

СИСТЕМНА БІОЛОГІЯ ЯК ЕФЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ МАЛИХ ДОЗ ХРОНІЧНОГО ОПРОМІНЕННЯ НА РОСЛИНИ В ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ ЗОНІ

М. ДАНЧЕНКО¹, К. КЛУБЦОВА², М.В. КРИВОХИЖА³,
В.В. БЕРЕЖНА³, В.І. САКАДА³, М. ХАЙДУХ², Н.М. РАШИДОВ³

¹ Біомедичний дослідницький центр, Словацька академія наук, Братислава

² Інститут генетики та біотехнології рослин, Словацька академія наук, Нітра

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: nrashydov@yahoo.com

Обговорюються різні методологічні підходи для дослідження трансгенераційних змін метаболічних шляхів в насінні сої та льону в процесі адаптації до хронічного опромінення в Чорнобильській зоні відчуження. Поєднання традиційних та новітніх методів, таких як геноміка, протеоміка, цитогенетичні методи, мутагенез, дає змогу проаналізувати системну відповідь організму та виявити приховані ефекти хронічного опромінення у рослин Чорнобильської зони. Особливо ефективні підходи протеоміки, які варіюють від ідентифікації синтезу і фолдингу окремих білків до характеристики посттрансляційних модифікацій, профілів експресії, синтезу протеїнів в період заповнення насіння після цвітіння до повної зрілості або білкових взаємодій при зростанні і розвитку рослин під постійним впливом стресових факторів. Застосування протеоміки відкриває нові горизонти в розумінні прихованих механізмів дії малих доз хронічного опромінення на живі клітини та дає можливість візуалізувати метаболічні зміни незалежно від їх транскрипційної, трансляційної або епігенетичної природи.

Ключові слова: Чорнобильська АЕС, хронічне опромінення, радіонукліди, протеоміка, функціональна геноміка, адаптація рослин.

Вступ

Вибух одного з чотирьох реакторів Чорнобильської атомної електростанції (ЧАЕС) 26 квітня 1986 р. спричинив найбільшу екологічну ядерну катастрофу в історії людства. Аварія вивільнила в атмосферу величезну кількість радіоактивних матеріалів, котрі забруднили значну частину Європи. Можна сказати, що руйнівний потенціал вибуху в Чорнобилі дорівнював дії близько 100 атомних бомб, які були скинуті на японські міста Хіросіма й Нагасакі під час Другої світової війни. Експерти

вважають, що 20 % ядерного палива зруйнованого реактора (близько 40 тонн) вступило в реакцію під час аварії. Таким чином, згаслий зруйнований реактор і зараз залишається дуже небезпечним місцем [1]. Аварія на ЧАЕС мала глобальні екологічні наслідки, оскільки великі площі сільськогосподарських угідь були забруднені радіонуклідами. Незважаючи на факт, що більшість із вивільнених радіонуклідів розпалися за кілька днів, навіть тепер, через 30 років після аварії, в навколишньому середовищі залишаються довгоживучі ізотопи, такі як ¹³⁷Cs та ⁹⁰Sr [2]. За три декади після аварії радіаційна обстановка в зоні відчуження стабілізувалася, і гостре опромінення із високою потужністю дози було змінено постійним хронічним опроміненням із низькою потужністю дози [3, 4], тим не менш радіоактивне забруднення великих територій залишається істотним.

Радіонукліди відрізняються за типом і енергією радіоактивного випромінювання. Незважаючи на те, що існують сотні радіонуклідів, абсолютна більшість із них є дуже рідкісними. Частіше зустрічаються америцій-241, що при розпаді випромінює α - і γ -промені, цезій-137 – β і γ , кобальт-60 – β і γ , йод-129 і йод-131 – β і γ , плутоній (кілька ізотопів) – α , β і γ , радій (численні ізотопи) – α і γ , радон (численні ізотопи) – α , стронцій-90 – β , технецій-99 – β і γ , тритій – β , торій (кілька ізотопів) – α і γ , уран (численні ізотопи) – α , n і γ .

Нещодавно були проведені масштабні проекти Європейського Союзу, такі як EURANOS чи FARMING, з метою розробки найбільш ефективної стратегії майбутнього використання забруднених земель [5].

Наша дослідницька група використовує район Чорнобиля як відкриту польову лабораторію для спостереження змін протеому в насінні

© М.М. ДАНЧЕНКО, К. КЛУБЦОВА,
М.В. КРИВОХИЖА, В.В. БЕРЕЖНА, В.І. САКАДА,
М. ХАЙДУХ, Н.М. РАШИДОВ, 2016

сої та льону під час адаптації до радіоактивного середовища. Для цього використовуються різні методологічні підходи, які включають в себе інтегральні біологічні методи, такі як проростання насіння, морфометричні показники росту, габітус рослини, аналіз активності ферментів та окремих метаболічних шляхів [6], та тонкі методи, такі як геноміка, протеоміка, цитогенетичні методи, мутації ДНК, мікроаггау-аналіз ДНК та ін. Загальні методи дають змогу проаналізувати інтегральні показники. Вивчення окремих метаболічних шляхів не завжди дає змогу адекватно та всебічно охарактеризувати відповідь живого організму, в той час як тонкі методи аналізу дають можливість виявити дію стресового фактора у внутрішній системі життєдіяльності клітини. Але за допомогою комбінації загальних та тонких методів можна всебічно проаналізувати системну відповідь організму та виявити приховані ефекти хронічного опромінення в Чорнобильській зоні відчуження, особливо трансгенераційні зміни в поколіннях.

