

ЗВ'ЯЗОК СТИМУЛЯЦІЇ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ РОСЛИН ІЗ ОЗНАКАМИ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ГЕНОМУ

Д.О. СОКОЛОВА, Т.В. ГАЛИЧ, В.В. ЖУК, О.П. КРАВЕЦЬ, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

E-mail: dasokolova88@gmail.com, vzhukv@gmail.com, sdgfbfd@gmail.com, kaplibra@gmail.com, nkuchuk@icbge.org.ua

На двох генотипах ромашки аптечної – сорту Перлина лісостепу та його мутанту досліджено зв'язок стимуляції нагромадження низькомолекулярних антиоксидантів у фармацевтичній сировині рослин (суцвітнях) з ознаками радіаційно-індукованої нестабільності геному на стадії цвітіння рослин за умов рентгенівського передпосівного опромінення насіння при дозах 5–15 Гр. Дослідження перебудов первинної структури ДНК за умов різних доз опромінення здійснено шляхом проведення ПЛР з використанням восьми ISSR- та десяти RAPD-праймерів. Залежні від дози опромінення зміни спектрів ампліконів при проведенні ISSR – RAPD – ПЛР проаналізовано з використанням індексу подібності Жаккарда. Встановлено, що найбільші перебудови первинної структури ДНК обох генотипів, що проявляється у зниженні подібності з контрольними спектрами ампліконів, спостерігається при дозах опромінення 5–10 Гр. Виявлено тенденцію до наближення цього показника до контрольного при дозі опромінення 15 Гр, що означає підвищення ефективності репаративних процесів. Показано зв'язок між поліморфізмом первинної структури ДНК за ISSR-RAPD- послідовностями у різних генотипів та характером її перебудови при опроміненні. Співставлення цих результатів з немонотонними дозовими залежностями змін питомого вмісту флавоноїдів і фенолів, дозволяє зробити висновок про стимуляцію антиоксидантного захисту при дозах, що відповідають низькій ефективності репараційних процесів і, відповідно, його зниженню за умов ознак відновлення нормального стану генетичного матеріалу. Надано інтерпретацію виявленого феномену на основі відомого зв'язку ефектів геномної нестабільності з підвищенням рівня активних форм кисню і загальних принципів антиоксидантного захисту. Обговорюється значення одержаних результатів в розробці наукового підґрунтя використання малих доз іонізуючого випромінювання в біотехнологіях, зокрема в фармакології.

Ключові слова: нестабільність геному, передпосівне опромінення насіння, вторинний метаболізм, біотехнологія.

© Д.О. СОКОЛОВА, Т.В. ГАЛИЧ, В.В. ЖУК,
О.П. КРАВЕЦЬ, М.В. КУЧУК, 2022

У зв'язку із зростанням використання рослин в офіційній медицині, збільшується і різноманітність підходів до отримання більшої кількості лікарських речовин з цієї природної сировини. Поряд з пошуком нових видів, які мають лікувальні властивості, виведенням більш продуктивних сортів, використовується перенаправлення метаболізму організмів у бік збільшення необхідних для практики речовин. У той час як для розв'язання цього питання генетична і метаболічна інженерія фокусуються на генетичній трансформації організмів, досвід вивчення захисних реакцій вказує на можливість використання для переорієнтації метаболізму рослин впливу стресових факторів (Winkel-Shirley, 2002; Alothman, Bhat, Karim 2009; Aypar, Morgan, Baulch, 2010; Sumira, Parween, Siddiqi, 2012).

Одним з ефективних підходів є використання іонізуючого та УФ опромінення. При гострому та хронічному опроміненні спостерігається зсув метаболічних процесів у бік утворення речовин вторинного метаболізму, до складу яких входить більшість радіопротекторів, що мають антиоксидантну, антиканцерогенну, імуномодулюючу і протизапальну дію та мають застосування в фармакології (Croft 1998; Halliwell, 1999; Khattak, Simpson, 2008; Alothman, Bhat, Karim, 2009, Sumira, Parween, Siddiqi, 2012).

Разом з цим стимуляція напрацювання широкої групи антиоксидантів, що мають значення для фармакології, відображає тільки одну із складових системної відповіді організму на опромінення, яка включає крім стимуляції різноманітних захисних і відновлювальних процесів розвиток радіаційного ураження.

Геном клітини є головною мішенню радіаційного впливу (Kim, Ryu, Lee, 2019). Дані останніх десятиліть свідчать про вразливість ДНК як під впливом конститутивних внутрішньоклітинних факторів, так і зовнішніх впли-

вів (Durkin, Glover, 2007; Aguilera García-Muse, 2013), а також про існування різноманіття механізмів захисту і репарації, що обумовлюють успіх в передачі спадкової інформації. Вивчення ефектів малих доз на різних біологічних системах, виявило появу множинних генетичних ушкоджень за умов прямої чи непрямой дії опромінення, явища, яке увійшло у наукову термінологію під назвою радіаційно – індукованої нестабільності ДНК (Aupar, Morgan, Baulch, 2010; Aguilera, García-Muse, 2013). За сучасними уявленнями, радіаційно – індукована нестабільність геному (ПНГ, RIGI) – це виникнення *de novo* множинних генетичних ушкоджень у значній кількості (до 30 %) нащадків опромінених клітин, що супроводжується підвищенням рівня активних форм кисню (АФК), активації мобільних елементів, інших епігенетичних перебудов (Tominaga, Kodama, Matsuda N, 2004; Szumiel, 2015; Kravets, Sokolova, 2020).

Саме взаємодія цих двох груп процесів – розвитку ураження та захисних реакцій визначає результат біотехнологічного використання опромінення.

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

Ці питання було досліджено на поширеній лікарській рослині – ромашці аптечної (*Matricaria chamomilla* L).

