструє відмінності в профілі метилування ДНК за сайтами рестрикції цього ферменту серед насіння, проростки якого відрізняються за швидкістю проростання (позиції 1, 3, 5). Електрофореграма проростків зі швидкопроростаючого насіння (позиція 1) містить 4 чітко виражені групи ампліконів з майже однаковою кількістю фрагментів ДНК. Групи ампліконів (позиції 3 та 5) для варіантів «СП» та «ПП» відповідають таким же молекулярним масам, але містять різну кількість фрагментів ДНК. Електрофореграми розділення продуктів ISSR ампліфікації рестриктів реакції з MboI ферментом (рис. 5.5, Б) свідчать про значні відмінності в профілі метилування як серед проростків з різними швидкостями проростання (варіанти 1, 3, 5), так і в межах варіантів «опромінені - неопромінені» (1 і 2, 3 і 4, 5 і 6).



Рис. 5.5. Електрофореграми ISSR ампліфікації рестриктів реакції з MspI (А) та MboI (Б) ферментами. М – GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50 bp; 1 – ШП; 2 – ШП+УФ-С; 3 – СП; 4 – СП+УФ-С; 5 – ПП; 6 – ПП+УФ-С.

Одночасне існування різниць у вихідних профілях метилування ДНК та вихідних рівнях цитогенетичних аномалій свідчить про вплив характеру метилування на уразливість ДНК до дії конститутивних факторів, що обумовлюють її ушкодження, наприклад, активних форм кисню, або теплових коливань. Інакше кажучи, характер метилування ДНК може розглядатися як фактор загальної вразливості цієї макромолекули, в тому числі до радіаційного фактору. Як свідчать одержані результати (табл. 5.1), для проростків із насіння, що швидко проростає, характерно більше різноманіття

ампліконів та менша їх маса, як в контролі, так і після опромінення, що свідчить про вищий рівень метилування відповідних сайтів.

Таблиця 5.1

Довжини рестрикційних фрагментів (п.н.), отриманих у третій серії експериментів

Варіанти	Рестриктази		
	HpaII	MspI	MboI
1. ШП	-	1800, 1700, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 550, 450	550
2. ШП+УФ-С	-	1700, 1500, 1200, 800, 600, 550, 450	700, 650, 550
3. СП	-	1900, 1500, 800, 600, 450	1000, 700, 650, 550
4. СП+УФ-С	-	1900, 1500, 800, 700, 600	700, 650, 550
5. ПП	-	1900, 1700, 1500, 1200, 800, 600	650, 550
6. ПП+УФ-С	-	1500, 1200, 800, 700, 600	700, 650, 550, 300

Таким чином, поліморфізм перебудов профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК безпосередньо пов'язан із їх вихідним поліморфізмом та вихідною частотою хромосомних аберацій, що свідчить про безпосередній взаємозв'язок індивідуальної радіочутливості і радіостійкості цілісної рослини з метилуванням обох типів ДНК.

Заклучна частина

Виявлені відмінності в профілях метилування ДНК, що транскрибується, є підтвердженням висловленого припущення щодо різниці

відображених епігенетичних програм, пов'язаних з фенотипічним поліморфізмом, який проявляється в різній швидкості проростання насіння. До того ж, вони не суперечать і припущенню, висловленому в роботі [56] про те, що екзогенне управління процесом проростання полягає в зміні активності метаболічних процесів, припускаючи, що і варіабельність швидкості проростання може визначатися тим же фактором. Здається можливим, що відмінності в активності метаболічних процесів можуть визначатися як кумуляцією флуктуацій в активностях метаболічних процесів проростків, так і епігенетичним поліморфізмом, пов'язаним з індукцією активності різних ізоферментів.

Як і при інтерпретації даних попередніх розділів, більш складними в цьому випадку є дані, що вказують на відмінності в профілях метилування сателітної ДНК, тобто послідовностей, що не транскрибуються. Функціональна вагомість сателітної ДНК частково пояснюється концепціями, які приписують їй структурну роль в просторовій організації геному, участь в кон'югації гомологічних хромосом під час мейозу та реплікації теломерних ділянок хромосом [123]. Імовірно, в даному випадку різні профілі метилування сателітної ДНК, що означають і різну її спорідненість як з гістонами, так і білками інших функціональних груп, обумовляють і різну конформацію хроматину, і зможуть реалізовуватися в репарувальні або транскрипційні процеси [228].

Співставлення результатів цитогенетичного аналізу зі змінами профілей метилування ДНК, що транскрибується та сателітної після опромінення вказує на їх взаємозв'язок з різною стійкістю до дії УФ-С-опромінення. Відомо, що успішне відновлення подвійних розривів за механізмом гомологічної рекомбінації можливе лише за умов певного рівня релаксації хроматину [300] і, таким чином, також безпосередньо пов'язане з конформацією сателітної ДНК [123].

Значний інтерес викликає питання щодо механізмів і факторів, які визначають важливість виникнення різних епігенетичних програм у насінні,

що формується в однорідній популяції рослин, або навіть на одній рослині за однакових кліматичних умов.

На даний час існує безліч даних щодо змін профілю метилування внаслідок дії різних стресових факторів біотичної та абіотичної природи [22, 49, 281, 320]. Багаточисельними дослідженнями доведено трансгенераційний характер нових сформованих профілей метилування ДНК, що транскрибується [95]. Показано, що різноманітність кліматичних умов призводить до виникнення високого рівня епігенетичного поліморфізму, профіль якого успадковується і сильно перевищує рівень поліморфізму генетичного [277].

Зважаючи на особливості процесів запліднення і формування зародку рослин, можна навести як мінімум кілька факторів, що визначають виникнення поліморфізму епігенетичних програм зародку, сім'ядолей, ендосперму, якщо він є, та їхньої взаємодії протягом проростання [277]. В першу чергу, до таких факторів можна віднести різницю в часі запилення, що відбувається таким чином за різних кліматичних умов. Наступним, не менш важливим фактором, є розташування насінини в колосі, початку, корзинці, що визначає забезпеченість зародка асимілянтами та подальшу програму його взаємодії з запасними тканинами. Імовірно, існують і інші механізми, що формують гетерогенність системи різноманітних впливів на рослину і насіння, що формується, визначаючи набір епігеномів насіння і, в подальшому, швидкість їх проростання і реакцію на дію ендогенних та екзогенних факторів.

Таким чином, поліморфізм перебудов профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК безпосередньо пов'язан з їх вихідним поліморфізмом та вихідною частотою хромосомних аберацій, що свідчить про безпосередній взаємозв'язок індивідуальної радіочутливості і радіостійкості цілісної рослини і характеру метилування обох типів ДНК.

ГЛАВА 6

ЗВ'ЯЗОК РАДІОАДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ РОСЛИН З ВИХІДНИМ ПОЛІМОРФІЗМОМ ПРОФІЛІВ МЕТИЛУВАННЯ ДНК

Результати, одержані у попередній серії досліджень, вказують на важливу роль поліморфізму профілів метилування ДНК як фактору природної індивідуальної і популяційної радіочутливості і радіостійкості. Наступним кроком у з'ясуванні радіобіологічного і загальнобіологічного значення виявленого явища поліморфізму є вивчення адаптивного потенціалу рослин, що відрізняються вихідними профілями метилування функціонально різних послідовностей ДНК.

6.1. Цитогенетичний аналіз формування радіоадаптивної відповіді у епігенетично різних груп рослин

Відповідно одержаним даним, як і у попередній серії досліджень, у проростків, що походять із швидкопроростаючого насіння, спостерігається нижча частота хромосомних аберацій в контрольному варіанті (рис. 6.1).

Порівняння цього показника в режимі “адаптивне – ударне опромінення” та при одномоментному опроміненні в повній дозі $7,2 \text{ кДж/м}^2$ показує, що у ШП проростків спостерігається чітко виражена адаптивна відповідь при ударному опроміненні як через 4 години, так і через добу після адаптивного. У ПП проростків адаптивної відповіді не спостерігається при обох інтервалах між адаптивним і ушкоджуючим опроміненням.

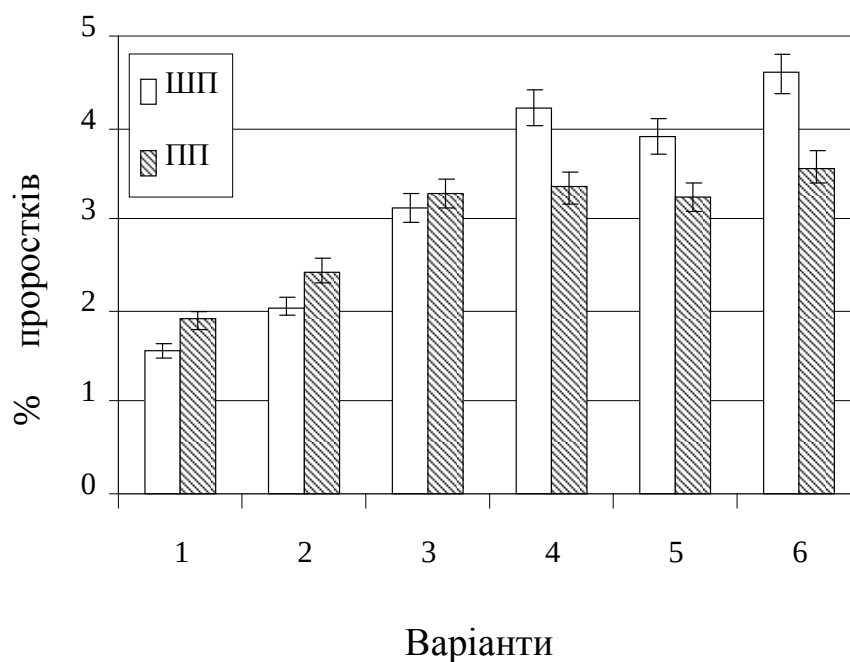


Рис. 6.1. Частота хромосомних аберацій (%) у проростків з насіння, що проростає швидко- (ШП) та повільно (ПП). 1 – контроль; 2 – АД; 3 – АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі); 5 – АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5 в ударній дозі).

6.2. Зміни профілю метилування сателітної та ДНК, що транскрибується, при формуванні радіоадаптивної відповіді у епігенетично різних груп рослин

Перейдемо до розгляду результатів аналізу змін профілю метилування ДНК у епігенетично різних груп рослин. Так як зміна цитогенетичних показників може відображати конформаційні зміни ДНК, було проведено аналіз функціонально різних частин ДНК з метою встановлення точної локалізації відмінностей.

Електрофореграма контролю нативності виділеної ДНК наведена на рис. 6.2. Ці дані свідчать про відсутність суттєвої фрагментації ДНК, потенційно можливої при УФ-С опроміненні.

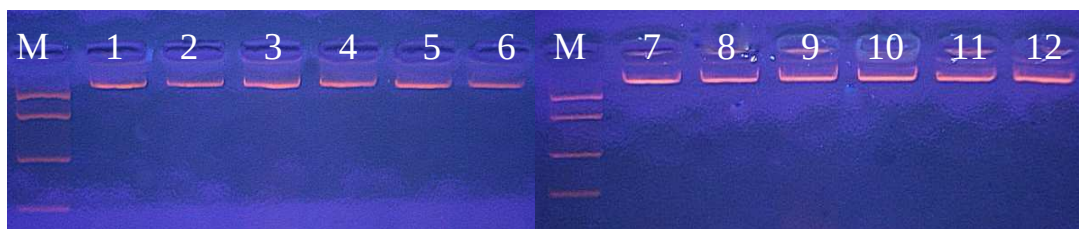


Рис. 6.2. Електрофореграма контролю нативності виділеної ДНК. М - GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50bp; 1 – ШП, контроль; 2 – ШП, АД; 3 – ШП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі); 5 – ШП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5 в ударній дозі); 7 – ПП, контроль; 8 – ПП, АД; 9 – ПП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 10 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9 в ударній дозі); 11 – ПП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 12 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11 в ударній дозі).

Наведена на рис. 6.3 електрофореграма свідчить про значне різноманіття спектрів ампліконів як для продуктів ITS-ампліфікації рестриктів HpaII контрольних зразків ШП та ПП проростків (варіанти 1 і 7), так і для всіх варіантів з УФ-С-опроміненням.

Порівняння цитогенетичної реакції на опромінення в адаптивній дозі (рис. 6.1, табл. 6.1) зі зміною спектру ампліконів для варіантів 2 і 8 свідчить, що висока частота хромосомних аберацій у ПП проростків пов'язана зі значним зростанням кількості ампліконів як більшої, так і меншої молекулярної маси відносно контролю. Також значно відрізняються спектри ампліконів варіантів 3 і 9, 4 і 10, 5 і 11, 6 і 12, що відповідає режиму опромінення «адаптивне - ударне». Таким чином, спостерігаються значні відмінності як вихідних профілей метилування ДНК, що транскрибується, за сайтами рестрикції ферменту HpaII, так і їх зміни при різних режимах УФ-С-опромінення у ШП та ПП проростків.

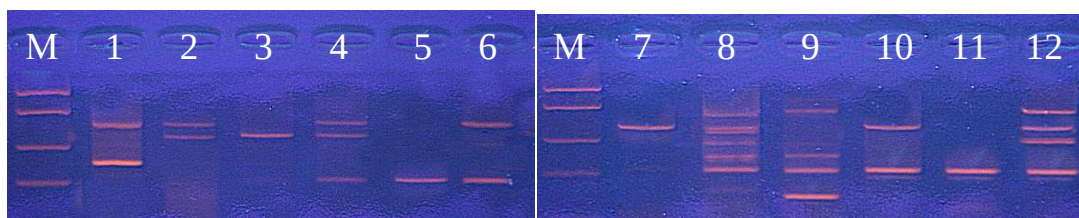


Рис. 6.3. Електрофореграма ITS ампліфікації рестриктів HpaII ферменту. М - GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50bp; 1 – ШП, контроль; 2 – ШП, АД; 3 – ШП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі); 5 – ШП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5 в ударній дозі); 7 – ПП, контроль; 8 – ПП, АД; 9 – ПП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 10 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9 в ударній дозі); 11 – ПП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 12 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11 в ударній дозі).

Електрофореграми ампліфікації з ITS-праймерами продуктів реакції з MspI ферментом (рис. 6.4) показують різниці в наборі ампліконів як в контрольних варіантах 1 і 7, так і при всіх режимах УФ-С-опромінення. Це свідчить про відмінності в профілях метилування ДНК, що транскрибується, для усіх варіантів. Значні відмінності в метилуванні проростків зі ШП насіння спостерігаються серед всіх варіантів, включно з контролем. Поява ампліконів з більшою масою (рис. 6.4, варіанти 2 і 3) свідчить про зменшення в певних ділянках ДНК сайтів рестрикції даного ферменту, а поява низькомолекулярних ампліконів – про зростання кількості сайтів рестрикції.

Загальні відмінності в спектрах ампліконів, а отже профілей метилування ДНК за сайтами рестрикції MspI ферменту полягають в їх більшому різноманітті для ШП проростків за різних режимів впливу відносно ПП проростків.