Важливим аспектом ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС є рекультивация забруднених ділянок. Роботи з очищення ґрунтів розпочалися відразу після аварії на ЧАЕС і включали миття будівель і доріг спеціальним дезактиваційним розчином; застосування і подальше видалення полімерної плівки, здатної поглинати радіо-забруднювачі; ущільнення поверхонь асфальтом; додавання чистого ґрунту на забруднених ділянках, таким чином досягаючи ефекту розведення [7]. Крім того, протягом 30 років після аварії відбувались і природні процеси ремедіації в Чорнобильській зоні. Власне природна ремедіація відбувається за рахунок розпаду радіоізоотопів та їх міграції в глибші шари ґрунту. Впродовж останніх трьох десятиліть рівень радіоактивності в сільськогосподарській продукції значно знизився в основному за рахунок розпаду ізоотопів та застосування різних стратегій ремедіації в постраждалих районах України, Росії та Білорусії [8]. Проте на довгі роки біота прилеглих територій буде продовжувати отримувати значні дози небезпечних променів.

Поглинання радіонуклідів рослинами

Радіонукліди спричиняють тривалий радіологічний вплив на біоту, бо мають довгий пе-

ріод піврозпаду та високу біологічну доступність [9].

Дослідження конкурентних взаємодій на ізольованих носіях калію чудово узгоджуються із цілісною картиною поглинання цезію при різних концентраціях. Мінеральне голодування може індукувати експресію носіїв, що мають низький ступінь селективності одновалентних катіонів, а це відповідно пришвидшує поглинання радіонукліду. Для визначення ступеня накопичення радіонуклідів використовують показник «коефіцієнт накопичення»: співвідношення радіоактивності елемента в рослині до радіоактивності в розчині чи ґрунті.

Міжвидова різниця за коефіцієнтом накопичення радіоцезію може перевищувати 10 крат. Загальним висновком є те, що представники родин *Amarantaceae*, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae* виявляють найвищий ступінь накопичення, але генетичні відмінності аграрних культур дуже незначні [10]. Коефіцієнт накопичення радіоцезію особливо залежить від структури ґрунту та балансу калію. Зазвичай значення становить 0,001–1 для мінеральних глинистих ґрунтів, але може досягати 28 для органічних піщаних. Цезій має високу мобільність в рослині, проте вміст при перерахунку на суху вагу завжди більший у коренях, хоча для різних рослин характерні різні закономірності розподілу по тканинах та органах. Калієві канали, ідентифіковані в клітинах листя рослин, неефективно транспортують Cs. Швидкість фітоекстракції елемента можна прискорити застосуванням добавок, наприклад доведено, що додавання NH_4NO_3 чи $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ призводить до зростання акумулювання радіоцезію. Транспортери K мають низький ступінь дискримінації Cs, а канали – високий [11]. Поглинання рослинами є головним шляхом міграції радіоцезію з ґрунту до людської дієти. Інформація щодо накопичення ізоотопів дає змогу розрахувати поглинену дозу рослини, яка складає не більше 10 % від дози, що була отримана при хронічному опроміненні. При цьому понад 90 % хронічного опромінення відбувається за рахунок суміші названих радіонуклідів. Крім того, в Чорнобильській зоні відчуження є ще один дозоутворюючий компонент – випадіння радіонуклідів на поверхню рослин, що часто включає в себе трансуранові елементи, які ви-

промінюють α -частини та «гарячі частини» мікро- та нанорозміру [12]. Це явище не можна відтворити в лабораторних умовах.

Первинний механізм дії радіації на біоту

Радіаційне опромінення викликає пошкодження макромолекул, які входять до складу субклітинних комплексів та органел живих клітин, через що відповідна реакція має бути множинною. У цьому відношенні перевагу має використання молекулярних методів на основі системного підходу.

Іонізуюче випромінювання спричиняє порушення роботи макромолекул та виникнення вільних радикалів, які в свою чергу ініціюють окисний вибух. Домінуючим ефектом іонізуючої радіації в клітинах є утворення вільних радикалів, джерелом яких виступає вода або кисень. Первинне пошкодження часто призводить до мутацій або навіть загибелі клітин. Ефекти опромінення можуть перейти на рівень цілого організму, в результаті чого спостерігається зниження темпів росту, морфологічні аномалії або порушення онтогенетичної програми розвитку. Крім того, при низьких дозах виявлено ряд незрозумілих нелінійних явищ, наприклад нестабільність геному або вибіркова експресія генів. В довгостроковій перспективі іонізуюче випромінювання впливає на генетичну структуру популяцій, часто підвищуючи генетичну варіабельність [13]. Клітини реагують на іонізуюче випромінювання через складну мережу взаємопов'язаних сигнальних каскадів, які регулюють різні функції, тому постгеномні методи мають величезний потенціал для скринінгу усєї метаболічної мережі. Реакція біоти на Чорнобильське середовище є складною функцією між дозою опромінення та індивідуальною чутливістю різних видів [14]. Пробіг частинок у речовині зростає із збільшенням енергії. Значна частина біологічного ураження обумовлена високоагресивним -OH радикалом та реактивними формами кисню (РФК).

Ключовими ензимами, що задіяні у знешкодженні вільних радикалів, є SOD, CAT, APX.

Різні типи опромінення мають різну біологічну ефективність. Власне щільноіонізуюче опромінення (наприклад α -частинки) спричиняє істотно більше ураження при інших рівних умовах, ніж рідкоіонізуюче [15]. Найнебез-

печнішими радіонуклідами зони відчуження є ^{90}Sr , ^{137}Cs та ізомери Pu . З часом в навколишньому середовищі зростає кількість та вплив ^{241}Am , бо при α -розпаді випромінюється радіація з високою відносною біологічною ефективністю.