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

Матеріали і методи. Дослідження в умовах вегетаційного досліду проведено на двох генотипах ромашки аптечної – Перлині лісостепу, української селекції та її мутанту. Мутант одержано шляхом обробки гербіцидом Раундап МАКС 450 г/л гліфосату у кислотному

еквіваленті 551 г/л. Норма внесення – 2 л/га (2 л на 250 л води).

Насінневий матеріал одержано від Дослідної станції лікарських рослин Інституту агро-екології і природокористування НААН України, Лубни. Попередні дослідження генотипів ромашки аптечної селекції різних європейських країн виявили значну різницю фізіологічних і біохімічних характеристик також і цих двох генотипів (Sokolova et al, 2021; Zhuk et al, 2021). Оцінка внутрішньовидових взаємозв'язків найпоширенішим методом (Pougar, 2016) за ISSR-RAPD – поліморфізмом з використанням програмного забезпечення UPGMA (доступно через Інтернет <http://genomes.uiv.cat/UPGMA/>) встановила, що коефіцієнти подібності Жаккарда цих генотипів за ISSR-послідовностями становлять 0,477, за RAPD – послідовностями – 0,391, відповідно. На сьогодні мутант Перлини лісостепу залучено до сортовипробування: проведення оцінки на відмінність, однорідність, стабільність ознак.

Сухе насіння опромінювали на рентгенівській установці РУМ-17 (Росія) при дозах 5, 10, 15 Гр, потужність дози – 1,42 сГр/с, напруга – 200 кВ, сила струму 10 мА, фільтр Cu (0,5 мм). Вирощували по 10 рослин на горщик з 1,5 кг суглинистого ґрунту. На один варіант досліду використовували 5 горщиків, тобто 50 рослин. ДНК виділяли з вегетативної маси рослин у фазу цвітіння, відбір матеріалу відбувався шляхом забору із всіх рослин варіанту невеликої кількості тканин з подальшим перемішуванням та усередненням безпосередньо перед виділенням ДНК. Умови збору, підготовки та зберігання аптечної сировини описано попередньо (Sokolova et al, 2021).

Існує декілька підходів до виявлення нестабільності геному за умов різних видів і доз опромінення. Найбільш поширеним є метод оцінки стабільних і нестабільних хромосомних аберацій, які розглядаються як одні з основних маркерів радіаційного ураження людини, тварин і рослин (IAEA, 2001). На сьогодні набули широкого розповсюдження молекулярно-генетичні підходи (Kumari, Rastogi, Singh et al, 2008), одним з яких і дуже перспективним з огляду оцінки вразливості певних послідовностей ДНК є проведення ПЛР з різними рідинами праймерів. Цей підхід було застосовано

при дослідженні міри ураженості різних послідовностей ДНК за умов різних доз рентгеновського опромінення з використанням 8 ISSR та 10 RAPD – праймерів. Фокусування на дослідженні RAPD та ISSR мікросателітних послідовностей базувалося на попередніх даних, що виявили появу атипичних ампліконів саме у цих послідовностях, що непрямым чином вказує на «відбракування» більш вагомим порушень ДНК в «точках перевірки» і мітози (Sokolova, Vengzhen, Kravets, 2013).

Для виділення ДНК використовували набір реагентів ZymoResearch (Quick-DNA Plant/Seed MiniPrep Kit) згідно з протоколом фірми-виробника. Перевірку нативності виділеної ДНК проводили в 1,7%-му агарозному гелі з ТБЕ-буфером, візуалізували за присутності бромистого етидію на UV-трансліюмінаторі та фотографували. При постановці електрофорезу в «кишені» гелю вносили по 5 мкл розчину ДНК. Як маркер молекулярної маси використовували GeneRuler 50 п.н. Для проведення ПЛР використовували два типи праймерів: ОРА та ISSR («Metabion», Німеччина) і готову суміш реагентів для амплікації ДНК PCR MIX 2x-R («Neogene», Україна). Нуклеотидні послідовності праймерів наведено в таблиці 1.

Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 12,5 мкл PCR MIX 2x-R, 1,75 мкл праймера, 5,75 мкл деіонізованої води і 5 мкл тотальної геномної ДНК. Амплікація з ISSR-

праймерами включала наступні етапи: початкову денатурацію 4 хв при 94 °С, 40 циклів; денатурацію при 94 °С – 45 с, відпал – 45 с (температура різна для кожного праймера, зазначається виробником), елонгацію при 72 °С – 45 с; кінцева елонгація тривала 7 хв при 72 °С. Амплікація з ОРА-праймерами включала наступні етапи: початкову денатурацію 5 хв при 94 °С, 40 циклів; денатурацію при 94 °С – 40 с, відпал – 40 с (температура різна для кожного праймера, зазначається виробником), елонгацію при 72 °С – 2 хв; кінцева елонгація тривала 10 хв при 72 °С.

Отримані продукти ПЛР розділяли в 1,7%-вому агарозному гелі з ТБЕ-буфером за присутності бромистого етидію та візуалізували на UV-трансліюмінаторі. При постановці електрофорезу в «кишені» гелю вносили однаковий об'єм продуктів ПЛР і рестрикції (5 мкл). Як маркер молекулярної маси використовували GeneRuler 50 п.н.