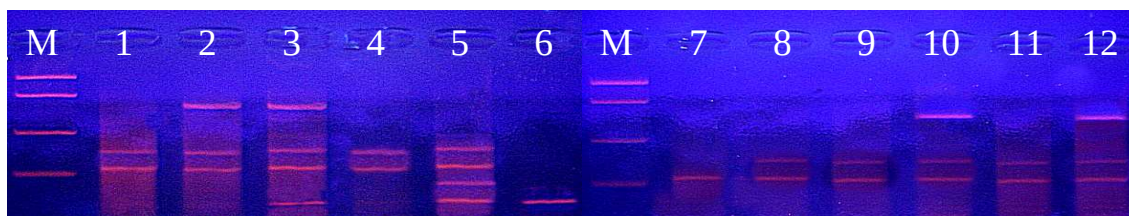


Рис. 6.4. Електрофореграми ITS ампліфікації рестриктів MspI ферменту. М - GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50bp; 1 – ШП, контроль; 2 – ШП, АД; 3 – ШП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі); 5 – ШП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5 в ударній дозі); 7 – ПП, контроль; 8 – ПП, АД; 9 – ПП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 10 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9 в ударній дозі); 11 – ПП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 12 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11 в ударній дозі).

Електрофореграми ампліфікації продуктів рестрикції ферменту MboI (рис. 6.5) також свідчать про значні відмінності профілей метилування за сайтами рестрикції як для контрольних варіантів кожної групи насіння (рис. 6.5, варіанти 1 і 7), так і при різних режимах опромінення.

Співставлення змін набору ампліконів при різних режимах УФ-С-опромінення свідчить про те, що дані зміни відбуваються переважно за рахунок появи ампліконів з масами, що знаходяться в межах мас ампліконів контрольного зразка. Така особливість найбільш виражена для різних варіантів ШП проростків. У ПП проростків з'являються амплікони, маси яких виходять за межі мас контрольного варіанта (рис. 6.5, позиція 12).

Суттєво різняться електрофореграми розділення продуктів ISSR ампліфікації рестриктів реакції з HpaII ферментом (рис. 6.6). Спостерігаються відмінності в профілі метилування ДНК за сайтами рестрикції цього ферменту між проростками з різними швидкостями проростання (рис. 6.6, варіанти 1 і 7).

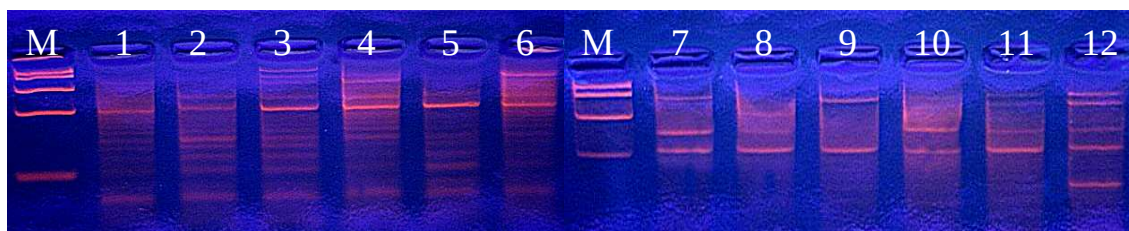


Рис. 6.5. Електрофореграми ITS ампліфікації рестриктів MboI ферменту. М - GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50bp; 1 – ШП, контроль; 2 – ШП, АД; 3 – ШП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі); 5 – ШП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5 в ударній дозі); 7 – ПП, контроль; 8 – ПП, АД; 9 – ПП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 10 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9 в ударній дозі); 11 – ПП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 12 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11 в ударній дозі).

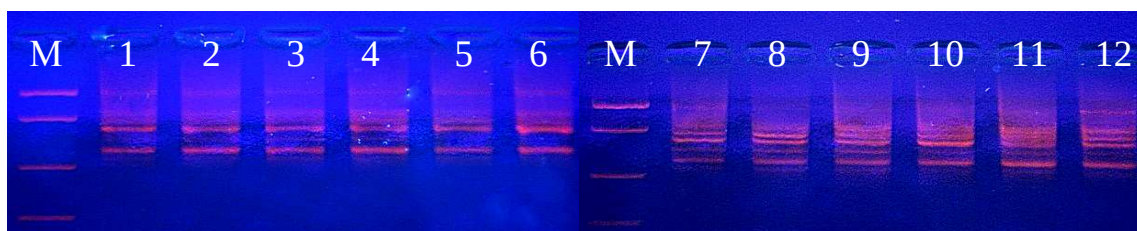


Рис. 6.6. Електрофореграма ISSR-ампліфікації рестриктів HpaII-ферменту. М - GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50bp; 1 – ШП, контроль; 2 – ШП, АД; 3 – ШП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі); 5 – ШП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5 в ударній дозі); 7 – ПП, контроль; 8 – ПП, АД; 9 – ПП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 10 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9 в ударній дозі); 11 – ПП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 12 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11 в ударній дозі).

Електрофореграма розділення продуктів ISSR ампліфікації рестриктів MspI ферменту (рис. 6.7) свідчить про суттєві відмінності профілей метилування у проростків з різних груп, але в межах цих груп профілі

метилування не змінюються залежно від отриманої дози і режиму опромінення.

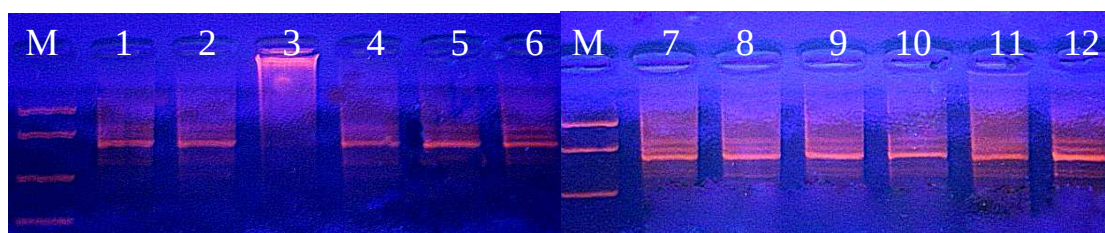


Рис. 6.7. Електрофореграма ISSR ампліфікації рестриктів MspI ферменту. М - GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use, 1000-50bp; 1 – ШП, контроль; 2 – ШП, АД; 3 – ШП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 4 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі); 5 – ШП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 6 – ШП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 5 в ударній дозі); 7 – ПП, контроль; 8 – ПП, АД; 9 – ПП, АД+УД, $\Delta t=4$ год; 10 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 9 в ударній дозі); 11 – ПП, АД+УД, $\Delta t=24$ год; 12 – ПП, ПД (одночасно з опроміненням варіанта 11 в ударній дозі).

Відповідно до одержаних результатів (табл. 6.1), як і у попередній серії експериментів, для проростків з насіння, що проростає швидко, характерна наявність ампліконів меншої маси як в контролі, так і при опроміненні у різних режимах, що свідчить про більш високий рівень метилування певних сайтів. Особливо чітко ця тенденція спостерігається відносно рестрикційних фрагментів MboI ендонуклеази.

Вже при адаптивній дозі спостерігається переключення метилування з підтримуючого на режим *de novo*. Не виключено, що саме ширше вихідне різноманіття профілів метилування обумовлює меншу вразливість ДНК проростків цієї групи і подальші можливості ремоделювання хроматину при опроміненні у різних режимах.

Таблиця 6.1

Довжини рестрикційних фрагментів (п.н.), отримані в четвертій серії експериментів

Варіанти	Рестриктази		
	HpaII	MspI	MboI
1. ШП, контроль	875, 750	750, 700	700, 550
2. ШП, АД	875, 825	875, 750, 700	750, 700, 650, 625, 600, 550
3. ШП, АД+УД, $\Delta t=4$ год	825	875, 750, 700, 600	1000, 900, 800, 750, 700, 650, 625, 600, 550
4. ШП, ПД	875, 825, 700	750, 700	800, 750, 700, 675, 650, 550
5. ШП, АД+УД, $\Delta t=24$ год	700	750, 700, 650, 600	750, 700, 625, 600, 550
6. ШП, ПД	875, 700	600	900, 750, 700, 550
7. ПП, контроль	875	700	900, 750, 700
8. ПП, АД	900, 875, 800, 750, 700	750, 700	800, 750, 700
9. ПП, АД+УД, $\Delta t=4$ год	900, 750, 700, 600	750, 700	900, 700
10. ПП, ПД	875, 700	875, 750, 700	750, 700
11. ПП, АД+УД, $\Delta t=24$ год	700	750, 700	900, 750, 700
12. ПП, ПД	900, 875, 800, 700	875, 750, 700	1000, 900, 750, 700, 600

6.3. Статистичний аналіз взаємозв'язку змін профілів метилування різних послідовностей ДНК та частоти хромосомних аберацій

Проведення статистичного аналізу свідчить, що існує висока значуща кореляційна залежність між частотою хромосомних аберацій та варіюванням електрофореграм за декількома критеріями, що відображають зміни профілю метилування ДНК за різними сайтами метилування залежно від режимів опромінення (табл. 6.2-6.4)

Першим критерієм була зміна загальної кількості ампліконів. Результати наведено в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2

Кореляція між кількістю ампліконів та частотою хромосомних аберацій для проростків з різною швидкістю проростання

Тип насіння	Коефіцієнт рангової кореляції, Rs		
	HpaII	MspI	MboI
Проростає швидко	0,094	-0,18	0,94*
Проростає повільно	0,089*	0,52	0,40

Рівень значущості: $\alpha=0,05$

Другий критерій враховує маси ампліконів та їх відмінності від мас ампліконів контролю:

0 - відсутність відмінностей з контрольним зразком;

1 - різниця в кількості ампліконів (n), маса яких знаходиться в межах маси ампліконів контрольного зразка, $n \leq 3$;

2 - різниця в кількості ампліконів (n), маса яких знаходиться в межах маси ампліконів контрольного зразка, $n \leq 3$ + відмінність в інтенсивності забарвлення смуг.

3 - різниця в кількості ампліконів ($n > 3$), маса яких знаходиться в межах маси ампліконів контрольного зразка;

4 - різниця в кількості ампліконів ($n > 3$), маса яких знаходиться в межах маси ампліконів контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг;

5 - різниця в кількості ампліконів ($n \leq 3$), маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка;

6 - різниця в кількості ампліконів ($n \leq 3$), маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг;

7 - різниця в кількості ампліконів ($n > 3$), маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка;

8 - різниця в кількості ампліконів ($n > 3$), маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг.

Таблиця 6.3

Кореляція між градаціями електрофореграм за другим критерієм та частотою хромосомних аберацій

Тип насіння	Коефіцієнт рангової кореляції, Rs		
	HpaII	MspI	MboI
Проростає швидко	0,95*	0,27	0,94*
Проростає повільно	0,48	0,70	0,52

Рівень значущості: $\alpha = 0,05$

Третій критерій додатково враховує зміщення меж розподілу ампліконів відносно контролю:

0 - відсутність відмінностей з контрольним зразком;

1 - відмінність за кількістю ампліконів, маса яких знаходяться в межах мас контрольного зразка;

- 2 - відмінності в кількості ампліконів, маси яких не виходять за межі мас контрольного зразка + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг, що відповідає різній кількості фрагментів, які належать одному амплікону;
- 3 – відмінності кількості ампліконів, маса яких знаходиться за межами мас ампліконів контрольного зразка «зверху»;
- 4 – відмінності кількості ампліконів, маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка «зверху» + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг;
- 5 – відмінності кількості ампліконів, маса яких знаходиться за межами мас ампліконів контрольного зразка «знизу»;
- 6 – відмінності кількості ампліконів, маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка «знизу» + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг;
- 7 – відмінності кількості ампліконів, маса яких знаходиться за межами мас ампліконів контрольного зразка «зверху» і «знизу»;
- 8 – відмінності кількості ампліконів, маса яких виходить за межі мас ампліконів контрольного зразка «зверху» і «знизу» + відмінності в інтенсивності забарвлення смуг.

Таблиця 6.4

Кореляція між градаціями електрофореграм за третім критерієм та частотою хромосомних аберацій

Тип насіння	Коефіцієнт рангової кореляції, Rs		
	HpaII	MspI	MboI
Проростає швидко	0,94*	0,29	0,78
Проростає повільно	0,70	0,52	0,61

Рівні значущості: * $\alpha=0,05$

Проведені розрахунки свідчать, що існує скоординованість перебудов профілів метилювання сателітної і транскрибованої ДНК та змін радіочутливості, відповідно до частоти хромосомних аберацій, що

підтверджується статистичним аналізом. Очевидно, що від особливостей сформованої мозаїки метильованих сайтів ДНК залежать конформаційні характеристики хроматину. Різна просторова укладка нуклеотидного ланцюга означатиме неоднакову експонованість окремих ділянок молекули до пошкоджуючих факторів і вплине на якість взаємодій «білок – нуклеїнова кислота». За таких умов, стійкість ДНК до двониткових розривів, що є основою формування аберацій, частково може визначатись через структурні особливості упаковки хроматину. При цьому, хімічна модифікація ДНК, одночасно з модифікаціями гістонових білків і факторами ремоделювання визначить структурні перебудови хроматину, змінюючи як ступінь вразливості ДНК, так і динаміку збірки на її послідовностях білкових комплексів для репарації/транскрипції [123, 217, 228, 229, 278].

Одержані дані не лише свідчать про роль метилування ДНК як фактора природної радіочутливості і радіостійкості, але й вказують на можливий біологічний зміст поліморфізму профілів метилування ДНК зародків, властивий довільній вибірці насіння. Варіабельність строків проростання насіння і відмінності в наступній стійкості проростків і рослин є одним з механізмів збереження популяційного і видового гомеостазу в умовах середовища, що змінюється.

Заклучна частина

Отримані результати свідчать про значні відмінності формування адаптивних реакцій на повторну дію стресового фактора у проростків, що відрізняються вихідним профілем метилування ДНК. При цьому відбувається різний характер перебудов профілей метилування ДНК, що транскрибується, у епігенетично різних проростків. Найбільш різноманітні зміни профілей метилування такої ДНК спостерігаються при всіх режимах опромінення у проростків, що мають високу швидкість проростання. Це може свідчити про масивні перебудови в експресії генів, спрямовані на формування різноманітних захисних реакцій. При цьому стратегії захисту відрізняються

за механізмами та їх ефективністю у організмів, початково відмінних профілями метилування ДНК, що свідчить і про їх епігенетичну відмінність.

Різні профілі метилування сателітної ДНК, що означають відмінності в конформації хроматину, можуть мати допоміжний характер при ремоделюванні хроматину. Певні профілі метилування ДНК, що транскрибується, можуть реалізовуватися в транскрипційні процеси лише за умов певної конформації всього хроматину в цілому.

Відмінності в щільності кореляційного взаємозв'язку за різними критеріями для різних сайтів рестрикції можуть свідчити про різну функціональну роль метилування цих ділянок ДНК, що транскрибується, для метаболічних перебудов, які визначають адаптацію.

ЗАКЛЮЧЕННЯ. ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ

Адаптація організмів до тривалої та повторної дії стресових, як біотичних, так і абіотичних факторів, є однією з найяскравіших проявів процесів самоорганізації. Окрім того, що механізми адаптації живих істот становлять одну з ключових проблем фундаментальної науки, їх вивчення має вагоме практичне значення у медицині, сільськогосподарській практиці, техніці.

На сьогодні при вивченні явища адаптації у біологічних і медичних науках найбільша увага надається оцінці співвідношення конститутивних та індукційних механізмів, тобто епігенетичної регуляції, в становленні адаптивної відповіді клітини і цілісного організму на дію додаткового навантаження.

Досягнення молекулярної біології останніх десятиріч виявили існування багаторівневої системи регуляції експресії генів, що об'єднує механізми метилування ДНК, модифікації гістонів, РНК-інтерференцію та участь певних груп білків. Разом з цим встановлено, що зміни метилування ДНК є багатофункціональними процесами, які беруть участь як у розвитку ураження (малігнізація, активізація мобільних елементів), так і у захисних реакціях при дії різноманітних стресових факторів, включаючи опромінення.