Основним постулатом відповіді на опромінення є те, що будь-яка взаємодія радіації з ДНК призводить до пошкодження. Якщо пошкодження не виправлене або невірно виправлене, це може ініціювати злякисну трансформацію або привести до загибелі клітини. Мутації генів зазвичай викликають зміни їх експресії, а часто і повне зникнення відповідних білків або принаймні зміни їх властивостей. Таким чином може змінитись біохімічний баланс клітини і контроль клітинної сигналізації, а також порушитись проліферація і диференціювання. Як наслідок, замість перевірки ДНК і апоптозу мутантні клітини можуть перейти до клонального розмноження.

Деякі немутаційні (епігенетичні) зміни чи пошкодження можуть бути залучені або навіть сприяти згаданим змінам. У деяких випадках геном може втратити стабільність, що дозволить у подальшому накопичувати мутації.

В літературі описано значну гетерогенність досліджень мутацій як функції опромінення, тим не менш у більшості робіт чітко прослідковується підвищення мутаційного фону або цитогенетичні аномалії. Наслідки підвищення частоти мутацій для організму в цілому залишаються погано зрозумілими [16].

Пошкодження ДНК в ядрі є основною ініціюючою подією, яка викликає ураження органів і тканин організму. Дволанцюгові розриви ДНК найбільш ймовірно здатні заподіяти критичну шкоду, тобто приводять до загибелі, елімінації або повного виходу з клітинних потоків гомеостазу. Одиночні треки випромінювання мають потенціал спричинити дволанцюгові розриви і за відсутності ефективної репарації можуть призвести до тривалого ушкодження навіть при найнижчих дозах.

Загальна та специфічна реакція на стреси у рослин

Дія стресових факторів призводить до появи трансгенераційної адаптивної пластичності як для культурних, так і для дикорослих видів,

викликає відповідну генетичну реакцію, яка включає в себе генетичні мутації та епігенетичні зміни геному. Цей процес в результаті спричиняє зниження продуктивності та врожайності рослин.

У зв'язку з цим іонізуюче випромінювання можна і варто розглядати як класичний стресовий чинник. Рослини еволюційно мають змогу пристосовуватись до різноманітних умов природного середовища. Інтенсифікація антропогенного тиску чи перенесення живих створінь до іншого екоотопу призводить до появи градієнта селективних стресових факторів. Стрес — це реакція особини на стимул, що виходить за межі оптимуму для виду на даній фазі розвитку. Принципово різними є реакції на несприятливі впливи, різні за тривалістю чи інтенсивністю. Стійкість до абіотичного стресу є комплексною ознакою, тож незважаючи на ідентифікацію численних задіяних генів, у нашому розумінні цієї властивості залишаються помітні білі плями. Сигнальні шляхи відіграють головну роль у процесах розвитку, таких як проліферація клітин чи фізіологія гормонів. Після первинного сприйняття сигнал спрямовується на кілька каскадів трансдукції, що ампліфікують його та збуджують паралельні шляхи. Шляхи передачі внутрішньоклітинних сигналів є значною мірою універсальними та консервативними. Вони здатні регулювати більшість фізіологічних та біохімічних процесів. Окрім того, знайдено кореляцію між закономірностями змін експресії генів за дії стресу та при старінні у рослин рису [17].

У рослинах, що є геномними моделями, присутня велика кількість генів, що кодують складові каскадів мітоген-активованих протеїнкіназ (МАРК), які слугують висококонсервативними сигнальними регуляторами. Специфіка роботи різних каскадів у одній клітині забезпечується доменами взаємодії та білками-адапторами. МАРК в усіх рослинах мають ТЕУ- чи ТДУ-мотиви фосфорилування в активних центрах. Для більшості МАРК знайдено функціональні докази їхньої ролі. МАРК-шляхи можуть працювати в різних комбінаціях та мати відмінні функції залежно від біологічного контексту. Наприклад, каскад AtANP1 запускається у відповідь на появу сигнального протеїну окисного стресу; OsMEK1 — на холодний стрес,

MsSAMK — на вплив важких металів, NtSIPK — на осмотичний стрес, LeMPK2 — на UVB-опромінення. МАРК зокрема задіяні у передачі сигналу окисного стресу, але в більшості випадків діють як початкові ланки ланцюгу. Ідентифіковано кілька комплексних МАРК-модулів, які іноді перекриваються та відіграють головну роль у трансдукції сигналів біотичних та абіотичних стресів. Наприклад, модулі МРК4 і МРК6 арабідопсису активуються холодом, засоленням, посухою та пораненням [18].

Кінцевою метою системної біології є поєднання геному (послідовність генів у ДНК), та феному (сукупність фенотипових проявів). Встановлено, що менше 10 % мічених генів арабідопсису очікувано утворюють видимий фенотип. Велику частину нашого сучасного розуміння рослинних мереж відповіді на стрес отримано від функціонального аналізу генів арабідопсису у трансгенах. Більшість таких експериментів мали на меті розшифрувати функції генів, що кодують кінцеві елементи-ефектори: антипортери, білки теплового шоку, супероксид дисмутази, а не початкові компоненти-регулятори: транскрипційні фактори, кінази. Наприклад, акумуляція трегалози рослинами рису спричиняла вищу стійкість до різних абіотичних стресів. Дослідження протеому апопласту листя тютюну ідентифікувало 20 білків зміненої транскрипції внаслідок сольового стресу. Наприклад, активність хітинази зростала, а білки — транспортери ліпідів експресувались *de novo* [19].