Екстракцію флавоноїдів і фенолів проводили за загально прийнятими методами (Croft, 1998). Суху рослинну масу квіток (50 мг) мацерували у керамічній ступці, а потім витримували у 5 мл 70%-вому етанолі при 24 °С впродовж 72 год, після чого фільтрували, доводили кількість фільтрату 70%-вим етанолом до початкового об'єму і центрифугували. До 0,5 мл екстракту додавали 0,5 мл 2%-вого розчину хлориду алюмінію у етанолі та 2 мл

Таблиця 1. Назви і нуклеотидні послідовності ISSR -праймерів

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

Таблиця 2. Назви і нуклеотидні послідовності RAPD –праймерів

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

70%-вого етанолу. Розчин порівняння містив 0,5 мл екстракту, 1 краплю оцтової кислоти, що відповідає 0,025 мл, та 2,5 мл 70%-вого етанолу. Визначення вмісту флавоноїдів проводили за утворенням комплексу флавоноїд-алюміній, що має жовте забарвлення. Через 20 хв інкубації вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 410 нм проти розчину порівняння, визначали концентрацію суми флавоноїдів по калібрувальному графіку рутину та виражали в мг рутинного еквіваленту. Вміст суми фенолів визначали з того ж екстракту, що і флавоноїди. До 0,1 мл екстракту додавали 0,5 мл (1/10 розведеного) реактиву Фоліна-Чокальтеу та 1 мл дистильованої води, перемішували та витримували за кімнатної температури 1 хв. Через 1 хв додавали 1,5 мл 20%-вого розчину Na_2CO_3 , перемішували та інкубували в темноті впродовж 2 год за кімнатної температури. Визначали оптичну густину розчину синього кольору за довжини хвилі 760 нм на спектрофотометрі проти проби, що містить 0,1 мл 70%-вого етанолу замість екстракту та виражали у мг галової кислоти еквіваленту (ГКЕ) (по калібрувальному графіку) на г сухої маси.

Для характеристики змін наборів ампліконів при проведенні ISSR- RAPD-ПЛР контрольних і опроміненних варіантів використано два показники. Показник «% атипичних ампліконів» розраховували як відношення кількості відмінних від контрольних ампліконів до їх загальної кількості; для оцінки значущості різниці середніх показників для різних варіантів дослідження використано непараметричний Х-критерій Ван-дер-Вардена (Lakin, 1980). В якості показника змін спектрів ампліконів різної довжини використано коефіцієнт подібності Жаккарда (Eliseeva, Rukavishnikov, 1977). Розрахунки проведено з використанням програмного забезпечення UPGMA (доступно через Інтернет <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>).

При проведенні аналізу змін питомого вмісту низькомолекулярних антиоксидантів визначали середні арифметичні величини (\bar{X}) та їх середньоквадратичні відхилення (S_x). Достовірність відмінностей між варіантами дослідження оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента, довірчий інтервал, $P=0,95$ (Lakin, 1980).

Результати та їх обговорення. Огляд одержаних електрофореграм (рис. 1, 2) свідчить про наявність значних відмінностей у кількості та довжині ампліконів при RAPD – ISSR-ПЛР аналізі у контрольних варіантів двох досліджених генотипів ромашки лікарської та появи різноманітних ампліконів при опроміненні. В результаті опромінення спостерігається поява відмінних від контролю, атипичних ампліконів як більшої, так і меншої довжини. Інтерпретація цих результатів має враховувати результати досліджень геному, що базується як на використанні біохімічних молекулярно-генетичних, так і цитогенетичних методів, що надали багату інформацію про можливість спонтанних та індукованих змін генетичного апарату. Головною причиною утворення хромосомних аберацій є виникнення подвійного розриву ДНК та його помилкової репарації. При цьому можлива втрата частини хромосоми (інтеркалярні і термінальні ділеції), зміна порядку в послідовностях ДНК хромосоми на зворотній (інверсія), повторення частини хромосоми (дуплікація), переніс частини однієї хромосоми на іншу (транслокація). Цей далеко не повний перелік досліджених типів хромосомних аберацій вказує на можливість різноманітних змін довжини та первинної структури молекули ДНК, що входить до складу абераційних хромосом. Також відомо про існування стану гіперзмінюваності, утворення нових мікросателітів, що різняться за довжиною, а не за нуклеотидною послідовністю як помилок реплікації і репарації саме в цих послідовностях ДНК (Ellegren, 2004). Ці зміни і проявляються при ПЛР появою відмінних від контрольних, як збільшених, так і зменшених за довжиною ампліконів. Одержані результати пояснюються і біохімічними дослідженнями розмаїття форм ураження ДНК при опроміненні і різномайття (Rinne De Bont, Nik van Larebeke 2004; Pinto, Prise, Michael, 2005) ендогенних хімічних перетворень, пов'язаних з дією активних форм кисню, що обумовлюють руйнацію різних послідовностей ДНК.

Для аналізу одержаних результатів та їх співставлення із змінами напрацювання антиоксидантів у лікарській сировині при опроміненні необхідно провести їх кількісний аналіз з врахуванням поліморфізму ДНК за ISSR-