Встановлені факти породжують широке коло нових, як загальнобіологічних, так і суто радіобіологічних питань, а саме: зв'язок резистентності ДНК з метилуванням функціонально різних її послідовностей, взаємозв'язок рівня та профілів метилування з загальною метаболічною активністю і радіочутливістю організму, характер змін метилування у різноманітних радіобіологічних реакціях, включаючи формування радіоадаптації при різних дозах і режимах опромінення.

Проведене дисертаційне дослідження об'єднує чотири серії експериментів, направлених на виявлення ролі метилування ДНК, як одного з ключових процесів епігенетичної регуляції, в системі процесів радіаційного

ураження і адаптації рослин до опромінення. Результатом першої серії експериментів є встановлення існування залежності перебудов профілів метилування сателітної і ДНК, що транскрибується, від доз та режимів повторного опромінення. Найбільш значиму залежність виявлено у перебудовах профілів метилування сателітної ДНК, що свідчить про важливість цього фактору в визначенні радіостійкості і адаптації цілісного організму. Встановлено важливі динамічні закономірності індукції переключення метилування з режиму підтримуючого в режим *de novo*. Перша і друга серії досліджень показали залежність перебудов профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК від часу між сеансами гострого УФ-С-опромінення і тривалості хронічного опромінення, що свідчить про зв'язок цих ефектів з реалізацією різних за характеристичними часами епігенетичних механізмів, які лежать в основі адаптації.

Використання біоінформаційних підходів в обробці цих даних встановило існування кількісного зв'язку між змінами характеру метилування ДНК та радіорезистентності цілісної рослини за показником частоти хромосомних аберацій при різних режимах опромінення. Ці результати свідчать, що існує скоординованість перебудов профілів метилування сателітної і ДНК, що транскрибується, та змін радіочутливості, відповідно до частоти хромосомних аберацій. Очевидно, що від особливостей сформованої мозаїки метильованих сайтів ДНК залежать конформаційні характеристики хроматину. Різна просторова укладка нуклеотидного ланцюга означатиме неоднакову експонованість окремих ділянок молекули до пошкоджуючих факторів і впливатиме на якість взаємодій «білок – нуклеїнова кислота». За таких умов, стійкість ДНК до двониткових розривів, що є основою формування аберацій, частково може визначатись через структурні особливості упаковки хроматину. Епігенетичні модифікації на зразок метилування обумовляють конформаційні перебудови

хроматину, змінюючи як ступінь вразливості ДНК, так і динаміку збірки на її послідовностях білкових комплексів для репарації/транскрипції.

Комплекс цих даних переконливо свідчить про те, що характер метилування обох послідовностей як сателітної, так і ДНК, що транскрибується, є вагомим фактором як природної радіочутливості, так і індукованої радіорезистентності.

Подальші дослідження були присвячені розвитку класичної радіобіологічної проблеми зв'язку активності процесів з радіочутливістю і радіостійкістю організму і виконувалися з використанням сучасних молекулярних методів.

Встановлено зв'язок різної швидкості проростання насіння довільної вибірки з вихідним поліморфізмом профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків та їх радіостійкістю, що також підтверджує висновки, зроблені за двома першими серіями експериментів, і дозволяє розглядати характер метилування ДНК як фактор індивідуальної радіостійкості організму, а поліморфізм профілів метилування – як фактор популяційної радіостійкості.

В експериментах четвертої серії встановлено, що адаптивний потенціал рослинного організму також щільно пов'язаний із активністю ростових процесів та вихідним станом метилування функціонально різних послідовностей ДНК, а адаптивні можливості популяції рослин пов'язані з поліморфізмом профілів метилування ДНК.

Таким чином третя та четверта серії експериментів підтвердили і розвинули положення перших двох про те, що характер метилування ДНК є одним з ключових факторів природної радіочутливості і індукованої радіостійкості. Існують принаймні два шляхи його участі у епігенетичній регуляції, причому обидва реалізуються через конформаційні зміни. Перший механізм пов'язаний із формуванням більш «захищеної» від агресивних впливів середовища конформації хроматину, тобто є фактором радіочутливості, другий – обумовлює зміни доступності хроматину

репаративним і транскрипційним факторам, що становить епігенетичну компоненту адаптації.

Окрім значення одержаних результатів в розумінні фундаментальних принципів формування адаптивних процесів вони мають і практичне застосування.

Отримані результати щодо існування поліморфізму метилування функціонально різних послідовностей ДНК і зв'язку цього явища з різною стійкістю та адаптивним потенціалом рослин і рослинних угруповувань вже почали використовувати у селекційній практиці. Подальші дослідження цього питання на серії елітних сортів пшениці призвели до розробки і впровадження маркеру епігенетичного поліморфізму, значення якого пов'язано із виробничою надійністю (екологічною пластичністю) сорту.

Закономірності зміни профілів метилування, як пристосування рослин до дії стресових факторів, можуть бути покладені в основу удосконалення технологій праймування насіння з метою підвищення стійкості і врожайності рослин.

ВИСНОВКИ

Досліджена роль метилування ДНК як складової епігенетичної регуляції адаптації рослин до іонізуючого та УФ-С випромінювань.

Виявлені динамічні закономірності переключення підтримуючого метилування ДНК на метилування *de novo* та перебудов профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК, що свідчить про зв'язок цих ефектів з реалізацією різних за часом розвитку епігенетичних механізмів, які лежать в основі радіоадаптації. Встановлені відмінності формування адаптивної реакції та змін у профілях метилування за умов гострого УФ-С та хронічного гамма – опромінення. Показано існування залежності радіостійкості і адаптивного потенціалу рослин від стану профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК рослини на момент проростання.

1. Внесок епігенетичних механізмів у формування радіоадаптації залежить від дози та режиму опромінення. При формуванні радіоадаптивної реакції змінюються профілі метилування як сателітної, так і ДНК, що транскрибується. Зміни профілів відбуваються за рахунок деметилування існуючих і метилування нових сайтів, що свідчить про перехід від підтримуючого до метилування *de novo* обох функціональних форм ДНК, яке є одним з показників формування епігенетичних захисних механізмів. Переключення метилування сателітної ДНК у режим *de novo* свідчить про участь частини ДНК, що не транскрибується, у визначенні радіостійкості рослинного організму.

2. Переключення метилування ДНК у режим *de novo* відбувається при перевищенні інтервалу між послідовними фракціями УФ-С-опромінення одна година. При збільшенні інтервалу відбуваються подальші зміни профілів метилування і проявів радіоадаптивної реакції, що свідчить про

зв'язок цих ефектів з реалізацією різних за часом розвитку епігенетичних механізмів.

3. При хронічному та комбінованому опроміненні спостерігається ширший, порівняно з гострим опроміненням, діапазон змін довжин рестрикційних фрагментів, що вказує на більший, порівняно з гострим опроміненням, внесок метилування ДНК *de novo* у формування радіобіологічної реакції.

4. Існує зв'язок різної активності проростання насіння з поліморфізмом профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків та їх радіостійкістю. Для рослин, що проростають найшвидше, є характерною вища радіостійкість, що асоціюється з більшим вихідним розмаїттям сайтів метилування, нижчим вихідним рівнем хромосомних аберацій, більшим розмаїттям сайтів метилування при переключенні після опромінення режиму підтримуючого метилування на метилування *de novo*, що дозволяє розглядати характер метилування ДНК як фактор індивідуальної радіостійкості організму.

5. Радіоадаптивний потенціал рослинного організму пов'язаний із активністю процесів проростання насіння та вихідним станом метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків. У рослин, що проростають найшвидше спостерігається вищий потенціал радіоадаптації, що асоціюється з більшим розмаїттям сайтів метилування при переключенні підтримуючого режиму метилування на метилування *de novo* як після адаптивного, так і ударного опромінення.

6. При всіх використаних режимах опромінення виявлено щільну рангову кореляцію між змінами профілів метилування ДНК та радіорезистентністю цілісної рослини за частотою хромосомних аберацій. Відмінності в щільності кореляційного взаємозв'язку за різними критеріями для різних сайтів рестрикції свідчать про різну функціональну роль метилування цих ділянок для конформаційних перебудов хроматину, які визначають радіорезистентність і радіоадаптацію.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Agorio A. ARGONAUTE4 Is Required for Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* / A. Agorio, P. Vera // *The Plant Cell*. - 2007. - Vol. 19. - P. 3778 - 3790.
2. Ahmed K. M. Cyclin D1 in low-dose radiation-induced adaptive resistance / K. M. Ahmed, M. Fan, D. Nantajit, J. S. Murley, D. J. Grdina, J. J. Li // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27, № 53. – P. 6738 – 6748.
3. Antwi D. A. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways / D. A. Antwith, K. M. Gabbara, W. D. Lancaster [et al.] // *Epigenetics*. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. 839 – 848.
4. Aravin A. A. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control / A. A. Aravin, R. Sachidanandam, A. Girard [et al.] // *Science*. - 2007. - Vol. 316, № 5825. - P. 744 - 747.
5. Asaithamby A. Unrepaired clustered DNA lesions induces chromosome breakage in human cells / A. Asaithamby, B. Hu, D. J. Chen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108. – P. 8293 – 8298.
6. Aufzalts W. The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotide / W. Aufzalts, M. F. Mette, A. J. M. Matzke, M. Matzke // *Plant Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 54. – P. 793 – 804.
7. Ausubel M. *Current Protocols in Molecular Biology* / M. Ausubel [et al.] // *Biophotometer – Operating Manual*. – 2004. Електронний ресурс [<http://www.eppendorf.com>]
8. Azzam E. I. Radiation-induced radioresistance in a normal human skin fibroblast cell line, in: *Low Dose Irradiation and Biological Defense Mechanisms* / Azzam E. I., de Toledo S. M., Raaphorst G. P., Mitchel R. E. J. – Amsterdam: Elsevier, 1992. – 294 pp.

9. Azzam E. I. Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10T1/2 mouse embryo cells / E. I. Azzam, S. M. de Toledo, G. P. Raaphorst, R. E. J. Mitchel // Radiat. Res. – 1994. – Vol. 138. – P. 528 – 531.
10. Azzam E.I. Low-dose ionizing radiation decreases the frequency of neoplastic transformation to a level below the spontaneous rate in CH3 10T1/2 cells / E. I. Azzam, S. M. de Toledo, G. P. Raaphorst, R. E. J. Mitchel // Radiat. Res. – 1996. – Vol. 146. – P. 369 – 373.
11. Banda M. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR / M. Banda, A. Bommineni, R. A. Thomas, L. S. Luckinbill, J. D. Tucker // Mutat. Res. - 2008. - Vol. 649, № 1 - 2. - P. 126 – 34.
12. Bannister A. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromodomain / A. Bannister, P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire, T. Kouzarides T. // Nature. – 2001. – Vol. 410. – P. 120 – 124.
13. Bass L. B. Double – Stranded RNA as a Template for Gene Silencing / L. B. Bass // Cell. – 2000. – Vol. 101. – P. 235 – 238.
14. Bartlett J. PCR protocols / J. Bartlett, D. Stirling. – Humana: Humana Press Inc., 2003.
15. Beaudet A. L. Is medical genetics neglecting epigenetics? / A. L. Beaudet // Genetics in Medicine. – 2002. – Vol. – 4. – P. 399 – 402.
16. Belostotsky D. A. Characterization of relic DNA from barley genome / D. A. Belostotsky, E. V. Ananiev // Theor. Appl. Genet. – 1990. – Vol. 80, № 3. – P. 374 - 380.

17. Bender J. A vicious cycle: RNA silencing and DNA methylation in plants / J. Bender // *Cell*. – 2001. – Vol. 106. – P. 129 – 132.
18. Bennet P. V. Are endogenous clustered DNA damages induced in human cells? / P. V. Bennet, N. S. Cintron, L. Gros, J. Laval, B. M. Sutherland // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 37. – P. 488 – 499.
19. Bercak M. The research on the mechanism of plant adaptation in Chernobyl area by using quantitative proteomics / M. Bercak, K. Klubikova, M. Danchenko, L. Skultety, N. M. Rashydov, M. Hadjuch // *Abstr. IX Internat. Conf. PhD. Students Exp. Plant Biol.: Fresh Insights in Plant Affairs*. – 2011. – P. 10.
20. Berkovich E. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair / E. Berkovich, R. J. Monnat, M. B. Kastan // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 683 – 690.
21. Bestor T. H. The DNA methyltransferase of mammals / T. H. Bestor // *Hum. Mol. Genet.* – 2000. – Vol. 9. – P. 2395 – 2402.
22. Bilichak A. The Progeny of Arabidopsis Thaliana Plants Exposed to Salt Exhibit Changes in DNA Methylation, Histone Modifications and Gene Expression / A. Bilichak, Y. Ilnystkyy, Y. Hollunder, I. Kovalchuk // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 1 – 15.
23. Bird A. P. Methylation-induced repression - helts, braces, and chromatin / A. P. Bird, A. P. Wolffe // *Cell*. – 1999. – Vol. 99. – P. 451 – 454.
24. Bont R. D. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data / R. D. Bont, N. Van Larebeke // *Mutagenesis*. – 2004. – Vol. 19. – P. 169 – 185.
25. Boreham D. R. DNA repair in Chlamydomonas reinhardtii induced by heat shock and gamma radiation / D. R. Boreham, R. E. J. Mitchel // *Radiat. Res.* – 1993. – Vol. 135. – P. 365 – 371.

26. Boreham D. R. Heat-induced thermal tolerance and radiation resistance to apoptosis in human lymphocytes / D. R. Boreham, J. A. Dolling, S. R. Maves, S. Miller, D. P. Morrison, R. E. Mitchel // *Biochem. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 75. – P. 393 – 397.
27. Borman C. D. Pulse radiolysis studies of galactose oxidase / C. D. Borman, C. Wright, M. B. Twitchett, G. A. Salmon, A. G. Sykes // *Inorg. Chem.* – 2002. – Vol. 41. – P. 2158 – 2163.
28. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding / M. M. Bedford // *Anal. Biochem.* - 1976. - Vol. 72. - P. 248 - 254.
29. Braunstein S. Regulation of protein synthesis by ionizing radiation / S. Braunstein, M. L. Badura, Q. Xi, S. C. Formenti, R. J. Schneider // *Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 29, № 21. – P. 5645 – 5656.
30. Brenner D. J. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know / D. J. Brenner, R. Doll, D. T. Goodhead, E. J. Hall, C. E. Land, J. B. Little, J. H. Lubin, D. L. Preston, R. J. Preston, J. S. Puskin, E. Ron, R. K. Sachs, J. M. Samet, R. B. Setlow, M. Zaider // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* – 2003. – Vol. 100. – P. 13761 – 13766.
31. Brink R. A. A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible / R. A. Brink // *Genetics.* – 1956. – Vol. 41. – P. 872 – 889.
32. Broome E. J. Adaptation of human fibroblasts to radiation alters biases in DNA repair at the chromosome level / E. J. Broom, D. L. Brown, R. E. J. Mitchel // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – Vol. 75, № 6. – P. 681 – 690.
33. Broome E. J. Dose responses for adaptation to low doses of ^{60}Co γ rays and ^3H β particles in normal human fibroblasts / E. J. Broom, D. L. Brown, R. E. J. Mitchel // *Radiat. Res.* – 2002. – Vol. 158. – P. 181 – 186.