Цікавим питанням є співвідношення специфічних і неспецифічних стресових реакцій. Глобальний профіль експресії відповіді рослини на несприятливі умови прямо показав, що незважаючи на можливі перекриття різних реакцій (холод, засолення, зневоднення, тепло, надлишкове освітлення, механічне ураження), виявляється низка генів, унікальних для кожної відповіді. Відомо, що реактивні форми кисню (РФК) відіграють центральну роль у біотичному та абіотичному стресах, але встановлено, що різні гени РФК-мережі мають унікальні закономірності експресії чи активності за різних стресових факторів. У регулюванні рівня РФК арабідопсису беруть участь 152 гени. Локуси кількісних ознак, що асоційовані із солестійкістю на фазі проростання та ранніх фазах

росту у ячменю і тютюну, не є однаковими. Стійкість до стресу є комплексною ознакою. Для виживання будь-який організм повинен розвинути механізми стійкості чи уникнення, втечі або елімінації негативного впливу фактора. Дані повногеномних аналізів стійкості до стресу допоможуть висвітлити мережу реакцій відповіді на стрес та ймовірно скерують цільові зміни для підвищення продуктивності [20]. Менше відомо про ефекти стресу на рівні цілої екосистеми. Можна навести чимало прикладів індукованих стресом змін спадкового апарату. Зокрема, інфікування грибом *Peronospora parasitica* втричі підвищило геномні рекомбінації. Подібний ефект спостерігався при хімічній активації захисних механізмів рослин арабідопсису. Підвищення генетичної гнучкості полегшить еволюційну адаптацію популяцій до стресових умов середовища [21]. Значні хромосомні перебудови завжди спостерігаються у геномах, трансформованих Т-ДНК інсерціями. Загадковий і вражаючий приклад індукованих стресом перебудов геному виявлено у льону: деякі сорти, експоновані у різних умовах середовища, утворюють нащадків із різними та стабільними спадковими ознаками. Схоже, що ці варіанти мають численні епігенетичні зміни у структурі ДНК. Індукована стресом транскрипція генів зазвичай досягається через сигнальні шляхи. Такі відповіді вимагають присутності сигнальних лігандів та участі сигнальних каскадів, які закінчуються транскрипційними факторами, що здатні коригувати відповідь. Звичайною відповіддю на стрес може бути послаблення епігенетичної регуляції, що призводить до активності репресованих послідовностей. Перебудова структури хроматину через епігенетичні зміни може викликати широкомасштабні геномні ефекти та тісно корелює із транскрипційною активністю генів. Зокрема припускається ключова роль РНК інтерференції у цих змінах. Наслідком абіотичного стресу можуть бути не лише запрограмовані фізіологічні відповіді, але також загальногеномні зміни, наприклад, активація транспозонів, транспозиції і структурні зміни геному. Схоже, що активація транспозицій є стратегією реакції попадання/промаху на несприятливий вплив. Має місце також модель індукованого стресом геномного шоку, згідно

з якою епігенетичні шляхи є одночасно як цілями запрограмованих реакцій, так і наслідками уражень. Результатом є експресія послідовностей, що за нормальних умов мовчать, в той же час це веде до активації системи сайленсингу, оскільки клітина намагається відновити регуляторний баланс [22].

Феномен адаптації рослин

Феномен адаптації рослин до іонізуючого випромінювання, тобто набуття підвищеної стійкості чи, навпаки, радіосенсибілізації, залишається контраверсійним, особливо у природних умовах. Незважаючи на масштаби аварії на ЧАЕС, місцева флора продовжує рости і розмножуватися в забруднених радіонуклідами ґрунтах. Хоча пройшло вже понад 30 років досліджень впливу наслідків іонізуючого випромінювання на рослини, триваючий розвиток рослинних угруповань в районі чорнобильського лиха не передбачався. Чіткі механізми виживання рослин в забрудненому радіонуклідами середовищі залишаються невідновленими. Генетичне ураження ДНК може виправлятися репараційними системами. В літературі описано зниження активності систем репарації в пилку. З часом ефективність систем репарації ДНК повернулася до норми, але на ділянках із істотним α -фоном залишилось інгібування цих систем. Дані свідчать, що на γ -та β -забруднених місцях відбувається адаптація, але на α -радіоактивних ділянках вона відсутня [23]. Рослини є нерухомими і на відміну від тварин не можуть втекти із забрудненого навколишнього середовища, що дозволяє уникнути несприятливого впливу. Тому логічно, що для виживання вони повинні адаптуватися до складних умов. В іншій роботі дослідники стимулювали додатковим опроміненням появу хромосомних аберацій в апікальній меристемі кореня [24]. Для більшості тестованих видів зібрані із забруднених ділянок рослини виявилися більш чутливими порівняно із контролем. Отже, можна зробити висновок про відсутність адаптації та потенційно шкідливих мутацій за дії екстремального фактора.

Спосіб запилення рослин відіграє важливу роль в процесі адаптації. Самозапильні та перекреснозапильні рослини мають різний рівень пристосування до опромінення впродовж по-

колінь. Показано, що самозапильні рослини мають більшу кількість пошкоджень молекул ДНК, ніж перехреснозапильні. Це явище пов'язано з надходженням нового генетичного матеріалу з популяцій, які не потрапили під дію радіації і відповідно не несуть пошкодження ДНК. Надходження нових генів дає змогу рослинам більш ефективно відновлюватися та адаптуватися до дії стресових факторів [25, 26].

Організми, що зростали в дикій природі навколо Чорнобиля, після вибуху піддавалися впливу високих доз іонізуючого випромінювання. Було проведено аналіз ефективності репарації розривів ДНК через три роки після аварії. Власне підвищення кількості розривів ДНК після тест-дозы виявлено у α -опромінених рослин, але цей ефект був відсутній у β -опромінених. Змін в інтенсивності репарації не зафіксовано [27].