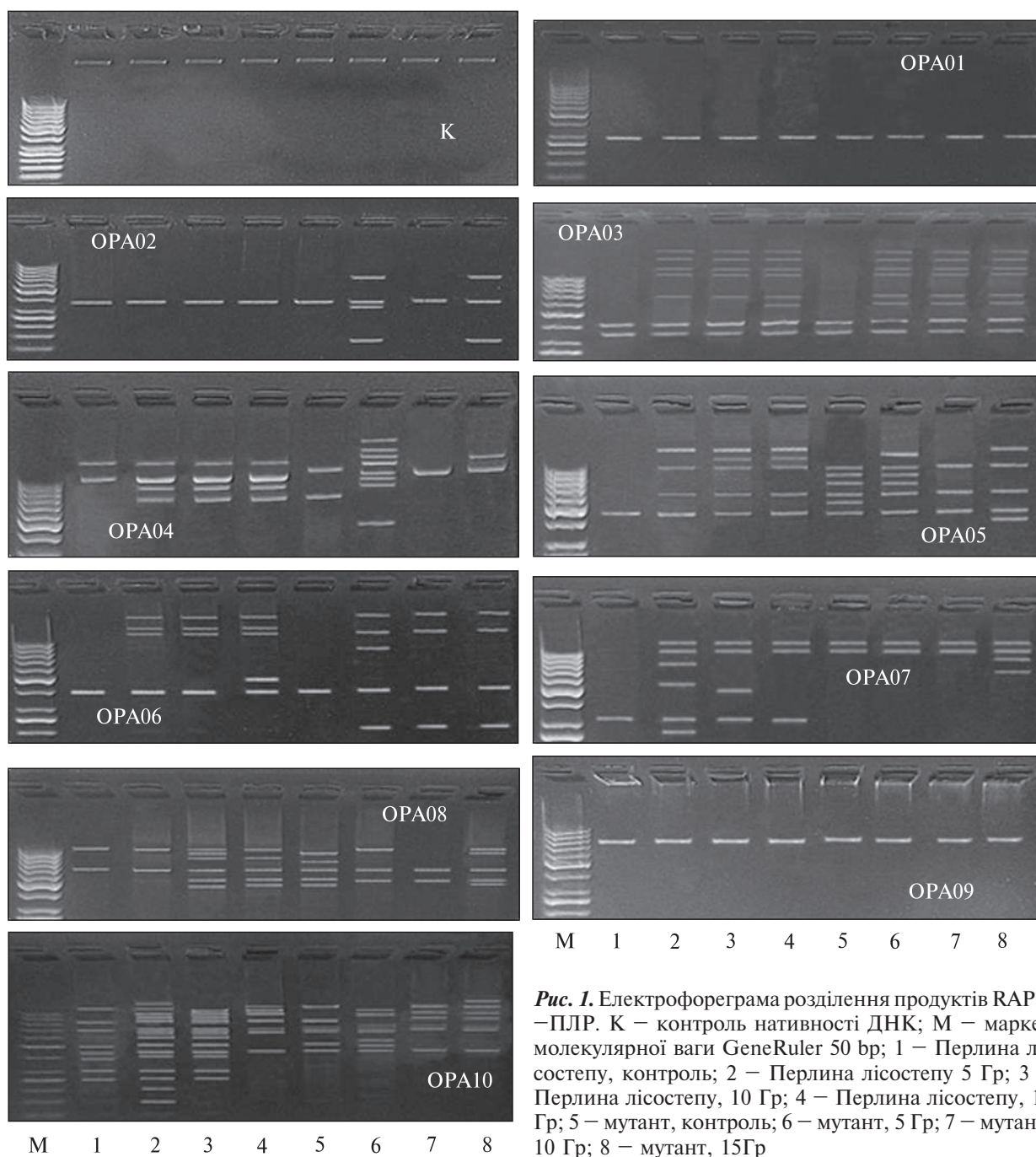


Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів RAPD – ПЛР. К – контроль нативності ДНК; М – маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bp; 1 – Перлина лісостепу, контроль; 2 – Перлина лісостепу 5 Гр; 3 – Перлина лісостепу, 10 Гр; 4 – Перлина лісостепу, 15 Гр; 5 – мутант, контроль; 6 – мутант, 5 Гр; 7 – мутант,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

RAPD-послідовностями обох генотипів в контролі та змін цих показників при опроміненні.

Першим етапом є оцінка змін під впливом опромінення кількості апліконів при ISSR – RAPD – ПЛР для різних варіантів досліді з використанням показника частоти атипичних апліконів.

На рис 3 (а, б). наведено тренд усередненої частоти появи атипичних апліконів в залежності від дози при проведенні ISSR-RAPD – ПЛР аналізу.

Спостерігається помітна різниця середньої частоти появи атипичних апліконів залежно від дози при ISSR-RAPD – ПЛР аналізі. Разом з

