

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

**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

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м. Київ)

**Науковий керівник** - доктор біологічних наук

**Кравець Олександра Петрівна**

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії  
НАН України, провідний науковий співробітник

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор, академік  
НААН України

**Гудков Ігор Миколайович**

Національний університет біоресурсів і  
природокористування України,  
завідувач кафедри радіобіології та радіоекології

доктор біологічних наук

**Тищенко Олена Миколаївна**

Інститут фізіології рослин та генетики НАН  
України, завідувач відділом генетичної інженерії

Захист відбудеться 22 жовтня 2015 р. об 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143, Україна.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143.

Автореферат розіслано «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

К.В. Листван

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 (Корогодін, 1957), рослинних (Куліков та ін., 1971), тваринних об'єктів (Bradford, 1976) та бактерій (Samson, Cairns, 1977), у вивченні даного феномену створилось декілька напрямків, які включають дослідження доз і режимів опромінення (Бурлакова, 1999; Гродзинський, Міхєєв, 2001; Бондарчук, 2002), ролі репаративних процесів у становленні радіоадаптації (Газієв, 1999, 2011; Бондарчук, 2003; Пелевіна, 2009; Серебряний, 2011), участі систем антиоксидантного захисту клітини та неспецифічних перебудов метаболізму (Мазурик, 2003; Coleman, 2005; Fachin, 2007; Кравець, Гродзинський, 2008; Versak et al., 2011). 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 (Robertson et al., 2000; Mimutinovic et al., 2003; Тищенко, Дубровна, 2005; Agorio, Vera, 2007; Hauser, 2011; Billichak et al., 2012) та участь певних груп білків у нуклеосомній організації хроматину та його ремоделюванні (Olins, 1974; Dekker, 2008; Тейф та ін., 2011; Kalhork et al., 2012; Dekker et al., 2013; Jin et al., 2013), 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 (Kovalchuk et al., 2003, 2004, 2005; Кравець та ін., 2010; Antwith et al., 2013; Lee et al., 2015). Дослідження ролі метилування ДНК в радіобіологічних реакціях обмежено виявленням лише основних тенденцій: гостре іонізуюче опромінення викликає деметилування ДНК, хронічне обумовлює гіперметилування, яке розглядається як адаптивна реакція (Kovalchuk et al., 2005; Kim et al., 2008). 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 послідовностей ДНК, які транскрибуються, та сателітних, що може обумовлювати різні механізми адаптації. По друге, суттєвим є питання про динамічний зв'язок змін метилування ДНК, тобто переключення

цього процесу від підтримуючого до метилування *de novo*, 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.

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

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася в межах бюджетних тем відділу біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України «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 та перебудовами профілей метилування після опромінення.

6. Дослідити щільність статистичного зв'язку між змінами профілів метилування ДНК та радіорезистентності рослин за частотою 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 із змінами радіочутливості та радіостійкості за частотою хромосомних аберацій.

**Методи дослідження:** біометричні (визначення швидкості проростання насіння), фізіологічні і радіометричні (дослідження радіобіологічних характеристик гібридів кукурудзи), цитогенетичні (оцінка мітотичного індексу та частоти хромосомних аберацій), молекулярно-біологічні (виділення ДНК, рестрикційний аналіз з подальшою полімеразною ланцюговою реакцією для дослідження профілів метилування), стандартні методи статистичного аналізу, включаючи розрахунки лінійної кореляції Браве - Пірсона та рангової кореляції Спірмена.

**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 вихідним станом метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків.

**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

напрямах 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 та 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 найменувань, з яких 282 англomовних).

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ**

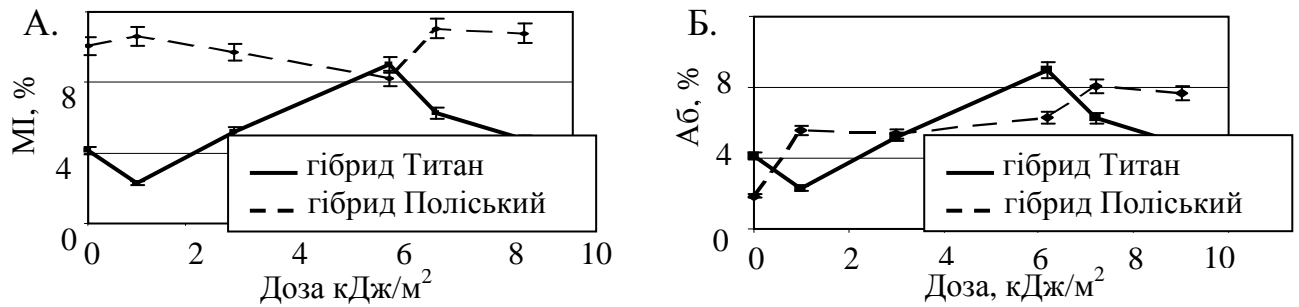
В огляді літературних джерел проведено аналіз наукових праць вітчизняних та зарубіжних авторів стосовно дослідження явища радіоадаптації. Розглянуто сучасні відомості щодо механізмів епігенетичної регуляції, включаючи роль ензиматичного метилування ДНК. Сформульовано основні напрямки дослідження для виконання дисертаційної роботи.

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

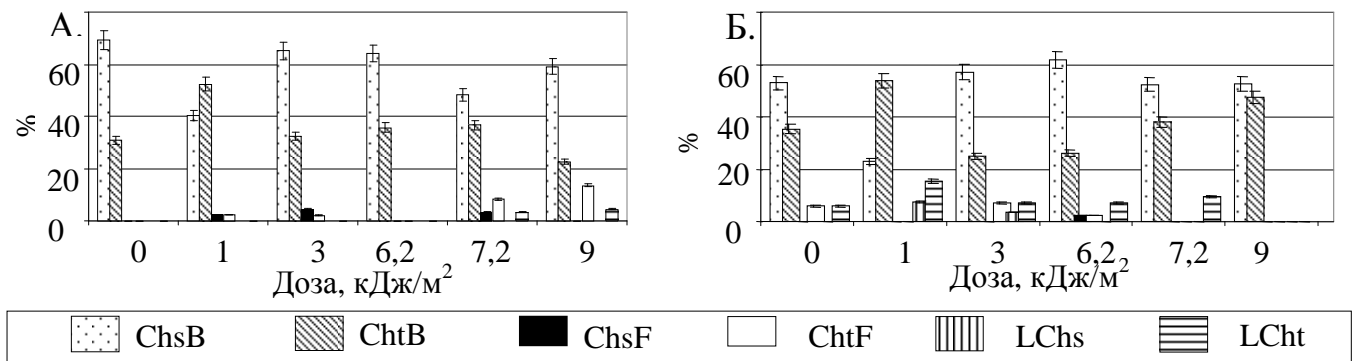
Вихідним матеріалом для досліджень слугували 2 гібриди кукурудзи *Zea mays* L. – Поліський 177 МВ і Титан 220 СВ, оригінаторами яких є Інститут фізіології

рослин і генетики НАН України та Черкаський інститут агропромислового виробництва УААН.

**Попередні оцінки радіобіологічних характеристик гібридів**, що дали можливість визначити діапазон доз (рис. 1, А-Б) для подальшої роботи, було проведено за двома параметрами: частотою цитогенетичних аномалій (Аб, %) в меристемі коренів, їх спектром (хромосомні, хроматидні аберації та їх види), та мітотичним індексом (МІ, %) залежно від дози опромінення.



**Рис.1.** Вплив УФ-С опромінення на мітотичний індекс (МІ, % - А) та частоту цитогенетичних аномалій (Аб, % - Б) у гібридів кукурудзи Поліський 177 МВ і Титан 220 СВ.