Лісові екосистеми є найчутливішими до дії радіації, проте достовірне підвищення частоти мутацій навіть у найзабрудненіших місцях відсутнє. Генетичне різноманіття рудої полівки забрудненого Чорнобилю (модель токсичного впливу) достовірно не відрізняється від контролю. Генетичні дані цих популяцій не підтверджують гіпотезу, що мутації в забруднених регіонах є прямим наслідком аварії, тобто робиться висновок, що мутації є власне наслідком природної географічної варіабельності [28]. Наявність чи відсутність радіоадаптації важко спрогнозувати. Насіння опромінених популяцій може мати підвищену чутливість до подальшого опромінення. Хронічний вплив радіації може грати роль екологічного фактора, змінюючи генетичну структуру природних популяцій. Інші дослідники стверджують, що рослини, які ростуть у Чорнобилі, проявляють ознаки адаптації. Ця неочікувана здатність рослин адаптуватися до забрудненого оточуючого середовища не дуже добре зрозуміла [25]. У доповіді експертів Організації об'єднаних націй щодо Чорнобиля також було формально заявлено, що екосистема відновилася до природного стану. Адаптація проявлялась у збільшенні варіабельності при додатковому опроміненні. Цікаво, що як наслідок зросло генетичне різноманіття. Навіть у Великобританії залишаються екологічні проблеми, у тому числі у сільськогосподарських культур. Радіоцезій

імобілізується глинистими частинками у ґрунтах. Проте на багатих органікою ґрунтах характерна висока мобільність елемента. Спостерігається легкий перехід цезію через харчовий ланцюг в органи овець. Саме тому накладено заборону пасовищного використання мокрих і кислих ґрунтів. Необхідно розширити фундаментальне розуміння біогеохімічного шляху різних екосистем для комплексного прогнозування впливу забруднення [29].

Віддалені молекулярно-біохімічні механізми реакції біоти на іонізуючу радіацію

Протягом останніх 30 років проведено численні дослідження з метою виявлення наслідків впливу забрудненого радіонуклідами навколишнього середовища на флору та фауну району Чорнобиля. Опромінення викличе істотні перебудови внутрішніх компартментів життєдіяльності клітин, що реалізується зміною експресії генів, синтезу білків й активності ензимів.

Важливо вивчати тренди і ефективність селекції біоти у природних умовах. Ступінь ураження екосистем істотно залежить від дози, отриманої протягом перших років після аварії. Фітоценози і тваринні угруповання, що зазнали найбільшого впливу, показують істотне зниження різноманіття, але ці ефекти відсутні для дрібних ссавців. Задokumentовано нелінійне зростання темпів мутацій залежно від дози. Гіпотетично епігенетичні зміни і зміни експресії генів задіяні в адаптації до умов Чорнобиля. Контраверсійним є також питання мінімальної ушкоджуючої дози [30].

Наприклад, цитогенетичне пошкодження кореневої меристеми проростків сосни, зібраних біля місць зберігання радіоактивних відходів, істотно перевищило показники контрольної групи. Встановлено зниження генетичного різноманіття як функції дози при гамма-опроміненні. Завдяки попереднім дослідженням виявлено численні хромосомні аберації у чорнобильських популяцій *Crepis tectorum* та *Secale cereale*, які вказують на залежність дестабілізації геному від дози. Варто зазначити, що було здійснено лише кілька молекулярних аналізів рослин, які зростають у забруднених радіонуклідами ґрунтах Чорнобильської зони, отже ще немає чіткого розу-

міння механізмів, що лежать в основі виживання. При мутагенній експозиції виявлено зростання експресії *RAD1* (ексцизійна репарація), *CAT1* (каталаза знешкодження радикалів), зниження частоти міжхромосомних гомологічних рекомбінацій. Важливо, що рослини не мають предетермінованої зародкової лінії. Можливим механізмом адаптації є стабілізація геному шляхом паттерного гіперметильовання. Встановлено, що ДНК рослин, зібраних в перші роки після аварії, була більш гіперметильованою за пізніші. Відповідно рослини з ділянок пізніших років мали дещо більшу частоту рекомбінацій, зворотно до ділянок з найбільшим радіаційним навантаженням.

Експресія антиоксидантних ензимів репресована за нормальних умов у досліджуваних популяцій. При двогодинній експозиції на Х-променях чи дії мутагена Rose Bengal, який імітує радіаційний вплив, спостерігались різні тренди змін таких генів, як *CAT1*, *FSD3* (супероксид дисмутаза), *Rad1*, *Rad54-like* (репарація розривів ниток, найчастіший феномен при радіаційному ушкодженні), що свідчить про відсутність універсального механізму адаптації. Крім того, було зазначено, що потомство рослин, які зростали в радіоактивному середовищі біля Чорнобиля, витримує більш високі рівні мутагенів, а також має знижену в 10 разів частоту міжхромосомних гомологічних рекомбінацій. Підсумовуючи, можна стверджувати, що адаптація рослин до хронічного опромінення являє собою складний процес, який включає епігенетичне регулювання, стабілізацію геному, а також посттрансляційне регулювання [31].