34. Cai L. Mild hyperthermia can induce adaptation to cytogenetic damage caused by subsequent X irradiation / L. Cai, J. Jiang // *Radiat. Res.* – 1995. – Vol. 143. – P. 26 – 33.
35. Cai L. Cytogenetic adaptive response with multiple small X-ray doses in mouse germ cells and its biological influence on the offspring of adapted males / L. Cai, P. Wang // *Mutagenesis.* – 1995. – Vol. 10. – P. 95 – 100.
36. Cai L. Adaptive response to ionizing radiation-induced chromosome aberrations in rabbit lymphocytes: effect of pre-exposure to zinc, and copper salts / L. Cai, M. G. Cherian // *Mutat. Res.* – 1996. – Vol. 369, № 3 – 4. – P. 233 – 241.
37. Candas D. CyclinB1/Cdk1 phosphorylates mitochondrial antioxidant MnSOD in cell adaptive response to radiation stress / D. Candas, M. Fan, D. Nantajit, A. T. Vaughan, J. S. Murley, G. E. Woloschak, D. J. Grdina, J. J. Li // *Mol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 166 – 175.
38. Cao R. Role of H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing / R. Cao, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. S. Jones, Y. Zhang // *Science.* – 2002. – Vol. 298, № 5595. – P. 1039 – 1043.
39. Cao X. Conserved plant genes with similarity to mammalian de novo DNA methyltransferases / X. Cao, N. M. Springer, M. G. Muszynski, R. L. Phillips, S. M. Kaeppler, S. E. Jacobson // *Proc. Natl. Acad. USA.* – 2000. – Vol. 97, № 9. – P. 4979 – 4984.
40. Cao X. Role of the Arabidopsis DRN methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing / X. Cao, S. Jacobsen // *Curr. Biol.* – 2002. – Vol. 12. – P. 1138 – 1144.
41. Chan S. RNAi, DRD1, and Histone Methylation Actively Target Developmentally Important Non-CG DNA Methylation in Arabidopsis / S. Chan, Henderson I. R., Zhang X., Shan J., Chien J. S.-C., Jacobsen S. V. // *PLoS Genetics.* – 2006a. – Vol. 2, № 6. – P. 1 – 7.

42. Chan S. Two-Step Recruitment of RNA –Directed DNA Methylation to Tandem Repeats / S. Chan, X. Zhang, Y. V. Bernatavichute, S. V. Jacobsen // *PLoS Biology*. – 2006 b. – Vol. 4, № 11. – P. 1923 – 1932.
43. Chen C. Evidence that silencing of the HPRT promoter by DNA methylation is mediated by critical CpG sites / C. Chen, M. C. Yang, T. P. Yang // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 320 – 328.
44. Chen J. Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in rice were originated and amplified predominantly after the divergence of *Oryza* and *Brachypodium* and contributed considerable diversity to the species / J. Chen, C. Lu, Y. Zhang, H. Kuang // *Mobile Genetic Elements*. – 2012. – Vol. 2, № 3. – 127 – 132.
45. Chua Y. L. The transcriptional enhancer of the pea plastocyanin gene associates with the nuclear matrix and regulates gene expression through histone acetylation / Y. L. Chua, L. A. Watson, J. C. Gray // *The Plant Cell*. – 2003. – Vol. 15. – P. 1468 – 1479.
46. Chuck G. Big impacts by small RNAs in plant development / G. Chuck, H. Candela, S. Hake // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2009. – Vol. 12. – P. 81 – 86.
47. Chung J. H. Cdk2 is required for p53-independent G₂/M checkpoint control / J. H. Chung, F. Bunz // *PLoS Genet.* – 2010. – Vol. 6, № 2. [e1000863. doi: 10.1371].
48. Clifford S. An investigation into the knowledge and attitudes towards radon testing among residents in a high radon area / S. Clifford, D. Hevey, G. J. Menezes // *J. Radiol. Prot.* – 2012. – Vol. 32, № 4. – P. 141 – 147.
49. Coleman M. A. Low dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic

- radioadaptive response / M. A. Coleman, E. Yin, L. E. Peterson [et al.] // Radiat. Res. – 2005. – Vol. 164, № 41. – P. 369 – 382.
50. Cortes F. Adaptive response in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide before irradiation with X-rays / F. Cortes, I. Dominguez, J. Pinero, J. C. Mateos // Mutagenesis. – 1990. – Vol. 5, № 6. – P. 555 – 557.
51. Costello J. F Methylation matters / J. F. Costello, C. Plass // J. Med. Genet. – 2001. – Vol. 38. – P. 285 – 303.
52. Costes S. V. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization / S. V. Costes, I. Chiolo, J. M. Pluth, M. H. Barcellos-Hoff, B. Jakob // Mutat. Res. – 2010. – Vol. 704. – P. 78 – 87.
53. Danilevskaya O. N. Duplicated fie genes in maize: expression pattern and imprinting suggest distinct functions / O. N. Danilevskaya, P. Hermon, S. Hantke, M. G. Muszynski, K. Kollipara, E. V. Ananiev // Plant Cell. – 2003. – Vol. 15, № 2. – P. 425 – 438.
54. Danska J. S. Rescue of T cell-specific V(D)J recombination in SCID mice by DNA-damaging agents / J. S. Danska, F. Pflumio, C. J. Williams, O. Huner, J. E. Dick, C. J. Guidos // Science. – 1994. – Vol. 266. – P. 450 – 455.
55. Dextraze M. E. DNA interstrand cross-links induced by ionizing radiation: an unsung lesion / M. E. Dextraze, T. Gantchev, S. Girouard, D. Hunting // Mutat. Res. – 2010. – Vol. 704. – P. 101 – 107.
56. Dezfuli P. M. Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.) / P. M. Dezfuli, F. Sharif-Zadeh, M. Janmohammadi // ARPN J. Agricult. Biol. Sci. – 2008. – Vol. 3. – P. 22 – 25.

57. Dianov G. L. Securing genome stability by orchestrating DNA repair: removal of radiation-induced clustered lesions in DNA / G. L. Dianov, P. O'Neill, D. T. Goodhead // *Bioessays*. – 2001. – Vol. 23. – P. 745 – 749.
58. Ding L. H. Comparative Study of Low and High Doses / L. H. Ding, M. Shingyoji, F. Chen, J. J. Hwang, S. Burma, C. Lee, J. F. Cheng, D. J. Chen // *Radiat. Res.* – 2005. – Vol. – 164. – P. 17 – 26.
59. Diskey J. S. Susceptibility to bystander DNA damage is influenced by replication and transcriptional activity / J. S. Dickey, B. J. Baird, C. E. Redon, V. Avdoshina, G. Palchik, J. Wu, A. Kondratyev, W. M. Bonner, O. A. Martin // *Nucl. Acids Res.* – 2012. – Vol. 40, № 20. – P. 10274 – 10286.
60. Doerfler F. DNA methylation and gene activity / F. Doerfler // *Annu. Rev. Biochem.* – 1983. – Vol. 52. – P. 93 – 124.
61. Dolinoy D. C. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development / D. C. Dolinoy, D. Huang, R. L. Jirtle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2007. - Vol. 104. - P. 13056 - 13061.
62. Durante M. Biomarkers of Space Radiation Risk / M. Durante // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2000. – Vol. 76, № 5. – P. 467 – 473.
63. Durante M. Chromosome aberration dosimetry in cosmonauts after single or multiple space flights / M. Durante, G. Snigiryova, E. Akaeva, A. Bogomazova, S. Druzhinin, B. Fedorenko, O. Greco, N. Novitskaya, A. Rubanovich, V. Shevchenko, U. von Recklinghausen, G. Obe // *Cytogenet. Genome Res.* – 2003. – Vol. 103, № 1 – 2. – P. 40 – 46.
64. Fachin A. L. Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated in vitro with low doses of X-rays / A. L. Fachin, S. S. Mello, P. Sandrin-Garcia [et al.] // *Radiat. Res.* – 2007. – Vol. 168, № 6. – P. 650 – 665.
65. Fagard M. Transgenes silencing in plants: how many mechanisms? / M. Fagard, H. Vaucheret // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 51. – P. 167 – 194.

66. Fedoreyeva L. I. N(6)-adenine DNA-methyltransferase in wheat seedlings / L. I. Fedoreeva, B. F. Vanyushin // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 14, № 2 – 3. – P. 305 – 308.
67. Finch-Savage W. E. Seed dormancy and the control of germination / W. E. Finch-Savage, G. Leubner-Metzger // New Phytol. – 2006. – Vol. 171. – P. 501 – 523.
68. Finnegan R. J. Isolation and identification by sequence homology of putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana* / E. J. Finnegan, E. S. Dennis // Nucleic Acids Res. – 1993. – Vol. 21, № 10. – P. 2388 – 2388.
69. Finnegan R. J. DNA methylation in plants / R. J. Finnegan, R. K. Gender, W. J. Peacock, E. S. Dennis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1998. – Vol. 49. – P. 223 – 247.
70. Finnegan R. J. Plant DNA methyltransferases / E. J. Finnegan, K. A. Kovac // Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol. 43, № 3. – P. 189 – 201.
71. Flores M. J. Both bovine and rabbit lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide show an adaptive response to radiation damage / M. J. Flores, J. Pinero, T. Ortiz, N. Pastor, J. C. Mateos, F. Cortes // Mutat. Res. – 1996. – Vol. 372. – P. 9 – 15.
72. Fojtova M. Epigenetic switch from post-transcriptional to transpositional silencing is correlated with promoter hypermethylation / M. Fojtova, H. Van Houdt, A. Depicker, A. Kovarik // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 131, № 3. – P. 1240 – 1250.
73. Fojtova M. The trans-silencing capacity of inventedly repeated transgenes depends on their epigenetic state in tobacco / M. Fojtova, A. Bleys, J. Bedrichova, H. Van Houdt, K. Krezova, A. Depicker, A. Kovar // Nucleic Acids Res. – 2006. – Vol. 34, № 8. – P. 2280 – 2293.

74. Fousteri M. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects / M. Fousteri, L. H. F. Mullenders // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18. – P. 73 – 84.
75. Frey P. A. Free radical mechanisms in enzymology / P. A. Frey, A. D. Hegeman, G. H. Reed // *Chem. Rev.* – 2006. – Vol. 106. – P. 3302 – 3316.
76. Friedberg E. C. DNA repair and mutagenesis [2nd edn.] / Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., Wood R. D., Schultz R. A., Ellenberger T. – Washington DC: ASM Press, 2006. – 1118 pp.
77. Fukasawa K. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes / K. Fukasawa // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – Vol. 7. – P. 911 – 924.
78. Fuks F. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase / F. Fuks, P. J. Hurd, R. Deplus, T. Kouzarides // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31, № 9. – P. 2305 – 2312.
79. Easwaran H. DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer / H. Easwaran, S. E. Johnstone, L. V. Neste [et al.] // *Genome Res.* – 2012. – Vol. 22, № 5. – P. 837 – 849.
80. Eberharter A. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin / A. Eberharter, P. B. Becker // *EMBO Rep.* – 2002. – Vol. 3. – P. 224 – 229.
81. Ebbs M. L. Y3 Lysine 9 Methylation is Maintained on Transcribed Inverted Repeat by Combined Action of SUVH6 and SUVH4 Methyltransferases / M. L. Ebbs, L. Bartee, J. Bender // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25, № 23. – P. 10507 – 10515.
82. Exner V. Chromatin rearrangements in development / V. Exner, L. Hennig // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2008. – Vol. 11. – P. 64 – 69.
83. Gajendiran N. Neutron-induced adaptive response studied in G₀ human lymphocytes using comet assay / N. Gajendiran, K. Tanaka, T. S. Kumaravel, N. Kamada // *Radiat. Res.* – 2001. – Vol. 41. – P. 91 – 101.

84. Gehring M. Imprinting and seed development / M. Gehring, Y. Choi, R. L. Fisher // *The Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16. – P. 203 – 213.
85. Germann S. DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling in vivo, and its use to identify putative LHP1 target loci / S. Germann, T. Luul-Jensen, B. Letarnec, V. Gaudin V. // *Plant J*. – 2006. – Vol. 48, № 1. – P. 153 – 163.
86. Ghandhi S. A. Time-series clustering of gene expression in irradiated and bystander fibroblasts: an application of FBPA clustering / S. A. Grandi, A. Sinha, M. Markatou, S. A. Amundson // *BMC Genomics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 2 – 23.
87. Gong S. L. Adaptive response of thymocyte apoptosis and cell cycle progression induced by low dose X-ray irradiation in mice / S. L. Gong, S. C. Liu, J. X. Liu [et al.] // *Biomed. Environ. Sci*. – 2000. – Vol. 13, № 3. – P. 180 – 188.
88. Goodhead D. T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA / D. T. Goodhead // *Int. J. Radiat. Biol*. – 1994. – Vol. 65. – P. 7 – 17.
89. Gruenbaum Y. Sequences specificity of methylation in higher plant DNA / Y. Gruenbaum, T. Naveh-Many, H. Cedar, A. Rasin // *Nature*. – 1981. – Vol. 292. – P. 860 – 862.
90. Guitton A.-E. Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants / A.-E. Guitton, F. Berger // *Int. J. Dev. Biol*. – 2005. – Vol. 49. – P. 707 – 716.
91. Hada M. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review / M. Hada, A. G. Georgakilas // *J. Radiat. Res*. – 2008. – Vol. 49. – P. 203 – 210.

92. Hafer K. Adaptive Response to Gamma Radiation in Mammalian Cells Proficient and Deficient in Components of Nucleotide Excision Repair / K. Hafer, K. S. Iwamoto, Z. Scuric, R. H. Siciak // *Radiat. Res.* – 2007. – Vol. 168, № 2. – P. 168 – 174.
93. Hamilton A. D. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants / A. D. Hamilton, D. C. Baulcombe // *Science*. – 1999. – Vol. 286, № 5441. – P. 950 – 952.
94. Harper J. W. The DNA damage response: ten years after / J. W. Harper, S. J. Elledge // *Mol. Cell*. – 2007. – Vol. 28. – P. 739 – 745.
95. Hauser M.-T. Transgenerational Epigenetic Inheritance in Plant / M.-T. Hauser, W. Aufsatz, C. Jonak, Ch. Luschnig // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2011. – Vol. 1809, № 8. – P. 1 – 10.
96. Heilmann J. DNA strand break induction and rejoining and cellular recovery in mammalian cells after heavy-ion irradiation / J. Heilmann, H. Rink, G. Taucher-Scholz, J. Kraft // *Radiat. Res.* – 1993. – Vol. 135. – P. 46 – 55.
97. Henault J. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients / J. Henault, G. Robitaille, J. L. Senecal, Y. Raymond // *Arthritis Rheum.* – 2006. – Vol. 54, № 3. – P. 963 – 973.
98. Hendrich B. Human disease with underlying defects in chromatin structure and modification / B. Hendrich, W. Bickmore // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – Vol. 10. – P. 2233 – 2242.
99. Hendrickson E. A. Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair / E. A. Hendrickson // *Amer. J. Hum. Genet.* – 1997. – Vol. 61, № 4. – P. 795 – 800.