**Рис. 2.** Співвідношення цитогенетичних аномалій за різних доз опромінення для гібридів Поліський 177 МВ (А) і Титан 220 СВ (Б). Де: ChsB – хромосомні мости; ChtB – хроматидні мости; ChsF – хромосомні фрагменти; ChtF – хроматидні фрагменти; LChs – хромосоми, що відстають; LCht – хроматиди, що відстають.

В якості пошкоджуючих доз використовували гостре УФ-С-опромінення 3-добових проростків кукурудзи з використанням опромінювача бактерицидного ОБН-150М (Україна) з лампами Philips Special TUV 30 W, потужність дози - 6,25 Вт/м<sup>2</sup>, довжина хвилі УФ-С – 253 нм. Використані дози: 1, 3, 6,2, 7,2 та 9 кДж/м<sup>2</sup>.

Для обох гібридів найбільш поширеними аномаліями є хромосомні та хроматидні мости і фрагменти (рис. 2, А-Б); аналогічний спектр аберацій виявлено і при дії хронічного гамма-опромінення (Кравец et. al., 2008).

**Лабораторні дослідження** було проведено на насінні і 3 - 7-добових проростках двох гібридів кукурудзи: Поліський 177 МВ і Титан 220 СВ. Насіння пророщували на піддонах зі зволеним фільтрувальним папером, в термостаті за температури +22 - +24<sup>0</sup>С. Проростки висаджували на решітки, які розташовували на ємкостях, заповнених відстояною водою; при проведенні опромінення проростки переносили на ємність без води. Повторюваність кожного експерименту – семи-восьмикратна.

**Режими опромінення:** гостре фракціоноване УФ-С-опромінення проростків з різними часовими інтервалами; гостре УФ-С-опромінення в режимі «адаптивна – ударна доза» з різними часовими інтервалами; хронічне гамма-опромінення насіння; комбіноване опромінення: УФ-С-опромінення проростків, що походило з попередньо гамма-опроміненого сухого насіння. Джерело хронічного гамма-опромінення насіння - скляна ємність з розчином <sup>137</sup>CsCl, потужність дози - 12,9 мкА/кг.

**Цитогенетичні дослідження** проводили на апікальній меристемі кореня. Після відокремлення апекси занурювали в фіксатор Бродського (оцтова кислота : етиловий спирт : формалін = 0,3 : 1 : 3) на дві години і промивали 70% етиловим спиртом (3-4 рази). Мацерацію проводили за допомогою лужного гідролізу 20% NaOH протягом 2 годин; відмивали препарати дистильованою водою 15 хв. Для фарбування застосовували суміш ацетоорсеїну та соляної кислоти (ацетоорсеїн : 1 М HCl = 1 : 1) протягом 16 – 18 годин. Пофарбований матеріал промивали 45%-ою CH<sub>3</sub>COOH, а потім готували давлені препарати. Використовували по 10 паралельних проб та аналізували по 5 – 10 тис. клітин. 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 Diatom<sup>TM</sup> DNA Prep100 на базі NucleoS-сорбенту. Вимірювання концентрації отриманого розчину ДНК проводили на спектрофотометрі BioPhotometer Plus Eppendorf v.1.35 з використанням стандартної методики (Ausubel et al., 2004).

Рестрикційний аналіз проводили в чотириканальному ДНК-ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», Москва) з рестриктазами MspI, HpaII та MboI (фірма Fermentas, Німеччина) за стандартним протоколом фірми – постачальника. ПЛР, як і реакцію рестрикції, проводили в чотирьохканальному ДНК-ампліфікаторі «Терцик» з праймерами до мінісателітних послідовностей ISSR і тих, що транскрибуються - ITS1 та ITS4, використовуючи набір реагентів GenPak<sup>®</sup> PCR Core і протокол фірми-постачальника (Tikunov et al., 2003; Bartlett et al., 2003). Отримані продукти ПЛР та рестрикційного аналізу розділяли в 1,0% агарозному гелі з ТБЕ-буфером в присутності бромистого етидію і візуалізували на UV-транслюмінаторі. 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 (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.** Обробку отриманих даних, обчислення лінійної кореляції Браує-Пірсона та рангової кореляції Спірмена виконували згідно традиційних методів статистичного аналізу (Лакін, 1990) з використанням електронних таблиць Office Excel.

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

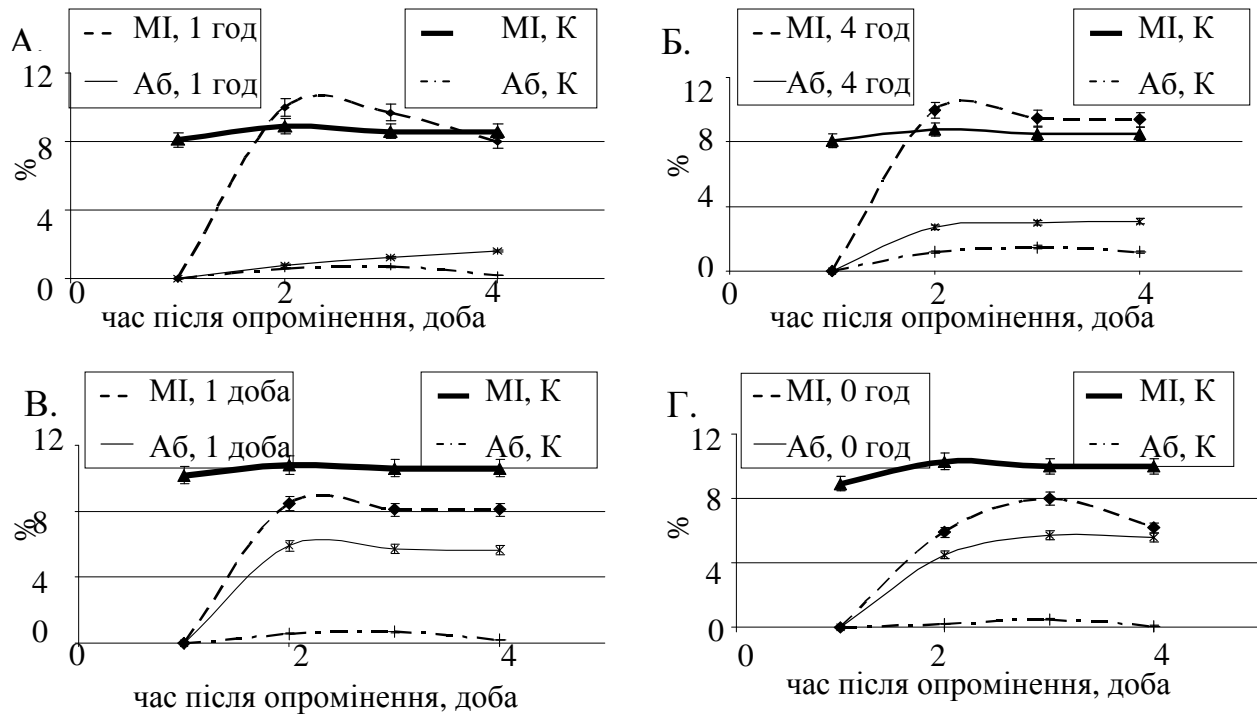
Організм притаманна ієрархічна система захисних реакцій, кожна з яких має свій час розвитку. Наприклад, відомо, що репарація одониткових розривів здійснюється за 0,2-4 години, двониткових – за 0,2-24 години (Kreuzer et. al., 1995; Le S. Moore et. al., 1999; Chung et. al., 2010; Yang et. al., 2013), швидкість відновлення клітинного поділу після опромінення займає від 3 до 7 діб (Гродзинський, Гудков 1973; Гудков 1985; Гродзинський, 2000). Тому запропонована схема експерименту поєднує різні часові інтервали між фракціями опромінення (1, 2, 4, 24 години) з подальшим дослідженням профілів метилування ДНК і динаміки цитогенетичних показників протягом декількох діб і направлена на з'ясування 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.