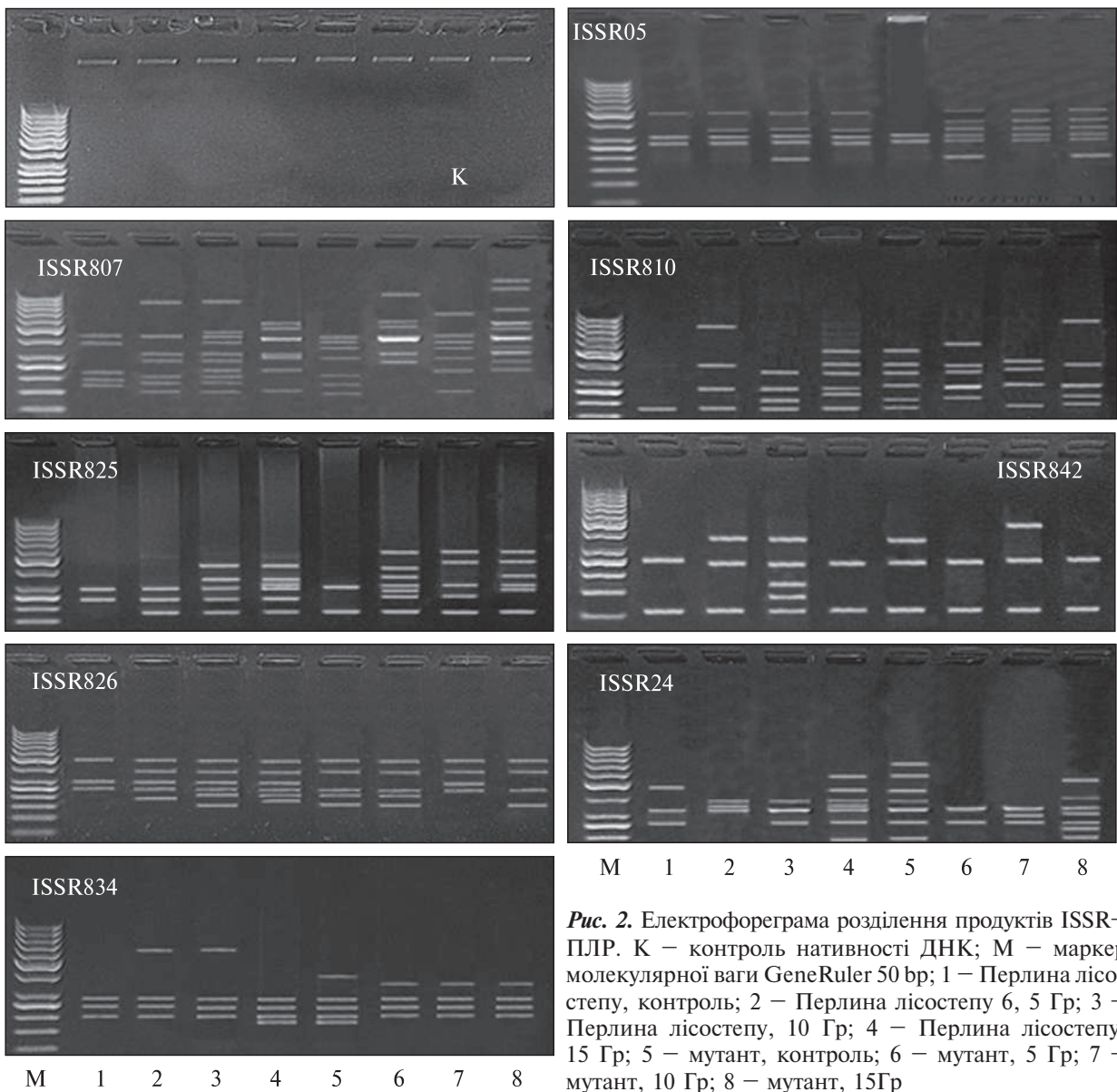


Рис. 2. Электрофореграма розділення продуктів ISSR–ПЛР. К – контроль нативності ДНК; М – маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bp; 1 – Перлина лісостепу, контроль; 2 – Перлина лісостепу 6, 5 Гр; 3 – Перлина лісостепу, 10 Гр; 4 – Перлина лісостепу, 15 Гр; 5 – мутант, контроль; 6 – мутант, 5 Гр; 7 – мутант,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

тим, оцінки за непараметричним Х-критерієм Ван-дер-Вардена лише вказують на близьку до достовірної при 95 % довірчому інтервалі різницю тільки між відсотком атипичних ампліконів ISSR – ПЛР генетичного матеріалу Перлини Лісостепу та її мутанту при дозі опромінення 5 Гр та між варіантами опромінення при дозах 10–15 Гр у мутанта.

Дійсно, цей показник залишає поза увагою зміни довжин ампліконів, тобто зміни самої структури їх спектрів. Це дозволяє роз-

глядати показник «% атипичних ампліконів» недостатньо інформативним для характеристики впливу опромінення на стабільність ДНК, принаймні для обраного набору праймерів та діапазону доз.

Розглянемо наведені на рис. 1, 2 дані з точки зору одержаних під впливом опромінення розмаїття змін у спектрах ампліконів із залученням індексу подібності Жаккарда. Розглянемо дві групи необхідних для аналізу показників: спорідненість між спектрами ампліко-

нів різних генотипів при однакових дозах опромінення (табл. 3) та спорідненості спектрів ампліконів при різних дозах опромінення одного генотипу, Перлини лісостепу чи мутанту (табл. 4 та 5).

Спостерігаються відмінності як у спорідненості спектрів ампліконів контрольних варіантів генотипів, так і при опроміненні (табл. 3). Загальним в поведінці цього показника є найбільш значне зниження спорідненості спектрів ампліконів у Перлини лісостепу та її мутанту при дозі опромінення 5 Гр та підвищення спорідненості при 10 та 15 Гр як при при ISSR-RAPD – ПЛР аналізі.

В табл. 4 наведено значення індексу подібності Жаккарда для спектру ампліконів, що одержані при ISSR- ПЛР контрольних і опромінених варіантів окремо для кожного з генотипів.

Помітна відмінність в поведінці показника подібності у обраних генотипів.

Так, при опроміненні Перлини лісостепу при дозі 5 та 10 Гр спостерігається зниження подібності з контрольним варіантом та підвищення цього показника при опроміненні 15 Гр. При опроміненні мутанту спостерігається поступове зниження подібності спектрів амплі-

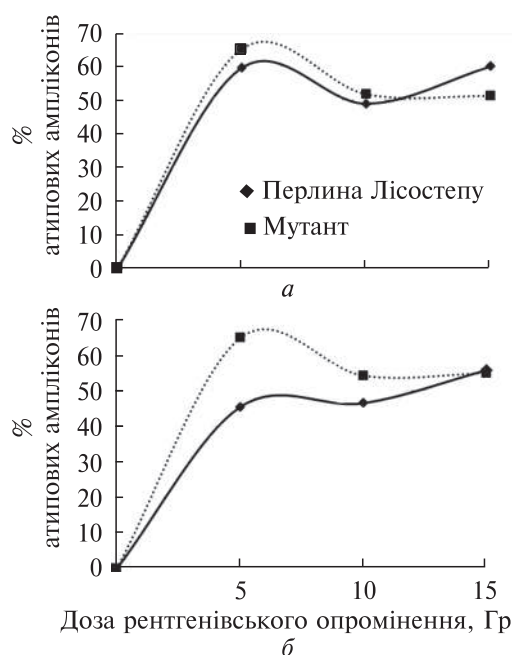


Рис. 3. Тренд змін усередненої частоти атипичних ампліконів в залежності від дози при проведенні RAPD (а) та ISSR (б) ПЛР-аналізу

конів опромінених варіантів з контрольним варіантом. По-різному також проявляються ефекти нестабільності геному при двох послідов-

Таблиця 3. Значення індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів, що відповідають одній дозі різних генотипів одержаних при ISSR-RAPD – ПЛР

RAPD-ПЛР, варіанти	М**, К	М., 5 Гр	М., 10 Гр	М., 15 Гр	ISSR-ПЛР, варіанти	М., К	М., 5 Гр	М., 10 Гр	М., 15 Гр
Пл.Л*, К	0,67	–	–	–	Пл.Л*, К	0,75	–	–	–
Пл.Л., 5 Гр	–	0,65	–	–	Пл.Л., 5 Гр	–	0,63	–	–
Пл.Л., 10 Гр	–	–	0,73	–	Пл.Л., 10 Гр	–	–	0,8	–
Пл.Л., 15 Гр	–	–	–	0,1	Пл.Л., 15 Гр	–	–	–	0,71

Примітка. Пл.Л*- Перлина Лісостепу, М**- Мутант Перлини Лісостепу.