100. Hilhorst H. W. M. Dormancy in plant seeds / H. W. M. Hilhorst, W. E. Finch-Savage, J. Buitink [et al.] // *Top. Curr. Genet.* – 2010. – Vol. 28. – P. 295 – 303.
101. Hirochika H. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation / H. Hirochika, H. Okamoto, T. Kakutani // *Plant Cell.* – 2000. – Vol. 12, № 3. – P. 357 – 368.
102. Holdsworth M. J. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination / M. J. Holdsworth, W. E. Finch-Savage, P. Grappin [et al.] // *Trends Plant Sci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 7 – 13.
103. Hooker A. M. The linear no-threshold model does not hold for low-dose ionizing radiation / A. M. Hooker, M. Bhat, T. K. Day [et al.] // *Radiat. Res.* – 2004. – Vol. 162, № 4. – P. 447 – 452.
104. Hu B. Intrachromosomal Changes and Genomic Instability in Site-Specific Microbeam-Irradiated and Bystander Human-Hamster Hybrid Cells / B. Hu, P. Grabham, J. Nie, A. S. Balajee, H. Zhou, T. K. Hei // *Radiat. Res.* – 2012. – Vol. 177, № 1. – P. 25 – 34.
105. Hu H. ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421 / H. Hu, R. A. Gatti // *J. Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 10. – P. 243 – 254.
106. Ide H. Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks / H. Ide, M. I. Shoukamy, T. Nakano, M. Miyamoto-Matsubara, A. M. Salem // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 704. – P. 172 – 183.
107. Irani K. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts / K. Irani, Y. Xia, J. L. Zweier [et al.] // *Science.* – 1997. – Vol. 275, № 5306. – P. 1649 – 1652.
108. Jablonka E. Soft inheritance: challenging the modern synthesis / E. Jablonka, M. Lamb // *Genet. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 31, № 2. – P. 389 – 395.

109. Jacencakova Z. Histone modifications in Arabidopsis – high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin / Z. Jacencakova, W. J. Soppe, A. Meister, D. Gernand, B. M. Turner, I. Schubert // *Plant J.* – 2003. – Vol. 33, № 3. – P. 471 – 480.
110. Jackson J. P. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase / J. P. Jackson, A. M. Lindroth, X. Cao, S. E. Jacobsen // *Nature.* – 2002. – Vol. 416. – P. 556 – 560.
111. Jackson S. A. High-resolution structural analysis of biolistic transgene integration into the genome of wheat / S. A. Jackson, P. Zhang, W. P. Chen, R. L. Phillips, B. Friebe, S. Muthukrishnan, B. S. Gill // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 103. – P. 56 – 62.
112. Jacobsen S. E. Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in Arabidopsis / S. E. Jacobsen, E. M. Meyerowitz // *Science.* – 1997. – Vol. 277, № 5329. – P. 1100 – 1103.
113. Janion C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in Escherichia coli / C. Janion // *Int. J. Biol. Sci.* – 2008. – Vol. 4, № 4. – P. 338 – 344.
114. Joel S. Greenberger Radioprotection In Vivo / S. Joel. - 2009. - Vol. 23, № 2. - P. 323 – 336.
115. Johnson C. A. Chromatin modification and disease / C. A. Jonson // *J. Med. Genet.* – 2000. – Vol. 37. – P. 905 – 915.
116. Jonson L. Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation / L. Jonson, X. Cao, S. Jacobsen // *Curr. Biol.* – 2002. – Vol. 12, № 16. – P. 1360 – 1367.
117. Johnson L. M. The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Lines DNA and Histone Methylation / L. M. Johnson, M. Bostick, X. Zhang, E. Kraft, S.

- E. Jacobsen, I. Henderson, J. Callis // *Curr. Biol.* – 2007. – Vol. 17. – P. 379 – 384.
118. Judson H. A global disorder of imprinting in the human female germ line / H. Judson, B. E. Hayward, E. Sheridan, D. T. Bonthron // *Nature*. – 2002. – Vol. 416. – P. 539 – 542.
119. Kaina B. A general role for c-Fos in cellular protection against DNA-damaging carcinogens and cytostatic drugs / B. Kaina, S. Haas, H. Kappes // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – P. 2721 – 2731.
120. Kanno T. SNF-2-like protein facilitates dynamic control of DNA methylation / T. Kanno, W. Aufsaltz, E. Jaligot, M. F. Mette, M. A. Matzke // *EMBO reports*. – 2005. – Vol. 6, № 7. – P. 649 – 655.
121. Kastan M. B. Cell cycle checkpoints and cancer / M. B. Kastan, J. Bartec // *Nature*. – 2004. – Vol. 432. – P. 316 – 323.
122. Kato M. Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis* / M. Kato, A. Miura, J. Bender, S. E. Jacobsen, T. Kakutani // *Curr. Biol.* – 2003. – Vol. 13, № 4. – P. 421 – 426.
123. Khemleben V. Satellite DNA / V. Khemleben, T. G. Beridze, L. Bakhman, Y. Kovarik, R. Torres // *Uspehi Biologicheskoy Khimii*. – 2003. – Vol. 43. – P. 267 – 306.
124. Kim S. Y. Possible Biomarkers for Low Dose Radiation Exposure and/or for Old Exposure / S. Y. Kim, H. J. Yun, Y. Y. Kwon et al. <http://www.dartmouth.edu/~eprctr/biodose2008/pdf/B10.pdf>
125. Kinoshita Y. Control of FWA gene silencing in *Arabidopsis thaliana* by SINE-related direct repeats / Y. Kinoshita, H. Saze, T. Kinoshita, A. Miura, W. J. Soppe, M. Koornneef, T. Kakutani // *Plant J.* – 2007. – Vol. 49, № 1. – P. 38 – 45.

126. Klovov D. IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects / D. Klovov, T. Criswell, K. S. Leskov [et al.] // *Mutat. Res.* – 2004. – Vol. 568, № 1. – P. 97 – 110.
127. Klooti A. Tissue-specific silencing of a transgene in rice / A. Klooti, X. He, I. Potrykus, T. Hohn, J. Futterer // *PNAS.* – 2002. – Vol. 99, № 16. – P. 10881 – 10886.
128. Kohler C. The polycomb-group protein medea regulates seed development by controlling expression of the mads-box gene pherest 1 / C. Kohler, L. Hennig, C. Spillane, M. Grussem, U. Grossniklaus // *Genes Dev.* – 2003. – Vol. 17. – P. 1540 – 1553.
129. Komatsu M. Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice LINE-type retrotransposon Karma / Komatsu M., K. Shimatoto, J. Kyojuka // *Plant Cell.* – 2003. – Vol. 15, № 8. – P. 1934 – 1944.
130. Koonin E. V. Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? / E. V. Koonin, Y. I. Wolf // *Biol. Direct.* – 2009. – Vol. 4. – P. 1 – 42.
131. Korystov Y. N. The effect of low-dose irradiation on proliferation of mammalian cells in vitro / Y. N. Korystov, N. A. Eliseeva, L. N. Kublik, A. A. Narimanov // *Radiat. Res.* – 1996. – Vol. 146. – P. 329 – 332.
132. Kovalchuk O. Genome Hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl - a Mechanism for Radiation Adaptation? / O. Kovalchuk, P. Burke, A. Arkhipov, N. Kuchma, S. J. James, I. Kovalchuk, I. Pogribny // *Mutat. Res.* - 2003. - Vol. 529, № 1/2. - P. 13 - 20.
133. Kovalchuk I. Molecular Aspects of Plant Adaptation to Life in the Chernobyl Zone / I. Kovalchuk, V. Abramov, I. Pogribny, O. Kovalchuk // *Plant Physiol.* - 2004. - Vol. 135, № 1. - P. 357 - 363.

134. Kovalchuk O. Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl-a mechanism for radiation adaptation / O. Kovalchuk, P. Burke, A. Arkhipov, N. Kuchma, S. J. James, I. Kovalchuk, I. Pogribny // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 529, № 1 – 2. – P. 13 – 20.
135. Kovalchuk O. MicroRNA changes in bystander three-dimensional human tissue models suggest priming of apoptotic pathways / O. Kovalchuk, F. J. Zemp, J. N. Filkowski, A. M. Altamirano, J. S. Dickey, G. Jenkins-Baker, S. A. Marino, D. J. Brenner, W. M. Bonner, O. A. Sedelnikova // *Carcinogenesis.* – 2010. – Vol. 31, № 10. – P. 1882 – 1888.
136. Kravets A. P. Changes in DNA Methylation Pattern in Wheat Plants under Chronical γ – Exposure of seeds / A. P. Kravets, T. A. Mousseau, A. V. Litvinchuk, Sh. Ostermiller, G. S. Vengzhen, D. M. Grodzinskiy // *Tsitologiya I Genetika.* - 2010. - Vol. 44, № 5. - P. 18 - 22.
137. Kravets A. Corn plant DNA methylation pattern changes at UV-C irradiation fractionating / A. Kravets, D. Sokolova, G. Vengzhen, D. Grodzinsky // *Cytology and Genetics.* - 2013. - Vol. 47, № 1. - P. 29 - 35.
138. Krishnaja A. P. Variability in cytogenetic adaptive response of cultured human lymphocytes to mitomycin C, belomycin, quinacrine dihydrochloride, Co-60 γ -rays and hyperthermia / A. P. Krishnaja, N. K. Sharma // *Mutagenesis.* – 2008. – Vol. 23, № 2. – P. 77 – 86.
139. Kunz C. Studies on the effects of a flanking repetitive sequence on the expression of single copy transgenes in *Nicotiana sylvestris* and in *N. sylvestris* – *N. tomentosiformis* hybrids / C. Kunz, J. Narangajava, Y. D. Park, T. Reve Delon, A. Kovarik, B. Koukalova, J. van der Winden, W. Aufzaltz, F. Metle // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 52. – P. 203 – 215.
140. Kurihara Y. Cytogenetic adaptive response of cultured fish cells to low doses of X-rays / Y. Kurihara, M. Rienkjkarn, H. Etoh // *Radiat. Res.* – 1992. – Vol. 33. – P. 267 – 274.

141. Labra M. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. / M. Labra, F. Grassi, S. Imazio, T. Di Fabio, S. Citterio, S. Sgorbati, E. Agradi // *Chemosphere*. – 2004. – Vol. 54, № 8. – P. 1049 – 1058.
142. Lee Y. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers / Y. Lee, Y. J. Kim, Y. J. Choi [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2015. – Vol. 91, № 2. – P. 142 – 149.
143. Li P. P53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2 / P. Li, R. Dietz, R. von Harsdorf // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18, № 21. – P. 6027 – 6036.
144. Lieber M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway / M. R. Lieber // *Annu. Rev. Biochem.* – 2010. – Vol. 79. – P. 181 – 211.
145. Lin Z. I. Activation of rice endogenous retrotransposon Tos17 in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions / Z. I. Lin, F. P. Han, M. Tan, X. H. Shan, Y. Z. Dong, X. Z. Wang, G. Fedak, S. Hao-Bao Liu // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – Vol. 109. – P. 200 – 209.
146. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA / T. Lindahl // *Nature*. – 1993. – Vol. 362. – P. 709 – 715.
147. Lindahl T. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks / T. Lindahl, M. S. Satoh, G. G. Poireir, A. Klungland // *Trends Biochem. Sci.* – 1995. – Vol. 20. – P. 405 – 411.
148. Lindroth A. M. Requirement of Chromo methylase 3 is required of CpXpG methylation / A. M. Lindroth, X. Cao, J. P. Jackson, D. Zillberman,

- C. M. MacCallum, S. Henikoff, S. E. Jacobsen // *Science*. – 2001. – Vol. 292. – P. 2077 – 2080.
149. Lippman Z. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control / Z. Lippman, A. V. Gendrel, M. Black, M. W. Vaughn, N. Dedhia, W. R. McCombie, K. Lavine, V. Msttel, B. May, K. D. Kasschau, J. C. Carrington, R. W. Doerge, V. Colot, R. Martienssen // *Nature*. – 2004. – Vol. 22, № 6998. – P. 471 – 476.
 150. Liu Zh. Low-Dose UVA Radiation-Induced Adaptive Response in Cultured Human Dermal Fibroblasts / Zh. Liu, H. Chen, H. Yang, J. Liang, X. Li // *Int. J. Photoenergy*. – 2012. – Vol. 2012 [<http://dx.doi.org/10.1155/2012/167425>].
 151. Lorenz E. Some biological effects of long continued irradiation / E. Lorenz // *Amer. J. Roentgenol.* – 1950. – Vol. 63, №. 2. – P. 176 – 185.
 152. Lorenz E. I. Long-term effects of acute and chronic irradiation in mice. Survival and tumor incidence following chronic irradiation of 0.11 r per day / E. I. Lorentz, I. W. Hollcroft, E. Miller [et al.] // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1955. – Vol. 15, №. 4. – P. 1049 – 1060.
 153. Luckey T. D. Hormesis with Ionizing Radiation / Luckey T. D. – Boca Raton: CRC Press, 1980. – 222 pp.
 154. Luo X. Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation / X. Luo, O. Puig, J. Hyun, D. Bohmann, H. Jasper // *EMBO J.* – 2007. – Vol. 26, № 2. – P. 380 – 390.
 155. Lusser A. Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation / A. Lusser // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – Vol. 5. – P. 437 – 443.
 156. Lusser A. D. Histone deacetylation: lessons from plant kingdom / A. D. Lusser, P. Koller, I. Loid // *Trends Plant Sci.* – 2001. – Vol. 6. – P. 59 – 65.

157. Mahaney B. L. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining / B. L. Mahaney, K. Meek, S. P. Lees-Miller // *Biochem J.* – 2009. – Vol. 417, № 3. – P. 639 – 650.
158. Malagnas F. An Arabidopsis SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation / F. Malagnas, L. Bartee, J. Bender // *The EMBO J.* – 2002. – Vol. 21, № 24. – P. 6842 – 6852.
159. Mallory A. C. MicroRNAs: something important between the genes / A. C. Mallory, H. Vaucheret // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2004. – Vol. 7. – P. 120 – 125.
160. Marples B. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population / B. Marples, M. C. Joiner // *Radiat. Res.* – 1993. – Vol. 133. – P. 41 – 51.
161. Marples B. Low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells / B. Marples, P. Lambin, K. A. Skov, M. C. Joiner // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1997. – Vol. 71, № 6. – P. 721 – 735.
162. Martin M. Activation of c-fos by low-dose radiation: a mechanism of the adaptive response in skin cells / M. Martin, F. Crechet, B. Ramounet, J.-L. Lefaix // *Radiat. Res.* – 1995. – Vol. 141. – P. 118 – 119.
163. Mathieu O. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis / O. Mathieu, Z. Jasencakova, I. Vaillant, A.-V. Gendrel, V. Colot // *Plant Cell.* – 2003. – Vol. 15, № 12. – P. 2929 – 2939.
164. Mathie O. RNA-directed DNA methylation / O. Mathie, J. Bender // *J. Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117. – P. 4881 – 4888.

165. Mathieu O. Distinct regulation of histone H3 at lysines 27 and 29 by CpGp methylation in Arabidopsis / O. Mathieu, A. V. Probst, J. Paszkowski // *The EMBO J.* – 2005. – Vol. 24, № 15. – P. 2783 – 2791.
166. Meyer P. Transcriptional transgene silencing and chromatin component / P. Meyer // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 43, № 2 – 3. – P. 221 – 234.
167. Mimutinovic S. Epigenomic Stress Response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes / S. Mimutinovic, Q. Zhuang, A. Niveleau, M. Szyf // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 17. – P. 14985 – 14995.
168. Mitchel R. E. J. Beta-radiation-induced resistance to MNNG initiation of papilloma but not carcinoma formation in mouse skin / R. E. J. Mitchel, N. J. Gragtmans, D. P. Morrison // *Radiat. Res.* – 1990. – Vol. 121. – P. 180 – 186.
169. Mitchel R. E. J. Adaptive response modification of latency for radiation-induced myeloid leukemia in CBA/H mice / R. E. J. Mitchel, J. S. Jackson, R. A. McCann, D. R. Boreham // *Radiat. Res.* – 1999. – Vol. 152. – P. 273 – 279.
170. Moghbeli-Nejad S. Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: a possible sign of genomic instability / S. Moghbeli-Nejad, H. Mozdarani, A. Aleyasin // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – Vol. 29, № 1. – P. 89 – 94.
171. Monsieurs M. A. Adaptive response in patients treated with ¹³¹I / M. A. Monsieurs, H. M. Thierens, A. M. Vral, C. Van De Wiele, L. Y. Ridder, R. A. Dierck // *J. Nucl. Med.* – 2000. – Vol. 41. – P. 17 – 22.