Згідно отриманих результатів, при фракціонованому опроміненні у повній дозі від 6,2 до 9 кДж/м<sup>2</sup> для всіх інтервалів між фракціями через добу спостерігається різке зниження відсотку мітотичних клітин, що свідчить про зупинку клітинного циклу у «точках перевірки» (checkpoints). На другу - третю добу після опромінення затримка змінюється значним зростанням цих показників («хвилею мітозів») (рис. 3) з наступним зниженням і поверненням до рівня, близького до стаціонарного на 4 добу, значення якого визначається інтервалами між фракціями і дозою опромінення (рис. 4).

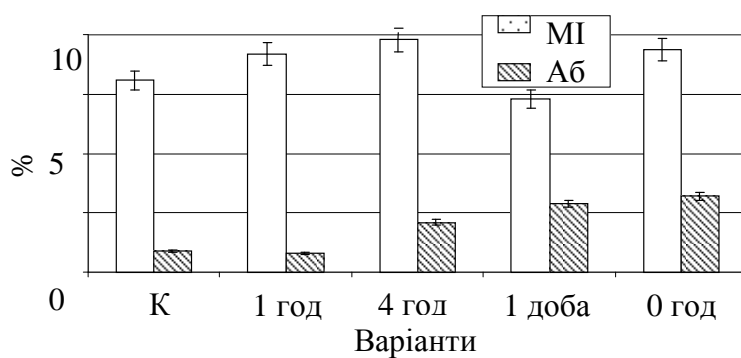
Відповідно зростанню частки клітин, що перебувають у фазі мітозу, спостерігаються і зміни частоти хромосомних аберацій. За цим критерієм (рис. 4.) відсутнє монотонне зростання відносної радіорезистентності залежно від часу між фракціями, що можна очікувати при підвищенні ефективності репарації чи антиоксидантних процесів. Разом з тим має місце прямопропорційна залежність між мітотичним індексом і частотою хромосомних аберацій за умов одно - та чотиригодинних інтервалів між фракціями і відсутність цієї залежності при інтервалі 24 години.

Співставлення цих особливостей динаміки мітотичного індексу і частоти хромосомних аберацій та її залежності від інтервалу між фракціями опромінення

дозволяє припустити, що в пострадіаційний період можуть реалізовуватися різні механізми відновлення меристематичної тканини.



**Рис. 3.** Динаміка цитогенетичних показників при фракціюванні УФ-С-опромінення в дозі  $7,2 \text{ кДж/м}^2$ . А – інтервал між фракціями 1 година, Б – інтервал між фракціями 4 години, В – інтервал між фракціями 1 доба, Г – інтервал між фракціями 0 годин.



**Рис.4.** Вплив тривалості міжфракційного інтервалу на мітотичний індекс (MI,%) та частоту хромосомних аберацій (Аб,%) на 4 добу після фракціонованого УФ-С-опромінення в сумарній дозі  $7,2 \text{ кДж/м}^2$ .

Зростання відсотку мітотичних клітин може бути пов'язане як з «передчасним» виходом клітин з фаз перевірки, так і з переходом до поділу так званих клітин спокою або з об'єднанням обох цих процесів. Разом з тим тільки за умов «передчасного», тобто з незавершеною чи помилковою репарацією ушкоджень ДНК, виходу клітин з фаз перевірки буде спостерігатись

прямопропорційна залежність між підвищенням мітотичного індексу і частотою хромосомних аберацій.

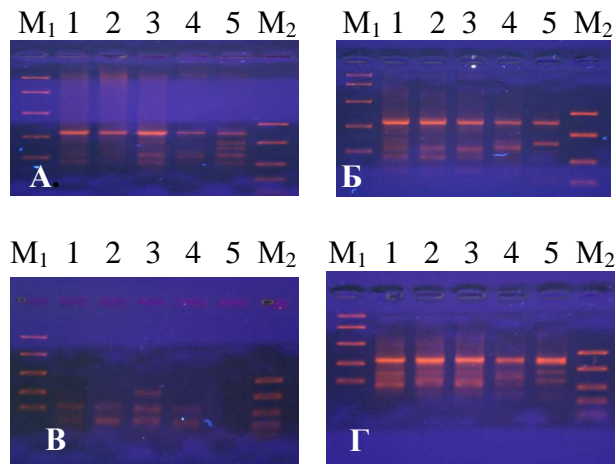
Для кількісної перевірки зв'язку між цими двома цитогенетичними показниками, було проведено оцінку коефіцієнта лінійної кореляції Браує-Пірсона. Ці оцінки свідчать, що при фракціюванні дози 7,2 кДж/м<sup>2</sup> та інтервалі між фракціями 1 год має місце високе значення коефіцієнта лінійної кореляції ( $R=0,79$ ) між мітотичним індексом та частотою хромосомних аберацій при рівні значущості  $\alpha=1\%$ . При інтервалі між послідовними фракціями, що дорівнює 4 години, значення коефіцієнта лінійної кореляції та рівня значущості знижуються ( $R=0,67$ ,  $\alpha=5\%$ ). При інтервалі, що дорівнює 1 добі, відбувається подальше зниження коефіцієнта лінійної кореляції:  $R=0,39$  при  $\alpha=5\%$ . Це вказує на перехід до активної проліферації клітин спокою, а зростання чутливості за частотою хромосомних аберацій може свідчити про вплив другої фракції (через 1 добу) на групу клітин, що синхронно перейшли до активного поділу зі стану спокою. Якщо одночасне проходження всіма резервними клітинами радіочутливих фаз циклу співпадає з моментом повторного опромінення, це може зумовлювати те, що адаптивний ефект найменш виражений саме при цьому інтервалі між фракціями.

При опроміненні у дозі 9 кДж/м<sup>2</sup> та інтервалі між фракціями 1 година коефіцієнт кореляції між мітотичним індексом та частотою хромосомних аберацій становить  $R=0,44$  при рівні значущості  $\alpha=1\%$ . При інтервалі між послідовними фракціями, що дорівнює 4 години, значення коефіцієнта кореляції та рівня значущості далі знижуються ( $R=0,24$ ;  $\alpha=5\%$ ). При інтервалі між фракціями у 1 добу спостерігається від'ємне значення коефіцієнта лінійної кореляції:  $R= - 0,21$  при  $\alpha=5\%$ . Ці показники вказують на зниження ефективності репопуляційного механізму, пов'язаного зі скороченням часу знаходження уражених клітин у фазі перевірки.

Зміни профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК (рис. 5, А-Г) залежать від часу між послідовними фракціями опромінення. Відсутня різниця між спектрами рестрикційних фрагментів контрольних зразків та варіанту з інтервалом у 1 годину між фракціями опромінення свідчить про збереження підтримуючого метилування і формування адаптивної реакції за рахунок конститутивних механізмів. Найбільші відмінності спостерігаються між спектрами рестрикційних фрагментів контролю та варіантами опромінення у повній дозі та з інтервалом між фракціями, що дорівнює 24 годинам. За даними цитогенетичного аналізу ці варіанти відповідають найбільшому ураженню та можливому включенню більш «повільних» репопуляційних механізмів. Відмінність профілів метилування свідчить про включення метилування *de novo* при інтервалі між послідовними сеансами опромінення, що перевищує 1 годину.