Таблиця 4. Залежність від дози індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів кожного з генотипів при ISSR-ПЛР аналізі ДНК

ISSR, ПЛР, варіанти	Пл.Л., К	Пл.Л., 5 Гр	Пл.Л., 10 Гр	Пл.Л., 15 Гр	ISSR, ПЛР, варіанти	М., К	М., 5 Гр	М., 10 Гр	М., 15 Гр
Пл.Л*, К	1	0,69	0,65	0,80	М., К	1	0,78	0,72	0,67
Пл.Л., 5 Гр	–	1	0,82	0,77	М., 5 Гр	–	1	0,72	0,67
Пл.Л., 10 Гр	–	–	1	0,72	М., 10 Гр	–	–	1	0,62
Пл.Л., 15 Гр	–	–	–	1	М., 15 Гр	–	–	–	1

них дозах у різних генотипів. У сорту Перлина лісостепу спорідненості спектрів ампліконів при 5 та 10 Гр змінюється зниженням спорідненості між спектрами ампліконів при опроміненні в 10 та 15 Гр. В той час як спорідненість між спектрами ампліконів між послідовними дозами у мутанта поступово знижується.

Подібним чином ведуть себе індекси спорідненості між контрольними та опроміненними варіантами при проведенні RAPD-ПЛР з ДНК обох генотипів (табл. 5). Найбільше зниження спорідненості з контрольним варіантом спостерігається при дозі опромінення 5 Гр з незначним збільшенням цього показника при дозі опромінення 10 та 15 Гр. Для обох генотипів спостерігається також зростання спорідненості між спектрами ампліконів варіантів з опроміненням між двома послідовними дозами.

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

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

Зміни вмісту фенолів та флавоноїдів показують відмінності у дозових залежностях цих характеристик у сорту Перлини лісостепу та

його мутанту. Дозова залежність питомого вмісту флавоноїдів у першому випадку (рис. 4 а) має максимум, що відповідає дозі 10 Гр, у другому – 5 Гр. Значиме підвищення питомого вмісту фенолів спостерігається тільки у мутанту Перлини Лісостепу при дозі 5 Гр (рис. 4, б). Спостерігається зниження вмісту обох антиоксидантів при дозі 15 Гр.

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

Таким чином, всі три використані показники свідчать про нелінійну і немонотонну залежність ефектів опромінення від дози, що є характерною для царини малих доз. Найбільш поширена точка зору пов'язує це із суперпозицією дозових залежностей декількох індукованих опроміненням процесів (Burlakova, 1999; Kolomiytseva, 2003; Tubiana, Aurengo, Averbek, 2006). По-перше, це безпосередньо ураження структур клітини і його розвиток, продовження утворення продуктів взаємодії ДНК з АФК. По-друге, індукцією/стимуляцією різноманітних репаративних процесів, кожний з яких має свій поріг включення і дозову залежність. По-третє, стимуляцією антиоксидантного захисту за рахунок ферментативних і не ферментативних антиоксидантів. Четвертий механізм, що потенційно може призводити до зниження появи атипичних ампліконів, полягає в стимуляції процесів у фазах «перевірки» («check point»), які блокують перехід до поділу клітин із значними порушеннями ДНК.

Таблиця 5. Залежність від дози індексу подібності Жаккарда спектрів ампліконів кожного з генотипів при RAPD-ПЛР-аналізі ДНК

RAPD-ПЛР, варіанти	Пл.Л., К	Пл.Л., 5 Гр	Пл.Л., 10 Гр	Пл.Л., 15 Гр	RAPD-ПЛР, варіанти	М., К	М., 5 Гр	М., 10 Гр	М., 15 Гр
Пл.Л*., К	1	0,62	0,68	0,67	М.,К	1	0,70	0,71	0,77
Пл.Л.,5 Гр		1	0,82	0,73	М.,5 Гр		1	0,71	0,83
Пл.Л., 10 Гр			1	0,89	М.,10 Гр			1	0,78
Пл.Л., 15 Гр				1	М., 15 Гр				1

Примітка. Умовні позначення як у таблицях 3 та 4.

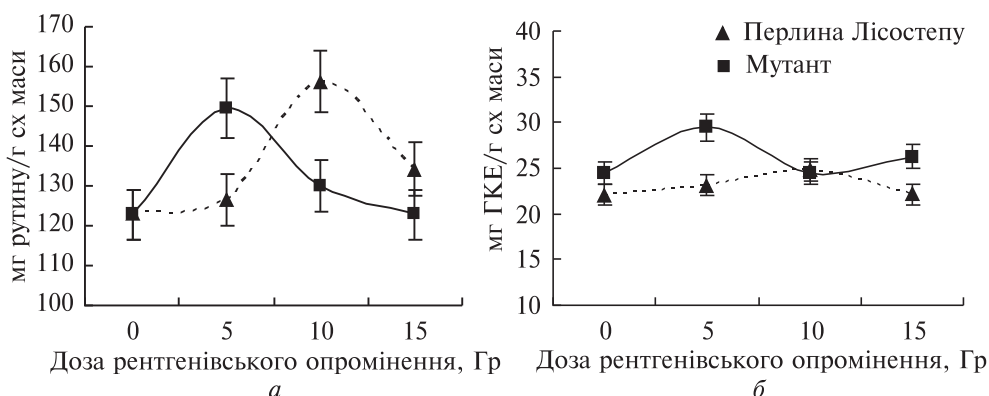


Рис. 4. Дозова залежність вмісту флавоноїдів (а) фенолів (б) у суцвіттях ромашки лікарської сорту Перлина лісостепу та мутанта сорту Перлина лісостепу. Довірчий інтервал, $P = 0,95$