172. Morimoto S. Cellular responses by exposure to heavy-ions / S. Morimoto, A. Gordon, N. Fukunishi, F. Yatagai // *Adv. Space Res.* – 2001. – Vol. 27, № 2. – P. 401 – 409.
173. Moskalev A. A. Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms / A. A. Moskalev, E. N. Plyusnina, M. V. Shaposhnikov // *Biogerontology*. – 2011. – Vol. 12. – P. 253 – 263.
174. Mothersill C. Alternative Medicine Techniques Have Non-Linear Effects on Radiation Response and Can Alter the Expression of Radiation Induced Bystander Effects / C. Mothersill, R. Smith, M. Henry, C. Seymour, R. Wong // *Dose Response*. – 2013. – Vol. 11, № 1. – P. 82 – 98.
175. Mylne J. S. LHP1, the Arabidopsis homology of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC / J. S. Mylne, L. Barrett, F. Tessadori, S. Mesnage, L. Johnson, Y. V. Bernatavichute, S. T. Jacobsen, P. Fransz, C. Dean // *PNAS*. – 2006. – Vol. 103, № 13. – P. 5012 – 5035.
176. Nakayama J. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly / J. Nakayama, J. C. Rice, B. D. Strahl, D. C. Allis, S. L. S. Grewal // *Science*. – 2001. – Vol. 292. – P. 110 – 113.
177. Naumann K. Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis / K. Naumann, A. Fischer, I. Hofmann, V. Krauss, S. Phalke, K. Irmeler, G. Hause, A.-N. Aurich, R. Dorn, T. Jenuwein, G. Reuter // *The EMBO J.* – 2005. – Vol. 24, № 7. – P. 1418 – 1429.
178. Ng H.-H., Bird A. DNA methylation and chromatin modification / H.-H. Ng, A. Bird // *Curr. Opin. Genet. & Devel.* – 1999. – Vol. 9. – P. 158 – 163.

179. Oakeley E. J. Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation / E. J. Oakley, A. Podesta, J.-P. Jost // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 11721 – 11725.
180. Olivieri G. Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine / G. Olivieri, J. Bodycote, S. Wolff // *Science.* – 1984. – Vol. 23. – P. 594 – 597.
181. Orphanides G. A unified theory of gene expression / G. A. Orphanides, D. Reinberg // *Cell.* – 2002. – Vol. 108. – P. 439 – 451.
182. Orre L. M. P53 is involved in clearance of ionizing radiation-induced RAD51 foci in a human colon cancer cell line / L. M. Orre, B. Stenerlow, S. Dhar, R. Larsson, R. Lewensohn, J. Lehtio // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 342, № 4. – P. 1211 – 1217.
183. Papa C. M. Maize chromomethylase Zea methyltransferase 2 is required for CpNpG methylation / C. M. Papa, N. M. Springer, M. G. Muszynski, R. Meeley, S. M. Kaeppler // *The Plant Cell.* – 2001. – Vol. 13. – P. 1919 – 1928.
184. Parra M. The cJun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway mediates induction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) by the alkylating agent MNNG of urokinase / M. Parra, F. Llius, F. Miralles, C. Cealles, P. Munoz-Canoves // *Blood.* – 2000. – Vol. 96, № 4. – P. 1415 – 1424.
185. Park S. H. Inducible heat-shock protein is involved in the radioadaptive response / S. H. Park, S. J. Lee, H. Y. Chung, T. H. Kim, C. K. Cho // *Radiat. Res.* – 2000. – Vol. 153, № 3. – P. 318 – 326.
186. Peixoto P. M. Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel (MAC) Function Triggers a Bax/Bak-Dependent Bystander Effect / P. M. Peixoto, J. K. Lue, Sh.-Y. Ryu, B. N. Wroble, J. C. Sible, K. W. Kinnally // *Amer. J. Pathol.* – 2011. – Vol. 178, № 1. P. 48 – 54.

187. Peled-Kamar M. Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for Down syndrome / M. Peled-Kamar, J. Lotem, E. Okon, L. Sachs, Y. Groner // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14, № 20. – P. 4985 – 4993.
188. Pelevina I. I. Adaptive response in different mitotic cycles after irradiation / I. I. Pelevina, A. V. Aletshenko, M. M. Antoshina // *Tsitologiya.* - 2009. - Vol. 51, № 1. - P. 78 - 83.
189. Pfluger J. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants / J. Pfluger, D. Wagner // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 10. – P. 645 – 652.
190. Pikaard C. S. Nucleolar dominance: uniparented gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrid / C. S. Pikaard // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 43. – P. 163 – 177.
191. Pipal A. Regulation and processing of maize histone deacetylase Hda1 by limited proteolysis / A. Pipal, M. Goralik-Schramel, A. Lusser, C. Langanova, B. Sarg, A. Loidl, H. Lindler, V. Rossi, P. Loidl // *Plant Cell.* – 2003. – Vol. 15, № 8. – P. 1904 – 1917.
192. Pogribny I. Fractionated Low-Dose Radiation Exposure Leads to Accumulation of DNA Damage and Profound Alterations in DNA and Histone Methylation in the Murine Thymus / I. Pogribny, I. Koturbash, V. Tryndyak, D. Hudson, S. M. L. Stevenson, O. Sedelnikova, W. Bonner, O. Kovalchuk // *Mol. Cancer Res.* - 2005. - Vol. 3. - P. 553 - 561.
193. Powell S. N. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation / S. N. Powell, L. A. Kachnic // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 5784–5791.

194. Pradhan S. Isolation, characterization and baculovirus-mediated expression of the cDNA coding cytosine DNA methyltransferases from *Pisum sativum* / S. Pradhan, M. Cummings, R. J. Roberts, R. L. P. Adams // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – Vol. 26. – P. 1214 – 1222.
195. Raaphorst G. P. Adaptive response and its variation in human normal and tumor cells / G. P. Raaphorst, S. Boyden S // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – Vol. 75. – P. 865 – 873.
196. Rabinowicz P. D. Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals / P. D. Rabinowicz, L. E. Palmer, B. P. May, M. T. Hemann, S. W. Lowe, W. R. McCombie, R. A. Martienssen // *Genome Res.* – 2003. – Vol. 13, № 12. – P. 2658 – 2664.
197. Rattan S. I. Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing, angiogenesis, and differentiation / S. I. Rattan, R. A. Fernandes, D. Demirovic, B. Dymek, C. F. Lima // *Dose Response.* – 2009. – Vol. 7, № 1. – P. 90 – 103.
198. Reardon J. T. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients / J. T. Reardon, T. Bessho, H. C. Kung, P. H. Bolton, A. Sancar // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 9463 – 9468.
199. Redpath J. L. Induction of an adaptive response against spontaneous neoplastic transformation in vitro by low-dose gamma radiation / J. L. Redpath, R. J. Antoniono // *Radiat. Res.* – 1998. – Vol. 149. – P. 517–520.
200. Reese B. E. The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factors 1 / B. E. Reese, K. E. Bachman, S. B. Baylin, M. B. Rountree // *Mol. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 23, № 9. – P. 3226 – 3236.

201. Reik W. Genomic imprinting: parental influence on the genome / W. Reik, J. Walter // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – Vol. 2. – P. 21 – 32.
202. Reymers F. Plant in its infancy / Reymers F. – Novosibirsk: Nauka, 1987. – 355 pp.
203. Robertson K. L. DNA methylation: past, present and future directions / K. L. Robertson, P. Jones // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol. 21, № 3. – P. 461 – 467.
204. Robertson K. D. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters / K. D. Robertson, S. Ait Si-Ali, T. Yokochi, P. A. Wade, P. L. Jones, A. P. Wolffe // *Nat. Genet.* – 2000. – Vol. 25. – P. 338 – 342.
205. Rocha P. The Arabidopsis HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING1 Gene Codes for an S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Required for DNA Methylation-Dependent Gene Silencing / P. Rocha, M. Sheikha, R. Melchiorrea, M. Fagard, S. Boutet, R. Loach, B. Moffatt, K. Wagner, H. Vaucheret, I. Furnera // *Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – P. 404 – 417.
206. Rodríguez-Serrano M. NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley / M. Rodriguez-Serrano, I. Bárány, D. Prem, M. J. Coronado, M. C. Risueño, P. S. Testillano // *J. Exp. Bot.* – 2012. – Vol. 63, № 5. – P. 2007 – 2024.
207. Ronchi A. The reduced expression of endogenous duplications (REED) in the maize R gene family is mediated by DNA methylation / A. Ronchi, K. Petroni, C. Tonelli // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14, № 21. – P. 5318 – 5328.
208. Rothfuss A. Involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the adaptive protection of human lymphocytes after hyperbaric oxygen (HBO) treatment / A. Rothfuss, P. Radermacher, G. Speit // *Carcinogenesis*. – 2001. – Vol. 22, № 12. – P. 1979 – 1985.

209. Russo V. E. A. Epigenetic mechanisms of gene regulation / V. E. A. Russo, R. A. Martienssen, A. D. Riggs. – New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996 – 692 pp.
210. Sage E. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival / E. Sage, L. Harrison // *Mutat. Res.* – 2011. – Vol. 711. – P. 123 – 133.
211. Santos-Rebouqas C. B. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases / C. B. Santos-Rebouqas, M. M. G. Pimentel // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 15. – P. 10 – 17.
212. Sasaki M. S. On the reaction kinetics of the radioadaptive response in cultured mouse cells / M. S. Sasaki // *Int. J. Rad. Biol.* – 1995. – Vol. 68. – P. 281 – 291.
213. Sawant S. G. Adaptive response and the bystander effect induced by radiation in C3H 10T1/2 cells in culture / S. G. Sawant, G. Randers-Pehrson, N. F. Metting, E. J. Hall // *Radiat. Res.* – 2001. – Vol. 156. – P. 177 – 180.
214. Schappi-Buchi C. On the genetic background of the adaptive response to X-rays in *Drosophila melanogaster* / C. Schappi-Buchi // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1994. – Vol. 65. – P. 427 – 435.
215. Schicazono N. The yield, processing and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation / N. Schicazono, M. Noguchi, K. Fujii, A. Urushibara, A. Yokoya // *J. Radiat. Res.* – 2009. – Vol. 50. – P. 27 – 36.
216. Schubert D. Epigenetic control of plant development by Polycomb-group proteins / D. Schubert, O. Clarenz, J. Goodrich // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – Vol. 8. – P. 553 – 561.

217. Serebryanyi A. M. Radiation Adaptive Response as a Stress Reaction of a Cell / A. M. Serebryanyi // Radiat. biology. Radioecology. - 2011. - Vol.51, №4. - P. 399 – 405.
218. Shadley J. D. Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation / J. D. Shadley, S. Wolff // Mutagenesis. – 1987. – Vol. 2, № 2. – P. 95 – 96.
219. Shadley J. D. Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity / J. D. Shadley, J. K. Wiencke // Int. J. Radiat. Biol. – 1989. – Vol. 56. – P. 107 – 118.
220. Shemetun O. V. The detection of stable and unstable markers of radiation action in persons with a history of chronic irradiation using the methods of routine and differentiated staining of metaphase chromosomes / O. V. Shemetun, M. A. Pilins'ka // Tsitol. Genet. – 1998. – Vol. 32, № 1. – P. 32 – 37.
221. Shen J. Programmed cell death and apoptosis in aging and life span regulation / J. Shen, J. Tower // Discov. Med. – 2009. – Vol. 8, № 43. – P. 223 – 226.
222. Shen H. An acute negative bystander effect of γ -irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells / H. Shen, H. Yu, P. H. Liang, H. Cheng, R. XuFeng, Y. Yuan, P. Zhang, C. A. Smith, T. Cheng // Blood. – 2012. – Vol. 119, № 15. – P. 3629 – 3637.
223. Shibata A. Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G₂/M checkpoint arrest / A. Shibata, O. Barton, A. T. Noon, K. Dahm, D. Deckbar, A. A. Goodarzi // Mol. Cell Biol. – 2010. – Vol. 30. – P. 3371 – 3383.
224. Shimizu T. Coordinated Regulation of Radioadaptive Response by Protein Kinase C and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase / T. Shimizu,

- T. Kato, A. Tachibana, M. S. Sasaki // *Exp. Cell Res.* – 1999. – Vol. 251, № 2. – P. 424 – 432.
225. Skov K. A. A preliminary investigation into the extent of increased radioresistance or hyper-radiosensitivity in cells of hamster cell lines known to be deficient in DNA repair / K. A. Skov, B. Marples, J. B. Mattherws, M. C. Joiner, H. Zhou // *Radiat. Res.* – 1994. – Vol. 138. – P. 126 – 129.
226. Smith G. C. The DNA-dependent protein kinase / G. C. Smith, S. P. Jackson // *Genes Dev.* – 1999. – Vol. 13. – P. 916 – 934.
227. Sokolova D. A. An Analysis of the Correlation between the Changes in Satellite DNA Methylation Patterns and Plant Cell Responses to the Stress / D. A. Sokolova, G. S. Vengzhen, A. P. Kravets // *CellBio.* – 2013. – Vol. 2. – P. 163 – 171.
228. Sokolova D. The Effect of DNA Modification Polymorphism of Corn Seeds on Their Germination Rate, Seedling Resistance and Adaptive Capacity under UV-C Exposure / D. A. Sokolova, G. S. Vengzhen, A. P. Kravets // *American Journal of Plant Biology.* – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. 1 – 14.
229. Sokolova D. A. Effect of Epigenetic Polymorphism of Corn Seeds on their Germination Rate and Resistance of Seedlings under UV-C Exposure / D. A. Sokolova, G. S. Vengzhen, A. P. Kravets // *Tsitologiya I Genetika.* – 2014. – Vol. 46, №4. – P. 221 – 229.
230. Stahl R. T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors / R. Stahl, H. Horvath, J. Van Fleet, M. Voetz, D. Wettstein, N. Wolf // *PNAS.* – 2002. – Vol. 99, № 4. – P. 2146 – 2151.
231. Steimer A. Epigenetic control of plant development: new layers of complexity / A. Steimer, H. Schob, U. Grossniklaus // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2004. – Vol. 7. – P. 11 – 19.