Зміни спектрів рестрикційних фрагментів, одержаних для варіантів з інтервалом опромінення у 4, 24 год. та у повній дозі, відбуваються за рахунок зникнення низькомолекулярних фрагментів, що свідчить про певне деметилування як сателітної, так і ДНК, що транскрибується. Співставлення цитогенетичних і молекулярно-генетичних даних свідчить про тісну взаємодію

внутрішньоклітинних та репопуляційних процесів у радіорезистентності рослин, включаючи зміни онтогенезу клітин спокою.



**Рис. 5.** Електрофореграми розділення продуктів ампліфікації нативної ДНК (А) та рестриктів HpaII (Б), MspI (В) та MboI (Г) з ITS праймерами. M<sub>1</sub> – високомолекулярний маркер з фрагментами 10000-500 п.н.; 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; M<sub>2</sub> – низькомолекулярний маркер з фрагментами 1500 - 50 п.н.

Перебудови профілів метилування сателітної ДНК вказують на значимість цього фактору для радіорезистентності клітини. Внесок змін метилування сателітної ДНК у ремоделювання хроматину в цілому означатиме зміни експонованості окремих ділянок молекули ДНК як до пошкоджуючих факторів, так і для збірки на її послідовностях білкових комплексів репарації і транскрипції.

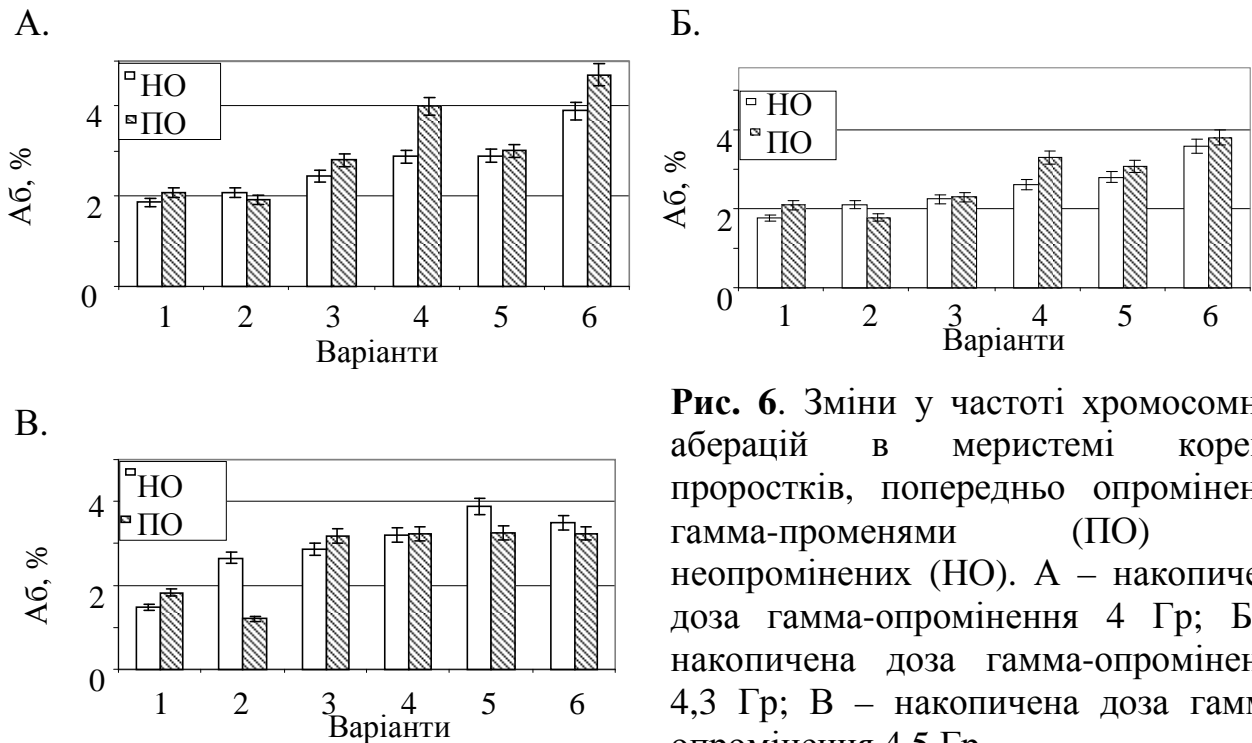
### РАДІОАДАПТИВНА ВІДПОВІДЬ ЗА УМОВ ГОСТРОГО, ХРОНІЧНОГО ТА КОМБІНОВАНОГО ОПРОМІНЕННЯ

З метою виявлення залежності метилування ДНК *de novo* при формуванні адаптивної реакції від умов радіаційного впливу були використані різні режими опромінення: «адаптивне - ударне», хронічне гамма-опромінення, 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.

Гамма-опромінення насіння, що знаходилось в повітряно сухому стані, проводили протягом різних термінів. Накопичена доза становила від 4 до 4,5 Гр. Інтервали між УФ-С- опроміненням проростків в режимі «адаптивне - ударне» становили: 1, 4 год і 1 доба. Адаптивна доза складала 1 кДж/м<sup>2</sup>, ударна доза – 6,2 кДж/м<sup>2</sup>, потужність дози - 6,25 Вт/м<sup>2</sup>,  $\lambda = 253$  нм.

Одержані результати свідчать про значну залежність змін цитогенетичних параметрів від режиму опромінення. Попереднє хронічне гамма-опромінення насіння при нагромадженій дозі 4 - 4,5 Гр обумовлює зниження частоти цитогенетичних аномалій в меристемі проростків, тобто слабо виражений «лікувальний» ефект (рис. 6, А-В). Гостре УФ-С-опромінення у режимі

«адаптивне, через 4 години – ударне» призводить до появи адаптивної відповіді у проростків, що походять з попередньо неопроміненого насіння при всіх повторях експерименту; при інтервалі в 1 добу адаптивної відповіді не спостерігається при останньому повторі експерименту. У проростків з попередньо гамма-опроміненого насіння у дозі 4,5 Гр адаптивна відповідь відсутня при обох інтервалах між адаптивним і ударним опроміненнями.



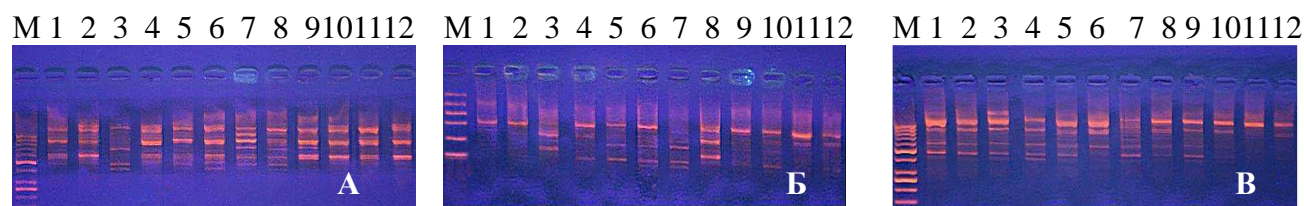
**Рис. 6.** Зміни у частоті хромосомних аберацій в меристемі коренів проростків, попередньо опроміненних гамма-променями (ПО) та неопроміненних (НО). А – накопичена доза гамма-опромінення 4 Гр; Б – накопичена доза гамма-опромінення 4,3 Гр; В – накопичена доза гамма-опромінення 4,5 Гр.