Злакові рослини були зібрані із чистої зони і двох радіоактивно забруднених ділянок в Казахстані, на яких проводилось випробування ядерної зброї [32]. З цими рослинами провели експеримент: рівень γ -опромінення у контролі 0,23 мкЗв/год, забруднені сайти 5,4 та 25 мкЗв/год, ґрунтова активність на початку культивування $^{134}\text{CsCl}$ – 461 Бк/кг та SrCl_2 – 154,5 Бк/кг. Аналіз варіантів виявив, що відповідь *APX*, *MDHAR*, *GR* не визначалась місцем походження насіння, але активність *SOD*, *CAT*, *POD*, *G6PDH* у великій мірі залежала від даного фактора. Більш чи менш істотне підвищення активності досліджених ензимів виявили у рослин із популя-

цій, що зазнавали хронічного впливу іонізуючої радіації за експериментального зовнішнього γ -опромінення. Попередні результати на тютюні дозволили припустити, що стійкість до окисного стресу обумовлена підвищеною експресією *Cu/Zn SOD* та *APX*, а активність *MDHAR* та *GR* залишається незмінною. Зміни, виявлені в ензиматичних активностях, мають генетичну природу, оскільки виявлені у нащадків рослин, що хронічно опромінювались впродовж десятиліть. У досліді із комбінованим зовнішнім γ - та внутрішнім β -опроміненням зафіксовано достовірне зростання специфічних *SOD* та *G6PDH* активностей. *G6PDH* постачає *NADPH* для ефективного функціонування аскорбат-глутатіонового циклу та інших систем знешкодження H_2O_2 . Постає питання, чи можна незначне радіоактивне забруднення вважати селективним фактором, що призводить до генетичної модифікації локальної популяції. Підсумовуючи, можна зазначити, що відбувається природна селекція найбільш адаптованого генотипу внаслідок 50 років зростання у радіоактивно забрудненому середовищі та ефективного індукування антиоксидантних ензимів, особливо *SOD*. Життя під низькоінтенсивною іонізуючою радіацією у природному середовищі призвело до селекції адаптованих генотипів, що характеризуються ефективною індукцією антиоксидантних ензимів, особливо *SOD* [32].

Дуже важливо тестувати гіпотези у коректно модельованих експериментах. Цікаві результати отримали при дослідженні експресії генів *SSH* (suppression subtractive hybridization – аналіз інгібування гібридизації), в результаті експерименту ізольовано 46 клонів зміненої експресії при активності у розчині 30 Бк/см³. Транскрипційні зміни арабідопсису було індуковано дозою γ -радіації потужністю до 100 Гр. Встановлено, що ^{134}Cs викликає зміни профілю транскрипції. Припускається, що мінімальною фоновою інтенсивністю для статистично достовірних ефектів є 100 мкГр/год. Звичайно акумулювання радіонуклідів варіює для різних рослин. Досліджені активності не вплинули на морфологію чи розвиток об'єктів. Умови експерименту можна співставити із природною активністю Чорнобильської зони. Виявлено 41 індукований ген та 5 репресованих. Важлива

група індукованих мРНК, задіяна у рості, поділу та розвитку клітини, складає 7 транскриптів. Кілька ідентифікованих транскриптів виявляють схожу динаміку при генотоксичному стресі, з них індукуються лише два гени клітинної комунікації та трансдукції сигналу. Хоча дане дослідження не дає тотальної картини транскрипційних змін, серед групи, спорідненої із захистом та стресом, виявлено наступні: ексцизійної репарації ДНК, *Mre11* (частина комплексу рекомбінації ДНК), тіоредоксин, *CAT* та 17 транскриптів невідомих функцій. Можна зробити висновок, що навіть низькі дози хронічної іонізуючої радіації впливають на важливі клітинні процеси.

Радіоцезій – один із головних антропогенних джерел внутрішньої та зовнішньої γ - та β -радіації [33]. Універсальний механізм адаптації до нього відсутній. Результати проведеного методом AFLP-аналізу сосен, вирощених у зоні відчуження ЧАЕС, вказали на істотне пошкодження ДНК геному та триразове збільшення мутацій. Оскільки іонізуюча радіація є сильним мутагенним фактором, мікросателітні маркери використовували як типові соматичні мутації. Частота мікросателітних мутацій істотно зростала порівняно із контролем [34]. Сосни також мали вищу варіабельність нуклеотидів генів *CAT* та *GPX*. В голках 50-річних дерев виявлено високу варіабельність нуклеотидів досліджених генів, але в 20-річних соснах, що були посаджені після аварії і відповідно не зазнали гострого опромінення, змін не виявлено. Не виявлено також кореляції між дозою та мутаціями *CAT*, *GPX* [35]. Потомки *Arabidopsis thaliana*, зібрані у Чорнобильській зоні, були стійкі до більш високих рівнів мутагенів, ніж рослини контрольної популяції. Виявлено також ДНК-гіперметилування у сосни, що вказує на роль епігенетичних ефектів в адаптації цієї рослини на забруднених радіонуклідами територіях. Схоже, що існує кореляція між гіперметилуванням геному та радіаційною чутливістю. Ріст рослин в забрудненому радіонуклідами середовищі характеризується підвищеною частотою мутацій ДНК. Незважаючи на значний рівень захисту геному, рослини в Чорнобилі не захищені від мутацій, як це було показано в експериментах на зародковій лінії пшениці. Власне, полімеразна ланцюгова реак-

ція була використана для характеристики рослин пшениці, що вирощені на забруднених і контрольних ділянках. Як результат, виявлено підвищену частоту мутацій мікросателітів. У ДНК більш пізніх поколінь пшениці зафіксовано появу і зникнення повторів та навіть повну втрату мікросателітних смуг чи збільшення частоти гетерозиготних структурних варіантів, пов'язаних з 13 однокопійними мономорфними локусами. У рослин пшениці, вирощених в радіозабруднених ґрунтах Чорнобильської зони протягом одного покоління, послідовності шести мікросателітних локусів містять складні мутації зародкової лінії, в тому числі видалення локусів та вставки невідомого походження, і також виявлено появу та втрату повторів чи навіть повну втрату специфічних мікросателітних смуг [36].