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

Розглянемо гіпотетичну інтерактивну картину радіаційно-індукованих процесів, виходячи з одержаних даних. Найнижчі значення коефіцієнтів спорідненості між контрольними та опроміненими варіантами при дозах 5–10 Гр свідчать про найвищий рівень ушкодження ДНК та про низьку ефективність відновлювальних процесів для царини малих доз, що вже доведено рядом досліджень (огляд, Gaziev, 2011). Саме за дії цих «малих» для досліджених генотипів та нижчих за порогові для включення репаративних процесів доз і спостерігається найвищий питомий вміст антиоксидантів. Це узгоджується з даними інших авторів (Tomimaga et al, 2004; Szumiel, 2015) щодо зростання рівня АФК за умов геномної нестабільності. Відомо про поліфункціональність активних форм кисню, включаючи боротьбу з «чужою» ДНК (Sies, Jones, 2020), що за принципом зворотнього зв'язку має стимулювати підвищення рівня антиоксидантів. В цю загальну схему вкладається зниження питомого вмісту антиоксидантів одночасно з підвищенням спорідненості спектрів ампліконів опромінених і контрольних варіантів при дозі опромінення 15 Гр, що свідчить про початок відновлення нормальної структури ДНК за рахунок індукції/стимуляції репаративних процесів.

Додаткову інформацію про взаємодію ураження ДНК, репарації ушкоджень та антиоксидантного захисту надає порівняння відгуку на передпосівне опромінення обох генотипів, що крім виявлення загальних тенденцій, проявляє певні відмінності. Так, на відміну від сорту Перлини лісостепу, у її мутанту не спостерігається підвищення з дозою опромінення спорідненості спектрів ампліконів при ISSR-ПЛР аналізі (табл. 4), а максимум у нагромадженні обох антиоксидантів відповідає дозі опромінення не 10, а 5 Гр. Співставлення цих двох фактів дозволяє припустити існування певних відмінностей у проходженні репаративних процесів у цих двох генотипах. Існування поліморфізму за ISSR та RAPD послідовностями обумовлює і певні відмінності у компактизації хроматину, що, за сучасними уявленнями (Teif, Shkrobkov, Egorova, 2010; Teif, 2015), впливає на доступність ДНК транскрипційним та репараційним факторам, утворенню так званих радіаційно – індукованих фокусів (radiation induced foci) (Gaziev, 2011), що забезпечують ефективність відновлення ДНК.

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

якій відбувається стимуляція напрацювання фармацевтично значимої продукції. Ці дані є початком переходу від суто емпіричного підбору ефективних доз для стимуляції напрацювання тих чи інших метаболітів до виявлення механізмів, що обумовлюють метаболічні перебудови.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфліктів інтересів.

Дотримання етичних стандартів. Автори підтверджують відсутність конфлікту інтересів та порушень договору про нерозголошення. Ця стаття не містить жодних досліджень, виконаних на тваринах або людях.

Фінансування. Дослідження проводилося в рамках фінансування НДР НАН України за темою 1230/3 «Вивчення впливу стресових факторів біотичного і абіотичного походження на накопичення вторинних метаболітів та рекомбінантних сполук в генетично змінених та нативних рослинних системах».

RELATIONSHIP OF STIMULATION OF PLANT ANTIOXIDANT PROTECTION AND SIGNS OF GENOME INSTABILITY

D.O. Sokolova, T.V. Halych, V.V. Zhuk,
O.P. Kravets, M.V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
National Academy of Sciences of Ukraine,
st. Akademika Zabolotnogo, 148, Kyiv, 03143 Ukraine
E-mail: dasokolova88@gmail.com, vzhukv@gmail.com,
sdgfbdb@gmail.com, kaplibra@gmail.com,
nkuchuk@icbge.org.ua

The relationship between stimulation of low-molecular-weight antioxidant accumulation in pharmaceutical plant raw material (inflorescences) and the markers of radiation-induced genome instability at the stage of plant flowering under X-ray exposure were investigated. The study of rearrangements of DNA primary structure under different dose exposure was carried out by PCR using eight ISSR and ten RAPD primers. Dose –dependent changes in amplicon spectra during ISSR-RAPD –PCR were analyzed using the Jacquard similarity index. It was found that the largest rearrangements of the primary DNA structure of both genotypes, which was indicated as a decrease in similarity with the control spectra of amplicon, was observed under exposure with doses 5–10 Gray. There was a tendency to approach this indicator to the control one under 15 Gray dose, which mint increased efficiency of reparative processes. The

relationship between the polymorphism of the primary structure of DNA by ISSR-RAPD-sequences through different genotypes and the nature of its rearrangement under radiation exposure was shown. Comparison of the results with no monotonic dose curves of the specific flavonoids' and phenols' content allowed us to conclude that the stimulation of antioxidant protection was shown under doses corresponding to low efficiency of repair processes and, accordingly reduced it under genetic material repair. The interpretation of the identified phenomenon is based on the known connection between the effects of genomic instability and the increase in the level of reactive oxygen species and the general principles of antioxidant protection. The significance of the obtained results through the development of the scientific basis for the implementation of small radiation exposure doses in biotechnology, particularly in pharmacology is discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Aguilera A, Garcia-Muse T. (2013) Causes of Genome Instability *Ann Rev Gen* 47:1–32 doi: 10.1146/annurev-genet-111212-133232
- Alothman M, Bhat R, Karim AA. (2009) Effects of radiation processing on phytochemicals and antioxidants in plant produce *Trends Food Sci Technol* 20(5):201–212. doi: 10.1016/j.tifs.2009.02.003
- Aypar U, Morgan WF, Baulch JE. (2010) Radiation-induced genomic instability: Are epigenetic mechanisms the missing link? *Int J Radiat Biol* 87(2):179–91. doi: 10.3109/09553002.2010.522686
- Clark DJ. (2010) Nucleosome positioning, nucleosome spacing and the nucleosomecode *J Biomol Struct Dyn* 27:781–793
- Barlow JH et al. (2013) Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability *Cell* 152:620–632. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.006
- Burlakova EB et al. (1999) Features of the biological effect of small doses of radiation *Rad Biol Radioecol* 39:26
- Croft KD. (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids *Ann New York Acad Sci* 854(1):435. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x>
- Durkin SG, Glover TW. (2007) Chromosome Fragile Sites. *Chromosome Fragile Sites Ann Rev Gen* 41:169–192 doi:10.1146/annurev.genet.41.042007.165900
- Gaziev AI. (2011) Low efficiency of repair of critical DNA damage caused by low doses of radiation *Rad Biol Radioecol* 5:512–529
- Ellegren H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution *Nat Rev Genet* 5(6):435–45. doi: 10.1038/nrg1348