Режими УФ-С опромінення: 1 – контроль; 2 – 1 кДж/м<sup>2</sup>; 3 – 1 кДж/м<sup>2</sup> + 6,2 кДж/м<sup>2</sup> через 4 год після адаптивної дози; 4 – повна доза 7,2 кДж/м<sup>2</sup>, одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі; 5 – 1 кДж/м<sup>2</sup> + 6,2 кДж/м<sup>2</sup> через 1 добу після адаптивної дози; 6 – повна доза 7,2 кДж/м<sup>2</sup> одночасно з варіантом 5.

Пояснення цього явища, як і у попередній серії експериментів, можливе з точки зору існування двох форм репопуляційного відновлення. Низькі значення коефіцієнта лінійної кореляції Браує-Пірсона для варіантів з попереднім хронічним опроміненням ( $R = -0,26 - +0,21$ ) вказують на репопуляційне відновлення меристеми за рахунок клітин спокою, що свідчить про «готовність» цих клітин перейти до поділу після адаптуючого опромінення. Цю «готовність» можна розглядати як результат попереднього хронічного опромінення насіння.

Значні перебудови спектрів рестрикційних фрагментів свідчать про включення режиму метилування ДНК *de novo* за всіх використаних режимів опромінення. Найбільші зміни профілів метилування при опроміненні спостерігаються у сателітних послідовностях ДНК проростків (рис. 7, А-В). Це вказує на тісний взаємозв'язок між перебудовами профілів метилування сателітної

ДНК і рівнем ураження і відновлення цієї макромолекули, що проявляється у частоті цитогенетичних аномалій.



**Рис. 7.** Електрофореграми ISSR-ампліфікації рестриктів HpaII (А), MspI (Б) та MboI (В). М – маркер молекулярної маси з фрагментами 1000-50 п.н.; 1 – ПО, К; 2 – ПО, 1 кДж/м<sup>2</sup>; 3 – ПО, 1 + 6,2 кДж/м<sup>2</sup> (4 години); 4 – ПО, 7,2 кДж/м<sup>2</sup> (4 години); 5 – ПО, 1 + 6,2 кДж/м<sup>2</sup> (1 доба); 6 – ПО, 7,2 кДж/м<sup>2</sup> (1 доба).

Для кількісної оцінки взаємозв'язку змін профілів метилування ДНК та частоти хромосомних аберацій за різних впливів були застосовані різноманітні принципи ранжування електрофореграм і проведено розрахунки коефіцієнта кореляції Спірмена між рангами варіацій електрофореграм і частотою хромосомних аберацій (табл. 1).

Таблиця 1

Кореляція між градаціями електрофореграм та частотою хромосомних аберацій при різних режимах опромінення

Режим опромінення	Коефіцієнт рангової кореляції, Rs		
	MspI	HpaII	MboI
за першим критерієм			
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	-0,73	-0,77
За другим критерієм			
гостре опромінення в режимі «адаптивна – ударна доза» з різними часовими інтервалами	0,81*	0,77	0,91**
комбіноване опромінення: УФ-С опромінення проростків, що походили з попередньо гамма-опроміненого сухого насіння	0,43	0,43	0,64
за третім критерієм			
гостре опромінення в режимі «адаптивна – ударна доза» з різними часовими інтервалами	0,87*	0,84*	0,89*
комбіноване опромінення: УФ-С опромінення проростків, що походили з попередньо гамма-опроміненого сухого насіння	0,21	0,71	0,7

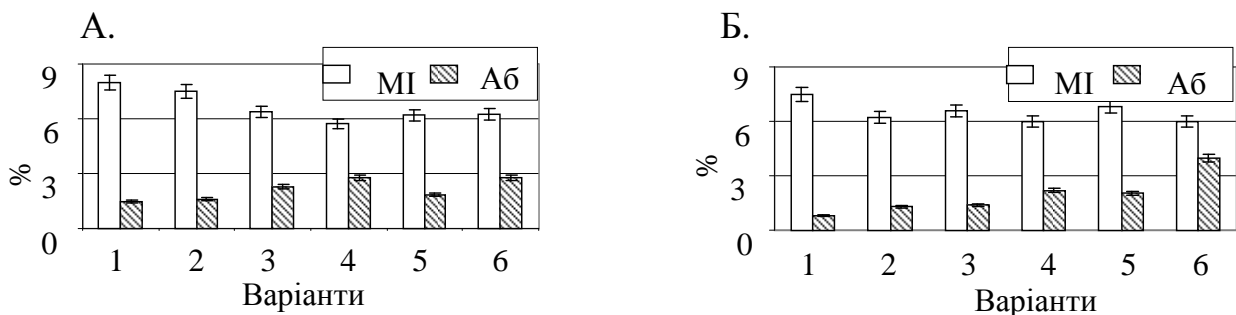
Рівні значущості: \* $\alpha=0,05$ ; \*\* $\alpha=0,01$

## ЗВ'ЯЗОК РАДІОСТІЙКОСТІ РОСЛИН З ВИХІДНИМ ПОЛІМОРФІЗМОМ ПРОФІЛІВ МЕТИЛУВАННЯ ДНК

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 (Гродзинський, 1989, 2000). 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 характеризується певним розподілом. Дослідження впливу початкового стану метилування обох форм ДНК на радіостійкість рослини і подальший розвиток адаптивної реакції проведено шляхом виділення в довільній вибірці насіння кукурудзи субпопуляцій, які мають різну швидкість 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 найнижчою швидкістю проростання (ПП) - насіння, яке проростає на третю добу набубнявіння.

Експерименти проведені на тридобових проростках кукурудзи сорту Поліський 177 МВ з УФ-С- опроміненням у пошкоджуючій дозі 7,2 кДж/м<sup>2</sup>.

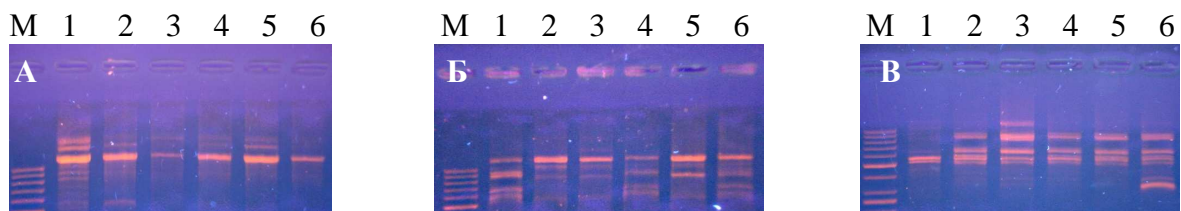
Одержані результати свідчать про існування значних відмінностей цитогенетичних показників між трьома групами проростків, особливо між групами ШП та ПП. При повторях експерименту спостерігалися нестійкі значення цитогенетичних параметрів у групи СП (рис. 8, А-Б).



**Рис. 8.** Цитогенетичні параметри меристеми коренів проростків з різними швидкостями проростання при УФ-С-опроміненні в дозі 7,2 кДж/м<sup>2</sup>. 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.

Група ШП характеризується більш високим вихідним значенням мітотичного індексу і найнижчим рівнем хромосомних аберацій. При опроміненні спостерігається зниження, порівняно з контролем, частоти хромосомних аберацій, тобто «лікувальний» ефект. Результати семи повторів експерименту свідчать про залежність поведінки цитогенетичних показників від сезону, протягом якого проводилось дослідження. Найвищі значення мітотичного індексу серед всіх груп проростків з різними швидкостями проростання спостерігаються влітку (рис. 8, А), а частота хромосомних аберацій, навпаки, має тенденцію до зростання восени (рис. 8, Б).

Електрофореграми розділення продуктів як ITS-, так і ISSR- ампліфікації рестриктів реакції (рис. 9, А-В) свідчать про відмінності в профілі метилування ДНК для проростків, різних за швидкістю проростання (позиції 1, 3, 5).