232. Sterward N. Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in coil-stressed quiescent / N. Sterward, T. Kusano, H. Sano // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28, № 17. – P. 3250 – 3259.
233. Sturaro M. Methylation of the Opaque 2 box in zein genes is parent-dependent and affects O₂ DNA binding activity in vitro / M. Sturaro, A. Violli // *Plant Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 46, № 5. – P. 549 – 569.
234. Sugrue T. Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines / T. Sugrue, J. A. Brown, N. F. Lowndes, R. Ceredig // *Stem Cells.* – 2013. – Vol. 31, № 1. – P. 137 – 45.
235. Svitashhev S. Association of transgene integration sites with chromosome rearrangements in hexaploid oat / S. Svitashhev, E. Ananiev, W. P. Pawlovski, D. A. Sommers // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – Vol. 100. – P. 872 – 880.
236. Szumiel I. Adaptive response: stimulated DNA repair or decreased damage fixation? / I. Szumiel // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2005. – Vol. 83, № 3. – P. 233 – 241.
237. Tapio S. Radioadaptive response revisited / S. Tapio, V. Jacob // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2007. – Vol. 46, № 1. – P. 1 – 12.
238. Tariq M. DNA and histone methylation in plant / M. Tariq, J. Paszkowski // *Trends Genet.* – 2004. – Vol. 20, № 6. P. 244 – 251.
239. Tariq M. Easure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone methylation in heterochromatin / M. Tariq, H. Saze, A. V. Probst, J. Lichota, Y. Havu, J. Paszkowski // *PNAS.* – 2003. – Vol. 100. – P. 8823 – 8827.

240. Teerwanichpan P. Characterization of two rice DNA methyltransferase genes and RNA-mediated reactivation of a silenced transgene in rice callus / P. Teerwanichpan, M. B. Chandrasekharan, Y. Jiang, J. Narangajavana, T. C. Hall // *Planta*. – 2004. – Vol. 218, № 3. – P. 337 – 349.
241. Terato H., Clustered DNA damage induced by heavy ion particles / H. Terato, H. Ide // *Biol. Sci. Space*. – 2004. – Vol. 18. – P. 206 – 212.
242. Tian L. Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis* histone deacetylase (*AtHD1*) expression / L. Tian, J. Wang, M. P. Fong, M. Chen, H. Caj, S. B. Gelvin, Z. J. Chen // *Genetics*. – 2003. – Vol. 165, № 1. – P. 399 – 409.
243. Tiku A. B. Radiomodification of glyoxalase I in the liver and spleen of mice: adaptive response and split-dose effect / A. B. Tiku, R. K. Kale // *Mol. Cell. Biochem.* – 2001. – Vol. 216, № 1 – 2. – P. 79 – 83.
244. Tikunov Yu. M. Application of ISSR Markers in the Genus *Lycopersicon* / Yu. M. Tikunov, L. I. Khrystaleva // *Euphitica*. – 2003. – Vol. 131. – P. 71 – 80.
245. Toorop P. E. Differentially expressed genes associated with dormancy or germination of *Arabidopsis thaliana* seeds / P. E. Toorop, R. M. Barocco, G. Engler [et al.] // *Planta*. – 2005. – Vol. 221. – P. 637 – 647.
246. Trostensen T. The *Arabidopsis* SUVR4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9 / T. Trostensen, A. Fisher, S. V. Sandvik, S. S. Johnsen, P. E. Grini, G. Reuter, R. B. Aalen // *Nucleic Acid Res.* – 2006. – Vol. 34, № 9. – P. 5461 – 5470.
247. Tucker P. C. Inhibition of nitric oxide synthesis increases mortality in Sindbis virus encephalitis / P. C. Tucker, D. E. Griffin, S. Choi [et al.] // *J. Virol.* – 1996. – Vol. 70, № 6. – P. 3972 – 3977.

248. Ugarcovic D. Functional elements residing within satellite DNAs / D. Ugarcovic // EMBO Reports. - 2005. - Vol. 8, № 11. - P. 1035 – 1039.
249. Ulsh B. A. Cytogenetic dose-response and adaptive response in cells of ungulate species exposed to ionizing radiation / B. A. Ulsh, S. M. Miller, F. F. Mallory, R. E. Mitehel, D. P. Morrison, D. R. Boreham // J. Environ. Radioact. – 2004. – Vol. 74, № 1 – 3. – P. 73 – 81.
250. Uppal A. Induction of phr gene expression in Escherichia coli strain KY706/pPL-1 by UVA (365 nm) irradiation / A. Uppal, R. Kohli, P. K. Gupta, P. S. Dubey // Ann. Microbiol. – 2003. – Vol. 53, № 3. – P. 329 – 336.
251. Vagin V. V. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline / V. V. Vagin, A. Sigova, Ch. Li, H. Hervé Seitz [et al.] // Science. - 2006. - Vol. 313, № 5785. - P. 320 - 324.
252. Vaillant I. Role of histone and DNA methylation in gene regulation / I. Vaillant, J. Paszkowski // Curr. Opin. Plant Biol. – 2007. – Vol. 10. – P. 528 – 533.
253. Venkat S. Radio-adaptive response in human lymphocytes in vitro / S. Venkat, R. C. Chaubey, P. S. Chauhan // Indian J. Exp. Biol. – 1996. – Vol. 34. – P. 909 – 912.
254. Vertino P. V. DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex / P. V. Vertino, J. A. Sekowski, J. M. Coll, N. Applegren, S. Ham, R. J. Hickey, L. H. Malkas // Cell Cycle. – 2002. – Vol. 1, № 6. – P. 416 – 423.
255. Vogelstein B. Cancer genes and the pathways they control / B. Vogelstein, K. W. Kinzler // Nat. Med. – 2004. – Vol. 10, № 8. – P. 789 – 799.

256. Von Sonntag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective / Von Sonntag C. Berlin – Heidelberg: Springer, 2006. – 465 pp.
257. Vrdoljak E. Radiation induced apoptosis of oligodendrocytes in vitro / E. Vrdoljak, C. A. Bill, L. C. Stephens, A. J. van der Kogel, K. Kian Ang, P. J. Tofilon // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1992. – Vol. 62, № 4. – P. 475 – 480.
258. Wada Y. Preferential de novo methylation of cytosine residues in non-CpG sequences by a domains rearranged DNA methyltransferase from tobacco plants / Y. Wada, H. Ohya, Y. Yamaguchi, N. Koizumi, H. Sano // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 12. – P. 3 – 12.
259. Wang B. X. Overexpression of DNA damage-induced 45 α -gene contributes to esophageal squamous cell cancer by promoter hypomethylation // B. X. Wang, B. L. Yin, B. He, Ch. Chen, M. Zhao, W. X. Zhang, Z. K. Xia, Y. Z. Pan, J. Q. Tang, X. M. Zhou, N. Yin // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 31, № 1. – P. 11.
260. Wang G. J. Induction of cell-proliferation hormesis and cell-survival adaptive response in mouse hematopoietic cells by whole-body low-dose radiation / G. J. Wang, L. Cai // *Toxicol. Sci.* – 2000. – Vol. 53. – P. 369 – 376.
261. Wang L. Methylation pattern of Activator transposase binding sites in maize endosperm / L. Wang, M. Heinlein, R. Kunze // *Plant Cell.* – 1996. – Vol. 8, № 4. – P. 747 – 758.
262. Wang X. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogenactivated protein kinase signaling pathways on cell survival / X. Wang, J. L. Martindale, Y. Liu, N. J. Holbrook // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 333, № 2. – P. 291 – 300.

263. Ward J. F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanism of formation and reparability / J. F. Ward // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* – 1988. – Vol. 35. – P. 95 – 125.
264. Warmerdam D. O. Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways / D. O. Warmerdam, R. Kanaar // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 704. – P. 2 – 11.
265. Washo-Stultz D. Increased susceptibility of cells to inducible apoptosis during growth from early to late log phase: an important caveat for in vitro apoptosis research / D. Washo-Stultz, M. Crowley, H. Bernstein // *Toxicol. Lett.* – 2000. – Vol. 116, № 3. – P. 199 – 207.
266. Weitbrech K. First off the mark: early seed germination. Darwin review / K. Weitbrech, K. Muller, G. Leubner-Metzger // *J. Exp. Bot.* – 2011. – Vol. 62. – P. 3289 – 3309.
267. Wojewodska M. Calcium antagonist, TMB-8, prevents the induction of adaptive response by hydrogen peroxide or X-rays in human lymphocytes / M. Wojewodska, M. Waliska, B. Sochanowicz, I. Szumiel // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1994. – Vol. 66, № 1. – P. 99 – 109.
268. Wolfe A. P. Nuclear visions: functional flexibility from structural instability / A. P. Wolfe, J. C. Hansen // *Cell.* – 2001. – Vol. 104. – P. 631 – 634.
269. Wolff S. The adaptive response of human lymphocytes to very low dose ionizing radiation: a case of induced chromosomal repair with the induction of specific proteins / S. Wolff, V. Afzal, J. K. Wienecke [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* – 1988. – Vol. 53, № 1. – P. 39 – 47.
270. Wolff S. Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents / S. Wolff // *Mutat. Res.* – 1996. – Vol. 358, № 2. – P. 135 – 142.

271. Wood R. D. DNA repair in eukaryotes / R. D. Wood // *Annu. Rev. Biochem.* – 1996. – Vol. 65. – P. 135 – 167.
272. Wouters B. G. Low-dose hypersensitivity and increased radioresistance in a panel of human tumor cell lines with different radiosensitivity / B. G. Wouters, A. M. Sy, L. D. Skarsgared // *Radiat. Res.* – 1996. – Vol. 146. – P. 399 – 413.
273. Wu P. Mismatch repair in methylated DNA. Structure and activity of the mismatch-specific thymidine glycosylase domain of methyl-CpG-binding protein MBD4 / P. Wu, C. Qui, A. Sohail, X. Zhang, A. S. Bhagwat, X. Cheng // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 7. – P. 5285 – 5291.
274. Yacoub A. The DNA repair activity of human redox / repair protein APE / Ref-1 is inactivated by phosphorylation / A. Yacoub, M. R. Kelley, W. A. Deutsch // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – P. 5457 – 5459.
275. Yan Q. A modulator of CpG methylation, is critical for normal histone methylation / Q. Yan, J. Huang, H. Zhu, K. A. Muegge // *The EMBO J.* – 2003. – Vol. 22. – P. 5154 – 5162.
276. Yao Y. UV-C-Irradiated Arabidopsis and Tobacco Emit Volatiles That Trigger Genomic Instability in Neighboring Plants / Y. Yao, C. H. Danna, F. J. Zemp, V. Titov, O. N. Ciftci, R. Przybylski, F. M. Ausubel, I. Kovalchuk // *Plant Cell.* – 2011. – Vol. 23, № 10. – P. 3842 – 3852.
277. Yi C. Does epigenetic polymorphism contribute to phenotypic variances in *Jatropha curcas* L.? / C. Yi, S. Zhang, X. Liu // *BMC Plant Biol.* - 2010. - Vol. 10. - P. 1 - 14.
278. Zakharenko L. P. Cause for maintaining high instability at the yellow gene in *Drosophila melanogaster* lines, isolated during the "mode for mutation" period in Uman populations / L. P. Zakharenko, I. K. Zakharov,

- M. A. Voloshina, O. M. Romanova, A. A. Alekseenko, P. G. Georgiev // Genetika. – 2004. – Vol. 40, № 3. – P. 316 – 321.
279. Zemach A. DDM1 binds Arabidopsis methyl-CpG binding domain proteins and affects their subnuclear localization / A. Zemach, Y. Li, B. Wayburg, H. Ben-Meir, V. Kiss, Y. Avivi, V. Kalchenko, S. E. Jacobsen, G. Grafi // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17, № 5. – P. 1549 – 1558.
280. Zemach A. Different domains control the localization and mobility of LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 in Arabidopsis nuclei / A. Zemach, Y. Li, H. Ben-Meir, M. Oliva, A. Mosquna, V. Kiss, Y. Avivi, N. Ohad, G. Grafi // Plant Cell. – 2006. – Vol. 18, № 1. – P. 133 – 145.
281. Zhong L. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum* / L. Zhong, Y. Xu, J. Wang // Afr. J. Biotech. - 2009. - Vol. 8, № 22. - P. 6201 - 6207.
282. Zilberman D. The evolving functions of DNA methylation / D. Zilberman // Curr. Opin. Plant Biol. – 2008. – Vol. 11. – P. 554 – 559.
283. Абрамов В. И. Генетические последствия радиоактивного загрязнения популяций *Arabidopsis thaliana*, произрастающих в 30-километровой зоне аварии на ЧАЭС / В. И. Абрамов, С. В. Динева, А. В. Рубанович, В. А. Шевченко // Радиационная биология. Радиозэкология. – 1995. – Т. 35, № 6. – С. 676 – 689.
284. Аклеев А. В. Реакция тканей на хроническое воздействие ионизирующего излучения / А. В. Аклеев // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2009. – Т. 49, № 1. – С. 5 – 20.
285. Банников Ю. А. Радиация. Дозы. Эффекты. Риск [пер. с англ.] / Ю. А. Банников. — М.: Мир, 1990. – 79с.
286. Безрукова Г. А. Влияние «малых доз» внешнего хронического облучения на состояние липидного обмена и риск развития атеросклероза у работников атомных станций / Г. А. Безрукова, Л. Д.

- Громова, В. Ф. Спирин // Фундаментальные исследования. – 2006. - № 9. – С. 27 – 33.
287. Бондарчук И.А. Гипотеза о механизме индукции адаптивного ответа при облучении клеток млекопитающих в малых дозах / И. А. Бондарчук // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 1. – С. 36 – 43.
288. Бондарчук И. А. Анализ роли клеточной репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза в радиационно-индуцированном адаптивном ответе клеток млекопитающих / И. А. Бондарчук // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43, № 1. – С. 19 – 28.
289. Бурлакова Е. Б. Новые аспекты закономерностей действия низкоинтенсивного облучения в малых дозах / Е. Б. Бурлакова, А. Н. Голощапов, Г. П. Жижина, А. А. Конрадов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, № 1. – С. 26 – 34.
290. Бурлакова Е. Б. Окислительно-восстановительный гомеостаз при радиационно-индуцированной нестабильности генома / Е. Б. Бурлакова, В. М. Михайлов, В. К. Мазурик // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46, № 4. – С. 441 – 446.
291. Бурлакова Е. Б. К 25-летию с момента аварии на Чернобыльской АЭС / Е. Б. Бурлакова, В. И. Найдич // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 4. – С. 389 – 398.
292. Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК высших растений и клеточная дифференцировка / Геном растений / Б. Ф. Ванюшин, М. Д. Кирнос / Под ред. Сытника К. М. – Киев: Наук. думка, 1988. – С. 105 – 130.
293. Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика / Б. Ф. Ванюшин // Генетика. – 2006. – Т. 42, №9. – С. 1186 – 1199.
294. Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК у растений. Механизмы и биологическая роль / Б. Ф. Ванюшин – М.: Наука, 2009. – 77 с.
295. Васильева С. В. ДНК-репарационный SOS-ответ и генетическая нестабильность клеток в условиях гипоксии / С. В. Васильева, Д. А.

- Стрельцова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 3. – С. 321 – 327.
296. Вартанян Л. С. Системный ответ антиоксидантных ферментов на окислительный стресс, вызванный облучением в малых дозах / Л. С. Вартанян, С. М. Гуревич, А. И. Козаченко [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т. 40, № 1. – С. 412 – 120.
297. Власова Т. И. Цитозинная ДНК-метилтрансфераза из проростков пшеницы Т. И. Власова, М. Д. Кирнос, Б. Ф. Ванюшин // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 6. – С. 1078 – 1087.
298. Воробцова И. Е. Исследование радиационно-индуцированного "эффекта свидетеля" на модели адаптивного ответа в совместной культуре лимфоцитов людей разного пола / И. Е. Воробцова, И. С. Колесникова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 6. – С. 645 – 649.
299. Газиев А.И. Повреждение ДНК в клетках под действием ионизирующей радиации / А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, № 6. – С. 630 – 638.
300. Газиев А. И. Низкая эффективность репарации критических повреждений ДНК, вызываемых малыми дозами радиации / А. И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 5. – С. 512 – 529.
301. Гвоздѣв В. А. Мобильные гены и явление РНК-интерференции / В. А. Гвоздев // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 2. – С. 151 – 156.
302. Гераськин С. А. Анализ цитогенетических последствий хронического облучения в малых дозах посевов сельскохозяйственных культур / С. А. Гераськин, В. Г. Дикарев, А. А. Удалова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1998. – Т. 38, № 3. – С. 367 – 374.
303. Гераськин С. А. Биологические эффекты у растений и животных, обитающих на севере России, в районах с повышенным уровнем естественной радиоактивности / С. А. Гераськин, Т. И. Евсеева, Ф. И.