- Eliseeva II, Rukavishnikov VO. (1977) Grouping, correlation, pattern recognition: (statistical methods of classification and measurement of relationships). M.: Statistics: 143.
- Halliwell B. (1999) Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) *Free Rad Res* 31:261–72. doi: 10.1080/10715769900300841
- Hemleben V, Beridze TG, Bakhman L. (2003) Satellite DNA *Uspehi Biol Khimii* 43:267–306
- IAEA. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. Technical reports. Series N 405 (2001). International Atomic Energy Agency, Vienna, 108 p. STI/DOC/010/40592-0-102101-1
- Kim J-H, Ryu TH, Lee SS et al. (2019) Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: An overview of DNA damage signalling and repair mechanisms in plants *Plant Sci* 278:44–53. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.10.013
- Khattak K, Simpson D. (2008) Effect of gamma irradiation on the extraction yield, total phenolic content and free radical-scavenging activity of *Nigella sativa* seed *Food chemistry* 110(4):967–972. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.003
- Kolomiytseva IB. (2003) Non-monotonicity of the dose-effect relationship in the region of low doses of ionizing radiation *Rad Biol Radioecol* 43:179
- Kravets AP, Sokolova D. (2020) Epigenetic factors of individual radiosensitivity and adaptive capacity. *Inter J Rad Biol* 96:999–1009. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1767819>
- Kumari S, Rastogi RP, Singh KL. (2008) DNA damage: Detection strategies *EXCLI J* 7:44–62. ISSN 1611-2156
- Lakin GF. (1990) *Biometrics*. Higher School: 352. – ISBN 5-06-000471- 6. OCR
- Lopez-Flores I, Garrido-Ramos MA. (2012) The repetitive DNA content of eukaryotic genomes *Genom Dynam* 7:1–28. doi: 10.1159/000337118
- Moghaddam S et al. (2011) Effects of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella asiatica* *Molecules* 16(6): 4994–5007. doi: 10.3390/molecules16064994
- Pinto M, Prise KM, Michael BD. (2005) Evidence for complexity at the nanometer scale of radiation-induced DNA DSBs as a determinant of rejoining kinetics *Rad Res* 164(1):73–85. doi: 10.1667/rr3394
- Poyraz I. (2016) Comparison of ITS, RAPD and ISSR from DNA-based genetic diversity techniques *Comptes Rendus Biol* 339(5–6):171–178
- Rinne De Bont, Nik van Larebeke. (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data *Mutagen* 19(3):169–185. doi: 10.1093/mutage/geh025. doi: 10.1093/mutage/geh025
- Sies H, Jones DP. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Sokolova DA, Vengzhen GS, Kravets AP. (2013) An Analysis of the Correlation between the Changes in Satellite DNA Methylation Patterns and Plant Cell Responses to the Stress *CellBio* 2:163–171 doi: 10.4236/cellbio.2013.23018
- Sokolova D, Kravets A, Zhuk V, Sakada V, Gluschenko L, Kuchuk M. (2021) Productivity of medicinal raw materials by different genotypes of *Matricaria Chamomila L.* is affected with pre-sowing radiation exposure of seeds. *Inter J Second Metabol* 8(2):127–135. <https://doi.org/10.21448/ijsm.889817>
- Sumira J, Parween T, Siddiqi TO. (2012) Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products *Environmental Reviews* 20(1):17–39. <https://doi.org/10.1139/a11-021>
- Szumiel I. (2015) Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: the pivotal role of mitochondria *Int J Radiat Biol* 91(1):1–12. doi: 10.3109/09553002.2014.934929
- Teif VB, Shkrobkov AV, Egorova VP et al. (2012) Nucleosomes in generegulation: theoretical approach *Mol Biol* 46(6):1–11. doi: 10.1134/S002689331106015X
- Teif VB. (2015) Nucleosome positioning: resources and tools online *Briefings in bioinformatics*, 17:745–757. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv086>
- Tominaga H, Kodama S, Matsuda N et al. (2004) Involvement of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Induction of Genetic Instability by Radiation *J Radiat Res* 45(2):181–188. doi: 10.1269/jrr.45.181
- Tubiana M, Aurengo A, Averbek D. (2006) Recent reports on the effect of low doses of ionizing radiation and its dose-effect relationship *Rad Environ Biophys*. 44:245–251. doi: 10.1007/s00411-006-0032-9
- Winkel-Shirley B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress *Curr Opin Plant Biol* 5:218–223. doi: 10.1016/s1369-5266(02)00256-x
- Zhuk V, Sokolova D, Kravets A et al. (2021) Efficiency of pre-sowing seeds by UV-C and X-ray exposure on the accumulation of antioxidants in inflorescence of plants of *Matricaria chamomilla L.* genotypes *Inter J Sec Metabol* 8(3):186–194. <https://doi.org/10.21448/ijsm.889860>

Надійшла в редакцію 06.07.21
Після доопрацювання 31.05.22
Прийнята до друку 18.09.22