**Рис. 9.** Електрофореграми ITS-ампліфікації рестриктів реакції з MspI (А) і MboI (Б) ферментами та ISSR-ампліфікації з MboI (В). М – високомолекулярний маркер з фрагментами 1000 – 50 п.н.; 1 – ШП; 2 – ШП+УФ-С; 3 – СП; 4 – СП+УФ-С; 5 – ПП; 6 – ПП+УФ-С.

Однотиме існування різниць у вихідних профілях метилування ДНК та рівнях цитогенетичних аномалій свідчить про вплив характеру метилування на уразливість ДНК-мішені до дії факторів, що обумовлюють її ушкодження, наприклад, активних форм кисню, або теплових коливань. Інакше кажучи, характер метилування може розглядатися як фактор вразливості ДНК. Співставлення результатів цитогенетичного аналізу зі змінами профілів метилування сателітної ДНК та ДНК, що транскрибується, після опромінення (позиції 2, 4, 6) вказує також на їх взаємозв'язок з різною стійкістю до УФ-С-опромінення, що може бути пов'язано з ремоделюванням хроматину, зниженням його вразливості до опромінення і підвищенням доступності факторам транскрипції і репарації, тобто одночасно впливати на вразливість ДНК як мішені радіаційного ураження і визначати епігенетичний контроль адаптації.

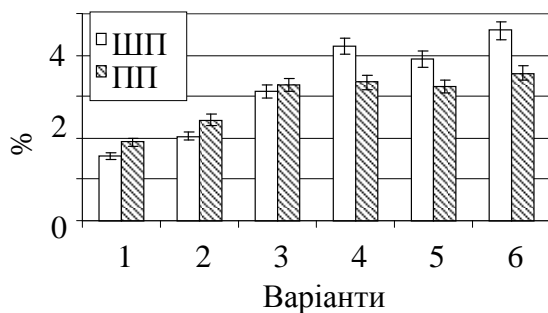
Таким чином, поліморфізм перебудов профілів метилування функціонально різних послідовностей ДНК після опромінення безпосередньо пов'язаний із їх вихідним поліморфізмом та початковою частотою хромосомних аберацій, що свідчить про безпосередній взаємозв'язок індивідуальної радіочутливості і радіостійкості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



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

Результати, одержані у попередній серії досліджень, вказують на важливу роль стану метилування ДНК як фактору вразливості ДНК, як і радіостійкості організму. Наступним кроком у з'ясуванні біологічного значення виявленого зв'язку є вивчення адаптивного потенціалу рослин, що відрізняються вихідними профілями метилування функціонально різних послідовностей ДНК.

Як і у попередній серії досліджень, у проростків контролю з різною швидкістю проростання спостерігаються відмінності частоти хромосомних аберацій і профілів метилування ДНК; найнижча частота хромосомних аберацій спостерігається у ШП - проростків (рис.10). Порівняння цього показника в режимі "адаптивне – ударне опромінення" і 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 опромінення. У ПП-проростків адаптивної відповіді не спостерігається при обох інтервалах між адаптивним і ушкоджуючим опроміненням.

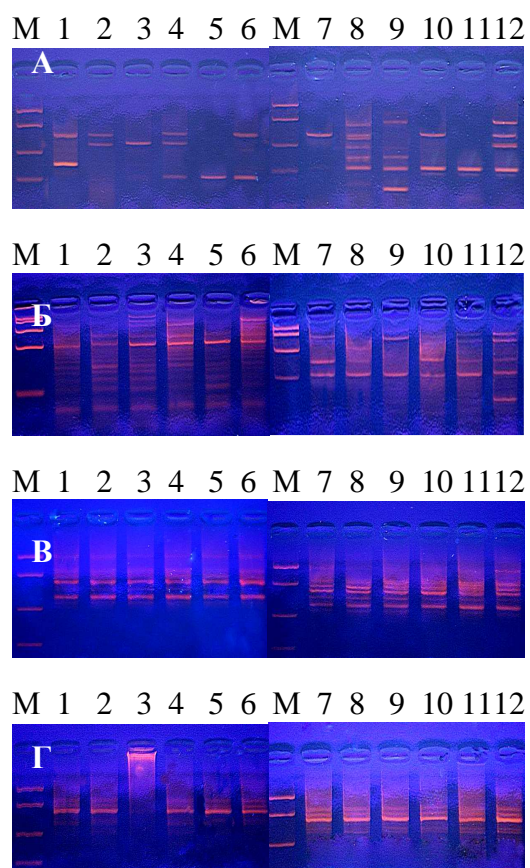


**Рис. 10.** Частота хромосомних аберацій (%) у проростків з насіння, що проростає швидко- (ШП) та повільно (ПП). 1 – контроль; 2 –  $1 \text{ кДж/м}^2$ ; 3 –  $1 \text{ кДж/м}^2 + 6,2 \text{ кДж/м}^2$  через 4 години після адаптивної дози; 4 – повна доза  $7,2 \text{ кДж/м}^2$ , одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі;

5 –  $1 \text{ кДж/м}^2 + 6,2 \text{ кДж/м}^2$  через 1 добу після адаптивної дози; 6 – повна доза  $7,2 \text{ кДж/м}^2$  одночасно з варіантом 5.

Встановлено значне різноманіття спектрів рестрикційних фрагментів (рис. 11, А-Г), що відповідають різним варіантам дослідів. Різниця спостерігається як для продуктів ITS-ампліфікації рестриктів НраП контрольних зразків ШП та ПП проростків (варіанти 1 і 7), так і для всіх варіантів з УФ-С-опроміненням (рис. 11, А). Найбільш різноманітні зміни профілів метилування ДНК спостерігаються при всіх режимах опромінення у проростків, що мають високу швидкість проростання. Це свідчить про масові зміни конформації хроматину, пов'язані з формуванням різноманітних захисних реакцій, що спричиняють як зменшення його вразливості, так і підвищення доступності до факторів транскрипції та репарації.

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 і залежно від режимів опромінення (табл. 2).



**Рис. 11.** Електрофореграма ITS-ампліфікації рестриктів HpaII- (А) та MspI- (Б) ферменту і ISSR-ампліфікації рестриктів HpaII- (В) та MspI-ферменту (Г). М – маркер молекулярної маси з фрагментами 1000-50 п.н.; 1 – ШП, контроль; 2 – ШП, 1 кДж/м<sup>2</sup>; 3 – ШП, 1 кДж/м<sup>2</sup> + 6,2 кДж/м<sup>2</sup> через 4 години після адаптивної дози; 4 – ШП, 7,2 кДж/м<sup>2</sup>, одночасно з опроміненням варіанта 3 в ударній дозі; 5 – ШП, 1 + 6,2 кДж/м<sup>2</sup>, через 1 добу після адаптивної дози; 6 – ШП, 7,2 кДж/м<sup>2</sup>, одночасно з опроміненням варіанта 5 в ударній дозі; 7 – ПП, контроль; 8 – ПП, 1 кДж/м<sup>2</sup>; 9 – ПП, 1 кДж/м<sup>2</sup> + 6,2 кДж/м<sup>2</sup> через 4 години після адаптивної дози; 10 – ПП, 7,2 кДж/м<sup>2</sup> одночасно з опроміненням варіанта 9 в ударній дозі; 11 – ПП, 1 + 6,2 кДж/м<sup>2</sup>, через 1 добу після адаптивної дози; 12 – ПП, 7,2 кДж/м<sup>2</sup>, одночасно з опроміненням варіанта 11 в ударній дозі.