- Таскаев [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 1. – С. 34 – 53.
304. Гильяно Н. Я. Характеристика адаптивного ответа к действию γ -лучей, индуцированного малыми дозами ^{14}C в фибробластах китайского хомячка / Н. Я. Гильяно, О. И. Большакова, Г. А. Лаврова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1998. – Т. 38, № 5. – С. 663 – 671.
305. Гольдшмидт Б. Я. Морфологические и ультразвуковые изменения легких крыс / Б. Я. Гольдшмидт, А. П. Никитченко, Л. И. Андрущак // Радиобиология – 1991. – Т. 31, №5. – С. 436 – 443.
306. Гончарова Р. И. Генетическая эффективность малых доз ионизирующей радиации при хроническом облучении мелких млекопитающих / Р. И. Гончарова, И. И. Смолич // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, №6. – С. 654 – 660.
307. Григорьев Ю. Г. Зависимость биологической эффективности протяженных и хронических лучевых воздействий от мощности дозы для различных видов животных и человека / Ю. Г. Григорьев, В. Г. Горлов, А. В. Шафиркин // Радиобиология. – 1978. – Т. 19, № 2. – С. 261 – 269.
308. Гродзинский Д. Радиобиология растений / Гродзинский Д. – Киев: Наукова думка, 1989 – 379 с.
309. Гродзинский Д. Защита растений от лучевого поражения / Гродзинский Д., Гудков И. – Москва: Атомиздат, 1973 – 231с.
310. Гудков И. Противолучевая защита и пострadiационное восстановление растений / Гудков И. – Киев: Наукова думка, 1972 – 107с.

311. Гудков И. Н. Кинетика размножения клеток в растущей части корней проростков гороха при γ -облучении / И. Н. Гудков, Д. М. Гродзинский // Радиобиология. – 1972. – Т. 12, № 4. – С. 566.
312. Гудков И. Н. Метод автордиографии в изучении кинетики клеточных циклов меристем высших растений при гамма-облучении / И. Н. Гудков, Д. М. Гродзинский, С. А. Групина // Физиол. и биохим. культурн. раст. – 1971. – Т. 3, № 2. – С. 115.
313. Гудков И. Клеточные механизмы пострadiaционного восстановления растений / Гудков И. – Киев: Наукова думка, 1985 – 223 с.
314. Дубровная О. В. Геномная изменчивость морфогенного и неморфогенного каллуса кормовой свеклы / О. В. Дубровная, Е. Н. Тищенко // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 35, № 5. – С. 434 – 440.
315. Жимулёв И. Ф. Гетерохроматин, эффект положения и генетический сайленсинг / И. Ф. Жимулев, Е. С. Беяева // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 2. – С. 187 – 237.
316. Заичкина С. И. Зависимость величины цитогенетического адаптивного ответа в клетках костного мозга крыс от дозы хронического облучения / С. И. Заичкина, Д. Ю. Клопова, О. М. Розанова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, № 4. – С. 404 – 405.
317. Зайнуллин В. Г. Генетические аспекты облучения в малых дозах лабораторных линий и экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* / В. Г. Зайнуллин, А. А. Москалев, М. В. Шапошников, Е. А. Юшкова, А. И. Таскаев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46, № 5. – С. 547 – 554.

318. Зайцев В. А. О функциональном состоянии гипоталамо-гипофизарно-кортико-адреналовой системы адаптации детей Беларуси, живущих в условиях действия малых доз радиации после аварии на ЧАЭС / В. А. Зайцев, С. В. Балаклеевская, С. В. Петренко // Радиобиология. – 1992. – Т. 32, №4. – С. 483 – 487.
319. Иванов В. Б. Клеточные основы роста растений / Иванов В. Б. – Москва: Наука, 1974. – 223 с.
320. Коломийцева И. К. Немонотонность зависимости доза – эффект в области малых доз ионизирующей радиации / И. К. Коломийцева // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2003. – Т. 43, № 2. – С. 179 – 181.
321. Конрадов А. А. Изменение радиочувствительности животных после экспозиции в зоне аварии на ЧАЭС / А. А. Конрадов, Н. В. Любимова, И. И. Пелевина // Радиационная биология. Радиационная экология. – 1993. – Т. 33, № 4. – С. 483 – 487.
322. Корогодин В. И. Влияние мощности дозы гамма-облучения на митоз и адаптивный ответ клеток первичных корней проростков гороха / В. И. Корогодин, В. Л. Корогодина, И. Ганичева, Г. Лазарева, Л. А. Мельникова, А. Пантелеева // Радиационная биология. Радиационная экология. – 1998. – Т. 38, № 5. – С. 643 – 649.
323. Котеров А. Н. Радиоадаптивный ответ *in vitro* нестимулированных лимфоцитов крыс по металлотионеиновому тесту / А. Н. Котеров, И. В. Филиппович // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2002. – Т. 42, № 2. – С. 130 – 145.
324. Кравец А. П. Динамика выхода цитогенетических аномалий в меристеме проростков при хроническом облучении семян / А. П. Кравец, Г. Д. Гатилова, Д. М. Гродзинский // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2008. – Т. 48, № 3. – С. 208 – 219.

325. Кравец А. П. Изменения профиля метилирования ДНК под влиянием хронического γ – облучения семян пшеницы / А. П. Кравец, Т. А. Мюссе, А. В. Литвинчук [и др.] // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, № 5. – С. 18 – 22.
326. Кравец А. П. Влияние фракционированного УФ-С облучения на изменение профиля метилирования функционально различных последовательностей ДНК и выход нестабильных хромосомных aberrаций у проростков кукурузы / А. П. Кравец, Д. А. Соколова, Г. С. Венгжен, Д. М. Гродзинский // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53, №6. – С. 583 – 591.
327. Куликов Н. В. Изменение радиочувствительности растений в результате предварительного лучевого воздействия / Н. В. Куликов, Л. К. Альшиц, А. А. Позолотин, С. В. Гарчевская // Радиобиология. - 1974. - Т. 11, № 4. - С. 630 - 633.
328. Лекавичус Э. Элементы общей теории адаптации / Лекавичус Э. – Вильнюс: Мокслас, 1986 – 272 с.
329. Лысенко Е. А. Влияние хронического облучения на генетическую структуру природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) / Е. А. Лысенко, В. И. Абрамов, В. А. Шевченко // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 9. – С. 1241 – 1250.
330. Лакин А. В. Биометрия / А. В. Лакин // Москва: Высшая школа, 1990. - 352 с.
331. Мазин А. Л. О возможности происхождения и эволюции энзиматического метилирования генома эукариот. Метилирование цитозиновых остатков ДНК в трех семействах палиндромов RYRY, YYRR, YYRYRR / А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин // Молекулярная биология. – 1990. – Т. 24, № 1. – С. 23 – 44.

332. Мазурик К. В. Взаимосвязь содержания активных форм кислорода и состояния структуры ДНК в клетках костного мозга у мышей в динамике после общего воздействия гамма-облучения / К. В. Мазурик, В. Ф. Михайлов, Л. Н. Ушенкова, Н. Ф. Раева // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43, № 6. – С. 625 – 632.
333. Маковецкая Л. И., Ганжа О. Б., Гриневич Ю. П., Родионова Н. К., Рябушко В. И. Модификация окислительного метаболизма биологически активным препаратом РАПАМИД у мышей с различной радиочувствительностью / Л. И. Маковецкая, Н. А. Дружина // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 10, № 3. – С. 306 – 309.
334. Медведев С. С. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов / С. С. Медведев, Е. И. Шарова. // J. Siberian Federal Univ. – 2010. – Biology. – Vol. 2, № 3. – P. 109 – 129.
335. Мельнов С. Б. Молекулярно-генетический статус детей и подростков, проживающих в условиях хронического низкодозового воздействия / С. Б. Мельнов, Т. В. Лебедева // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. – Т. 44, № 6. – С. 627 – 631.
336. Мирзоев Э. Б. Оценка перекисного окисления липидов и проницаемости плазматической мембраны для Ca^{2+} в эритроцитах крови крупного рогатого скота при длительном нахождении на радиоактивно-загрязненных территориях / Э. Б. Мирзоев, В. О. Кобялко, Т. С. Шевченко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, № 6. – С. 609 – 613.
337. Михайлов В. Ф. Сигнальная функция активных форм кислорода в регуляторных сетях ответа клеток на повреждающие воздействия: участие в реализации радиочувствительности и нестабильности генома / В. Ф. Михайлов, В. К. Мазурик, Е. Б. Бурлакова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43, № 1. – С. 5 – 18.

338. Моргун В. В. Гібриди кукурудзи. Національна академія наук України. Інститут фізіології рослин і генетики / В. В. Моргун, К. А. Ларченко, В. М. Гаврилюк, В. О. Хроменко. – Київ: Логос, 2006. – 25с.
339. Моргун В. В. Резерви кукурудзяного поля (гібриди кукурудзи). Національна академія наук України. Інститут фізіології рослин і генетики / К. А. Ларченко, В. М. Гаврилюк, В. О. Хроменко. – Київ: Логос, 2008. – 27с.
340. Назаренко С. А. Однородительские дисомии и болезни геномного импринтинга / С. А. Назаренко, Е. А. Саженова. – Томск: Печатная мануфактура, 2004. – 37 с.
341. Осипов А. Н. Индукция и репарация двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови человека, облученных в адаптирующей дозе / А. Н. Осипов, Е. Ю. Лизунова, Н. Ю. Воробьева, И. И. Пелевина // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 1. – С. 42 – 45.
342. Пелевина И. И. Итоги экспериментальных исследований в 10-километровой зоне аварии на ЧАЭС / И. И. Пелевина, И. Н. Рябов, И. А. Рябцев [и др.] // Радиобиология. – 1991. – Т. 31, № 4. – С. 467 – 481.
343. Пелевина И. И. Нестабильность генома после воздействия радиации в малых дозах (в 10-километровой зоне аварии на ЧАЭС и в лабораторных условиях) / И. И. Пелевина, В. Я. Готлиб, И. Н. Кудряшова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1996. – Т. 36, № 4. – С. 546 – 561.
344. Пелевина И. И. Адаптивный ответ в разных митотических циклах после облучения / И. И. Пелевина, В. А. Алещенко, М. М. Антощина, О. В. Боева, В. Я. Готлиб, О. В. Кудряшова, Е. Ю. Лизунова, А. Н. Осипов, Н. И. Рябченко, Л. П. Семенова, А. М. Серебряный // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 1. – С. 78 – 83.

345. Петрович Ю. А. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса / Ю. А. Петрович, Д. В. Гуткин // Патол. Физиол. Экспер. Терапия. – 1986. - № 5. – С. 85 – 92.
346. Рябоконь Н. И. Биологические эффекты в природных популяциях мелких грызунов на территориях, загрязненных радионуклидами / Н. И. Рябоконь // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, № 6. – С. 613 – 618.
347. Савельев С. В. Рибосомные РНК гексаплоидной пшеницы: характер метилирования и временная организация репликации в развивающихся проростках / С. В. Савельев, В. В. Ашапкин, Б. Ф. Ванюшин // Молекулярная биология. – 1990. – Т. 24, № 4. – С. 1042 – 1055.
348. Санкаранян К. Оценка генетического риска воздействия ионизирующей радиации: состояние проблемы в 2000 году / К. Санкаранян // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т. 40, № 5. – С. 620 – 626.
349. Севаньяев А. В. Результаты цитогенетических обследований детей и подростков, проживающих в загрязненных радионуклидами районах Калужской области / А. В. Севаньяев, О. И. Потентя, П. Н. Жлова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т. 35, №5. – С. 581 – 587.
350. Севаньяев А. В. Некоторые итоги цитогенетических исследований в связи с оценкой последствий Чернобыльской аварии / А. В. Севаньяев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т. 40, № 5. – С. 589 – 595.
351. Севаньяев А. В. Сравнительный анализ генных и структурных соматических мутаций у жителей загрязненных радионуклидами районов орловской области после аварии на ЧАЭС / А. В. Севаньяев,

- И. А. Замуляева, Г. Ф. Михайлова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2006. – Т. 46, № 3. – С. 315 – 321.
352. Серебряный А. М. Радиационный адаптивный ответ как стресс-реакция клетки / А. М. Серебряный // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 4. – С. 399 – 404.
353. Серкиз Я. И. Продолжительность жизни и канцерогенные эффекты / Я. И. Серкиз, Л. Б. Пинчук, Н. К. Родионова // Радиобиология. – 1991. – Т. 31, №5. – С. 216 – 224.
354. Соколова Д. А. Роль эпигенетического полиморфизма проростков кукурузы в реакциях на УФ-С облучение / Д. А. Соколова, Г. С. Венгжен, А. П. Кравец // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46, № 3. – С. 221 – 229.
355. Спитковский Д. М. Особенности внепланового синтеза ДНК и изменений структурных параметров ядер лимфоцитов человека после действия рентгеновского излучения в малых дозах и в сочетании с УФ-облучением / Д. М. Спитковский, А. В. Ермаков, А. И. Горин [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1994. – Т. 34, № 1. – С. 23 – 30.
356. Талызина Т. А. Структурные изменения ядер лимфоцитов человека при действии ионизирующих излучений в диапазоне доз, вызывающих адаптивный ответ / Т. А. Талызина, Д. М. Спитковский // Радиобиология. – 1991. – Т. 31, № 4. – С. 606 – 611.
357. Тверской Л. А. Исследование биологического эффекта хронического действия радиации с низкой мощностью доз на фитопатогенные грибы / Л. А. Тверской, Д. М. Гродзинский, Л. В. Кейсевич // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1997. – Т. 37, № 5. – С. 797 – 803.

358. Тищенко Е. Н. Метилирование ДНК и экспрессия генома проростков подсолнечника / Е. Н. Тищенко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. - № 2. – С. 133 – 139.
359. Тищенко Е. Н. Вариабельность метилирования ДНК в морфогенезе сахарной свеклы / Е. Н. Тищенко, Н. Н. Топчий // Укр. біохім. журнал. – 2001. – Т. 73, № 2. – С. 91 – 96.
360. Тищенко О. М. Метилування ДНК в онтогенезі рослин / О. М. Тищенко, О. В. Дубровна, Н. М. Топчій. – К.: Логос, 2008. – 264 с.
361. Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К. Т. Турпаев // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 3. – С. 339 – 352.
362. Фролова Н. П. Мониторинг семян хронически облучающихся природных популяций *Plantago lanceolata* L. Жизнеспособность семян / Н. П. Фролова, О. Н. Попова, А. И. Таскаев // Радиобиология. – 1990. – Т. 30, № 3. – С. 296 – 301.
363. Хочачка П. Биохимическая адаптация / Хочачка П., Сомеро Дж. [пер. с англ.] – М.: Мир, 1988. – 568с.
364. Чураев Р. Н. Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе / Р. Н. Чураев // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 9. – С. 1276 – 1296.