Сучасні парадигми радіобіологічних ефектів хронічного опромінення низькими дозами

Реалізація ефекту низьких доз для живих організмів є гарячим питанням сучасної радіобіології, починаючи з ефектів впливу на людину з часів Хіросіми та Нагасакі до аварії на Фукусімі [37]. Ключовими, нещодавно описаними феноменами є ефект свідка, індукована нестабільність геному та радіоадаптація. Ефект свідка ймовірно реалізується ще не описаними сигнальними молекулами і рецепторами. Геномна нестабільність може проявитись апоптозом або злоякісною трансформацією. Адаптивна відповідь має полімодальний характер. Відомо, що іонізуюча радіація спричиняє численні ефекти на рослини – від стимулювання росту до важких ушкоджень. Коли предметом вивчення є адаптація чорнобильських рослин, відмінності в реакції рослин на гостре і хронічне опромінення повинні враховуватись при плануванні експерименту. Феноменами хронічного опромінення є індукція нестабільності геному, аномалії метаболічних процесів, можлива втрата здатності розпізнавання позиційної інформації. Наприклад, у рослин арабідопсису, що зазнали хронічного опромінення, зафіксовано більш раннє цвітіння в порівнянні з опроміненними рослинами, що зазнали рівної, але гострої дози. Крім того, на рівні транскриптому рослини відповідають на гостре опромінення подібно до інших абіотичних стрес-

сів (наприклад, важкі метали), в той час як хронічно опромінені рослини відповідають кардинально інакше. Аналіз промоторів генів, що експресувались в хронічній і гострій групах, також підтвердив істотні відмінності [38]. Отже, для малих доз єдиний відомий молекулярний механізм стохастичних ефектів не має експериментальних доказів. Радіаційно індукована нестабільність геному при малих дозах X- та γ -опромінення для клітин та цілісних організмів без виражених дефектів наразі експериментально не доведена. Нелінійність ефектів при малих дозах можна пояснити варіабельною репарацією. Експресія генів внаслідок дії низькоінтенсивного опромінення є схожою з аналогічною при старінні.

Парадигмами сучасної радіобіології є радіоадаптація, геномна нестабільність, втрата здатності сприйняття позиційної інформації, кумулятивність доз, нееквівалентність зовнішнього та внутрішнього опромінення, теорія мішеней, відсутність порогу доз, соматичний гермесис, специфічні реакції клітин, незалежні стохастичні і детерміністичні ефекти, ефект свідка, вузький інтервал ефекту потужності доз [39]. Радіостійкість клітин контролюється репарацією ДНК. Опромінення в малих дозах може викликати активну реакцію клітин як на сигнальний чинник. Можливо, за малих доз визначальну роль відіграє індукована опроміненням зміна функціонування регуляторних систем клітини. Вважається, що до ефекту свідка причетні продукти генів *p53* та *p23*. Концентрація радіоактивних ізотопів насправді ж надзвичайно мала. Клітина має принаймні дев'ять назалежних систем репарації ДНК. Можливий пік біологічної дії малих доз дорівнює 1–2,5 сГр.

Полімодальний характер змін виявлено як для наночастинок, так і низькоінтенсивної радіації, отже токсикологічні закономірності для наночастинок можна використати для опису чи пояснення дії радіації та навпаки. Наша експериментальна модель попадає в діапазон дії низьких доз. Саме тому ми вирішили застосувати сучасний інструмент системної біології. Було розглянуто широкий спектр експериментальних досліджень радіаційних ефектів у клітинних системах, а також у цілісних рослинах і тваринах. Багато з цих відповідей, а

також факторів, що їх модифікують, дозволяють сформувати призму для вивчення ефектів опромінення людини. Крім того, фундаментальна радіобіологія в сучасності включає молекулярну радіобіологію, яка допомагає зрозуміти базові механізми відповіді на опромінення. Пошкодження субклітинних компонентів може вплинути на функціонування клітини і призвести до злякисного стану. Численні гени є залученими в клітинну відповідь на радіацію, у тому числі репарації ДНК та регулювання клітинного циклу. Мутації цих генів викликають низку порушень функціонування організму людини, що проявляється у чутливості до опромінення і схильності до раку. Наприклад, мутації одного із багатьох так званих генів контрольної точки можуть призвести до нестачі часу для відновлення пошкоджень, бо клітина втрачає здатність затримувати клітинний цикл після опромінення. Клітини мають кілька біохімічних шляхів, що здатні розпізнати і боротись із конкретними формами ушкодження. Один ген, який відіграє ключову роль, є супресор пухлини *TP53*, що втрачений або мутантний у понад половини всіх пухлин людини. Білок P53, що виробляється цим геном, контролює як арешт клітинного циклу, так і один із шляхів апоптозу. Деякі біохімічні шляхи також беруть участь у процесах реакції на стрес. Вони діють для обмеження ступеня або результату ушкоджень. Подальша індукція геномної нестабільності шляхом мутацій у клонах клітин напевно є критичною подією в трансформації до злякисного стану. Прямих доказів асоційованого характеру ініціюючих подій у пухлинах людини із опроміненням ще недостатньо, але досягнутий істотний прогрес у розшифруванні ранніх явищ радіаційно-пов'язаних пухлин у мишачих моделях. Гарячим питанням сьогодення є ризик від низькодозового опромінення. Немішенні ефекти опосередковані фундаментальними механізмами клітинного гомеостазу. Погано зрозумілі системні ефекти, такі як вплив на здоров'я людини в цілому [40]. Реалізація індивідуальної відповіді є, безумовно, функцією генотипу.