Таблиця 2

Кореляція між градаціями електрофореграм та частотою хромосомних аберацій для насіння з різних епігенетичних груп

Тип насіння	Коефіцієнт рангової кореляції, Rs		
	MspI	HpaII	MboI
за першим критерієм			
Проростає швидко	0,094	-0,18	0,94*
Проростає повільно	0,089*	0,52	0,40
за другим критерієм			
Проростає швидко	0,95*	0,27	0,94*
Проростає повільно	0,48	0,70	0,52
за третім критерієм			
Проростає швидко	0,94*	0,29	0,78
Проростає повільно	0,70	0,52	0,61

Рівні значущості: \* $\alpha=0,05$

Результати статистичного аналізу вказують на участь метилування ДНК як складової епігенетичної регуляції у ремоделюванні хроматину, процесу, що одночасно визначає як неоднакову експонованість окремих ділянок молекули

ДНК - мішені до дії пошкоджуючих факторів, так і збірку на її послідовностях білкових комплексів для репарації та транскрипції.

Отримані результати свідчать про значні відмінності формування радіоадаптивних реакцій на повторні впливи стресового фактора у проростків, що відрізняються вихідним профілем метилування ДНК. При цьому відбувається різний характер подальших перебудов профілів метилування ДНК у проростків з початково відмінними профілями метилування, що свідчить про вплив цього фактору на подальший вибір організмом стратегії захисту.

Одержані дані не лише свідчать про роль метилування ДНК як фактора, що через участь у визначенні конформації хроматину, впливає на природну радіочутливість і радіостійкість, але й вказують на загальну біологічну роль поліморфізму профілів метилування, властивого довільній вибірці проростків. Варіабельність термінів проростання насіння і відмінності в стійкості проростків є одним з факторів, що визначають збереження популяційного та видового гомеостазу 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, яка асоціюється з більшим вихідним розмаїттям сайтів метилування, нижчою вихідною частотою хромосомних аберацій, більшим розмаїттям сайтів метилування *de novo* після опромінення. Комплекс цих відмінностей дозволяє розглядати характер метилування ДНК як фактор індивідуальної радіостійкості організму.

5. Радіоадаптивний потенціал рослинного організму пов'язаний з активністю процесів проростання насіння та вихідним станом метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків. У рослин, що проростають найшвидше, спостерігається вищий потенціал радіоадаптації, який асоціюється з більшим розмаїттям сайтів 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.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Соколова Д.А. Изменение профиля метилирования ДНК при фракционированном УФ-С облучении проростков / А. П. Кравец, Д. А. Соколова, Г. С. Венгжен, Д. М. Гродзинский // Цитология и генетика. – 2013. – Т. 47, № 1. – С. 37 – 43. *(Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛП аналізи, участь в обговоренні результатів і написанні тексту статті).*
2. Darina A. Sokolova. 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. *(Підготовка рослинного матеріалу, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR-ПЛП аналізи, участь в обговоренні результатів, написанні і перекладу тексту статті).*
3. Кравец А. П.. Влияние фракционированного УФ-С облучения на изменение профиля метилирования функционально различных последовательностей ДНК и выход нестабильных хромосомных абераций 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. *(Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, цитогенетичний аналіз, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів і написанні тексту статті).*
4. 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. *(Підготовка рослинного матеріалу, виділення ДНК, цитогенетичний аналіз, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів, написанні і перекладу тексту статті).*
  5. Д. А. Соколова. Роль эпигенетического полиморфизма проростков кукурузы в реакциях на УФ-С облучение / Соколова Д. А., Венгжен Г. С., Кравец А. П. // *Физиология растений и генетика*. – 2014. – Т. 46, № 3. – С. 221 – 229. *(Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, цитогенетичний аналіз, виділення ДНК, рестрикційний та ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів і написанні тексту статті).*
  6. Darina A. Sokolova. 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. *(Підготовка рослинного матеріалу, цитогенетичний аналіз, виділення ДНК, рестрикційний та ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів і написанні тексту статті англійською мовою).*
  7. Кравець О. П. Рівень епігенетичного поліморфізму сорту як маркер виробничої надійності / О. П. Кравець, Б. В. Моргун, Д. О. Соколова, О. А. Шнуренко, А. М. Берестяна, Д. М. Гродзинський // IX Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія ХХІ століття»: Тези доповідей. (Київ, 2015). – С. 128. *(Підготовка рослинного матеріалу, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи).*
  8. Кравець О. П. Епігенетичний поліморфізм як механізм популяційної стійкості рослин / О. П. Кравець, Д. О. Соколова // IX Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія ХХІ століття»: Тези доповідей. (Київ, 2015). – С. 128 - 129. *(Підготовка рослинного матеріалу, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи).*
  9. Кравець О. П. Роль метилування ДНК в системі процесів адаптації рослин до опромінення / О. П. Кравець, Д. О. Соколова // Науково-практична конференція із міжнародною участю «Радіоекологія – 2015»: Збірник матеріалів. (Київ, 2015). – Київ, 2015. – С. 42 – 46. *(Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів).*
  10. Соколова Д. А. Явление эпигенетического полиморфизма в контексте ключевых радиоэкологических проблем: эффекты малых доз и радиоустойчивость / Д. А. Соколова, А. П. Кравец, Г. С. Венгжен // Науково-практична конференція із міжнародною участю «Радіоекологія – 2014»: Збірник матеріалів. (Київ, 2014). – Київ, 2014. – С. 34 – 37. *(Підготовка рослинного*

*матеріалу, УФ-С- опромінення, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів).*

11. Соколова Д. А. Влияние эпигенетического полиморфизма семян на скорость прорастания и устойчивость проростков кукурузы / Д. А. Соколова, Г. С. Венгжен, А. П. Кравец // «XXI Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України»: Тези доповідей. (Київ, 2014). – Київ, 2014. – С. 223 – 224. *(Підготовка рослинного матеріалу, цитогенетичний аналіз, УФ-С- опромінення, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів).*
12. Соколова Д. А. Изучение связи эпигенетического полиморфизма семян кукурузы с адаптивным потенциалом проростков при остром УФ-С облучении / Д. А. Соколова, Г. С. Венгжен, А. П. Кравец // «XXI Щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України»: Тези доповідей. (Київ, 2014). – Київ, 2014. – С. 224 – 225. *(Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С- опромінення, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів).*
13. Соколова Д. О. Зв'язок зміни профілю метилування функціонально різних частин ДНК та виходу нестабільних хромосомних аберацій під впливом фракціонованого УФ-С опромінення / Д. О. Соколова, О. П. Кравець, Г. С. Венгжен // Український біохімічний журнал – 2012. – Т.84, №4. – С. 81. *(Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, цитогенетичний аналіз, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів).*
14. Соколова Д. О. Зміна профілю метилування ДНК рослин при індукції радіоадаптації різними за тривалістю впливами / Д. О. Соколова, Г. С. Венгжен, О. П. Кравець, Д. М. Гродзинський // «XIX щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України»: Тези доповідей. (Київ, 2012). – 2012. - С. 151. *(Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, цитогенетичний аналіз, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів).*
15. Соколова Д. О. Зв'язок зміни профілю метилування функціонально різних частин ДНК та виходу нестабільних хромосомних аберацій під впливом фракціонованого УФ-С опромінення / Д. О. Соколова, О. П. Кравець, Г. С. Венгжен // «Конференція – конкурс молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2012” Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.»: Тези доповідей. (Київ, 2012). – 2012. – С. 29. *(Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів).*
16. Kravets A. P. Possibilities for detection of epigenetic mechanism contribution to adaptation / A. P. Kravets, D. O. Sokolova, G. S. Vengzhen // “Interdisciplinary Scientific Conference Adaptive strategies of living systems”: Abstracts. (Crimea, 2012). – 2012. – P. 102. *(Підготовка матеріалу, цитогенетичний аналіз).*
17. Koval'chuck N. L. Is there the genome instability inalienable step of genetic adaptation? / N.L. Koval'chuck, G.S. Vengzhen, A.P. Kravets, D. A. Sokolova. // “Interdisciplinary Scientific Conference Adaptive strategies of living systems”:

- Abstracts. (Crimea, 2012). – 2012. – P. 276. (*Підготовка матеріалу, цитогенетичний аналіз*).
18. Соколова Д. А. Изменение профиля метилирования в функционально различных участках ДНК под влиянием фракционированного УФ-С облучения / Д. А. Соколова // «XII Молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» Института сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН»: Тезисы докладов. (Москва, 2012). – 2012. – С. 164. (*Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, цитогенетичний аналіз, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів*).
  19. Соколова Д. О. Вплив фракціонованого УФ-С опромінення на зміну профілю метилування ДНК та вихід нестабільних хромосомних аберацій / Д. О. Соколова // «Молодіжна наукова конференція “Шевченківська весна” Київського Національного Університету ім. Т. Шевченка»: Тези доповідей. (Київ, 2012). – 2012. – С. 107. (*Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, цитогенетичний аналіз, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів*).
  20. Sokolova D. A. Changes in methylation pattern of functionally different DNA parts under various irradiation modes / D. A. Sokolova, A. P. Kravets // The First International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research “RAD-2012”: Book of abstracts. (Nish, 2012). – 2012. – P. 42. (*Підготовка рослинного матеріалу, УФ-С-опромінення, цитогенетичний аналіз, виділення ДНК, рестрикційний та ISSR- ITS-ПЛР аналізи, участь в обговоренні результатів*).

## АНОТАЦІЯ

### **Соколова Д.О. Епігенетична компонента радіоадаптації за умов хронічного та гострого опромінення рослин. – Рукопис**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, Київ, 2015.

Дисертаційна робота присвячена виявленню ролі метилування ДНК як складової епігенетичної регуляції радіоадаптації рослин до опромінення. 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 проявів адаптивної реакції, що свідчить про зв'язок цих ефектів з реалізацією різних за часом розвитку епігенетичних механізмів. Показано, що 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. Виявлено зв'язок різної активності проростання насіння з 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 процесів проростання та вихідним станом метилування функціонально різних послідовностей ДНК проростків.

**Ключові слова:** стрес, радіоадаптація, радіорезистентність, хромосомні аберації, профіль метилування ДНК, епігенетичний поліморфізм.

## АННОТАЦІЯ

**Соколова Д.А. Эпигенетическая компонента радиоадаптации в условиях хронического и острого облучения растений. - Рукопись**

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.01 – радиобиология. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной Академии Наук Украины, Киев, 2015.

Диссертация посвящена выявлению роли метилирования ДНК как составляющей эпигенетической регуляции адаптации растений к облучению. Показано, что при формировании радиоадаптивной реакции изменяются профили метилирования как сателлитной, так и транскрибируемой ДНК. Такие изменения происходят в основном за счет деметилирования существующих и метилирования новых сайтов, что свидетельствует о переходе от поддерживающего к метилированию *de novo* обеих функциональных форм ДНК. Установлено, что переключение метилирования ДНК в режим *de novo* происходит при превышении интервала между фракциями 1 час; происходят последующие изменения профилей метилирования и проявление радиоадаптивной реакции, что свидетельствует о связи этих эффектов с реализацией разных по времени развития эпигенетических механизмов. Показано, что при хроническом и комбинированном облучении диапазон изменения длин рестрикционных фрагментов шире, чем при остром – это говорит в пользу большего вклада метилирования ДНК *de novo* в формирование радиобиологической реакции. Выявлена связь разной активности прорастания семян с полиморфизмом профилей метилирования и функционально различных последовательностей ДНК проростков и их радиоустойчивостью, что позволяет рассматривать характер метилирования ДНК как фактор индивидуальной радиоустойчивости организма. Показано, что адаптивный потенциал растения связан с активностью процессов прорастания и начальным профилем метилирования функционально различных последовательностей ДНК проростков.



**Ключевые слова:** стресс, радиоадаптация, радиорезистентность, хромосомные aberrации, профиль метилирования ДНК, эпигенетический полиморфизм.

## SUMMARY

**Sokolova D.O. Epigenetic component of radioadaptation under chronic and acute irradiation exposure of plants. – Manuscript.**

Thesis for Candidate (Ph. D) degree of biological sciences, speciality 03.00.01 – Radiobiology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The thesis is devoted to identifying the role of DNA methylation in radiation exposure and plant adaptation to irradiation. The investigation was carried out on two hybrids of corn and was focused on studying the connection between adaptive changes in whole organism and rearrangements of satellite and transcribed DNA methylation patterns under different exposure modes. As independent marker of changing radioresistance the chromosome aberration yield was used.

The thesis consists of four experimental series. The first one is devoted to determine time interval between irradiation fractions and passage from maintenance methylation to *de novo* one and effect of time between fractions on DNA methylation pattern rearrangements and adaptation rate. The rearrangements of satellite and transcribed DNA methylation patterns in adaptive reaction's formation were shown. Such changes mostly were due to demethylation of existed and methylation of new sites, that meant pass from maintenance methylation to *de novo* one under increasing 1 hour time between fractions of acute exposure. Such result pointed to connection between inducible and constitutive reactions while adaptation was formed. That indicated connection between the effects and different characteristic terms implementation of epigenetic mechanisms that underlied adaptation. Increasing of time between fractions led to changes in DNA methylation patterns and chromosome aberration yield that indicated to realization of different adaptation mechanisms by their raising time. Statistic analysis of connection between mitotic index and chromosome aberration yield under various doses and intervals between irradiation pointed to existence of two types of repopulation meristematic repair. The one was connected with passage of sleeping meristematic cells to active proliferation, thus was dedicated to changing of ontogenetic cell program.

With aim of next investigation of connection between adaptive changes and DNA methylation the studying was carried out in the second experimental series under different exposure modes: “adaptive – challenge irradiation”, chronic gamma-irradiation and combined irradiation. Shown that under chronic and combined radiation exposure the range of changed restriction fragments was wider than under acute one. This indicated to great role of *de novo* DNA methylation in formation of radiobiological reactions.

The investigation of effect of original methylation pattern of two DNA types to plant radioresistance and formation of adaptation was carried out by choosing from corn seeds subpopulations with different germination rate and their irradiation under various exposure modes: acute UV-C irradiation and “adaptive – challenge exposure”. In the third and fourth experimental series was indicated connection between various seeds’ germination rate and polymorphism of functionally different DNA methylation patterns of seedlings and their radioresistance. The data allowed considering the DNA methylation pattern as the factor of organism’s individual radioresistance, and polymorphism of methylation pattern as the factor of population radioresistance.

It was found that the plant organism’s adaptive capacity was tightly connected to the activity of growth processes and the original DNA methylation pattern of functionally different sequences. And adaptive capacity of plant population was associated with polymorphism of DNA methylation pattern.

Great changes of DNA methylation pattern not only transcribed but also satellite DNA shown while adaptation formation under all exposure modes pointed to importance of this factor in plant radioresistance and role in epigenetic regulation of adaptation by chromatin remodeling .

**Key words:** stress, radioadaptation, radioresistance, chromosome aberrations, DNA methylation pattern, epigenetic polymorphism.