Таким чином, мутації генів відповіді на пошкодження ДНК в пухлинах відіграють важливу роль у спонтанному розвитку геномної нестабільності. Репарація комплексних подвій-

них розривів ДНК іноді схильна до помилок і визначається величиною та потужністю дози, а також якістю радіаційних ефектів клітини.

Новітні наукові досягнення підкреслили відмінності в складності та придатності для ефективної репарації між спонтанно виникаючими і радіаційно індукованими пошкодженнями ДНК. Ці дані підкреслюють важливість врахування природи пошкоджень для оцінки ураження при відповіді на низькі дози, а не лише їх загальної кількості. Результати дослідження адаптивних реакцій на випромінювання в клітинах отримано на широкому експериментальному матеріалі. Явище радіоадаптації було витлумачено як результат початкової невеликої (ініціюючої пошкодження) дози, що активує механізми репарації і, як наслідок, бере участь у зниженні реакції організму на подальшу більшу (тестуючу) дозу. Схоже діапазон ініціюючих доз є вузьким, а час застосування тестуючої дози – критичним, і вона має бути істотною. Відповідь значно варіює між окремими видами, угрупованнями та органами багатоклітинних організмів. Тим не менше адаптивну відповідь чітко спостерігали у різних системах, включаючи лімфоцити людини та різні мишачі клітини. Адаптивну відповідь також здатні викликати деякі хімічні агенти, наприклад, пероксид водню, блеоміцин та важкі метали.

Перспективи та засоби інтегральних методів в біології

Системні підходи біології перебувають у фазі вибухового революційного розвитку. Системна біологія намагається впорядкувати каталог компонентів клітини, таких як гени, матриці, білки, метаболіти. Вона застосовує інтегральні підходи дослідження функціонування рослинного організму. Сучасна системна теорія поширюється на нові галузі знань та займає важливу нішу у моделюванні життєдіяльності клітин та організмів. Одночасний аналіз геному, транскриптому та протеому дозволяє отримати комплементарні, взаємодоповнюючі та вичерпні дані. На порядку денному стоять амбіційні завдання встановлення ролі усіх генів рослини, а також закономірностей узгодженої роботи програм розвитку чи реакції на подразники. Окремі дослідження вибірково застосо-

вують наявні інтегральні інструменти (наприклад, аналіз метаболітів чи матриць), що дозволяє виявити лише окремий аспект функціональних, метаболічних та біохімічних шляхів рослини.

Перевагою, але одночасно і джерелом застережень є висока чутливість засобів системної біології: на статистично детерміновані похибки методик накладається біологічна варіабельність та пластичність рослинного організму. Функціональна геноміка ставить питання перекладу інформації послідовностей та розміщення генів відповідно до розуміння їх функціонування; це спроба зрозуміти сукупну роботу генів організму. Лише зведенням в бази даних усієї інформації, зібраної засобами функціональної геноміки, можна встановити функції невідомих генів. Значна частина секвенованих генів арабідопсису та рису не мають гомології до генів із відомими чи прогнозованими функціями. Секвенований геном арабідопсису кодує близько 25 500 генів, та вважається, що четвертина з них унікальна для рослинного царства, в той час як геном рису утворений близько 50 000 генами. Важливим інструментом функціональної геноміки є інсерційний мутагенез, що виявляє максимум ефективності у комбінації зі зворотним генетичним скринінгом. В майбутньому знайдуть застосування повні геномні мікропромені.

Транскрипційні експерименти слід інтерпретувати із застереженням, бо чітка кореляція вмісту мРНК та білка часто відсутня. Зважаючи на нестачу даних по послідовностях ДНК, належна ідентифікація білків ускладнена. Порівняльний аналіз генів – це важливий засіб вивчення генетичних та фізіологічних відмінностей сортів, таким чином можна маркувати QTL (локуси кількісних ознак). Високо-ефективний метаболічний скринінг вимагає автоматизованого паралельного аналізу багатьох сполук. Метаболіти – це власне функціональні еквіваленти, а не пряме відображення активності генів. Вважається, що арабідопсис має близько 5000 різних метаболітів. Профіль метаболітів визначають як ГХ-МС, РХ, NMR. Метаболоміка дозволяє фенотипувати генетично модифіковані рослини. Аналіз метаболому натикається на проблему гнучкості та варіабельності рослин: ідентичні рослини арабідоп-

сису за однакових контрольованих умов виявили дещо відмінний метаболічний профіль. Феноміка передбачає аналіз мутантів впродовж циклу розвитку в різних умовах, фіксуючи різні параметри та інтегруючи у базу даних. Наразі дослідження увійшли у фазу швидкої характеристики усіх генів рослини, що має потужність синергізму комплементарних підходів. Тотальний аналіз протеому створює найбільш адекватну картину стану системи в даний момент та є критичним для розуміння регуляторних властивостей спряження чи незалежності ознак [41].

Для розуміння сигнальних шляхів рослини виникла потреба їх глобального дослідження, зокрема засобами фосфопротеоміки. Зворотне фосфорилування білків відіграє головну роль у більшості регуляторних процесів, що лежать в основі життя. Доведено участь сигнальних каскадів у забезпеченні реакції організмів на впливи середовища. Оскільки фосфопротеїни становлять дуже малу фракцію протеому, для аналізу слід застосовувати стратегію попереднього збагачення – заміщення стабільною групою та афінну хроматографію. Фосфопротеоміка є також інструментом тотальної ідентифікації субстратів кіназ. Зворотне фосфорилування – найважливіша та найпоширеніша посттрансляційна модифікація білків, у певний момент складає $\approx 30\%$. Окрім того, доведено необхідність деяких з них для стійкості до стресу, зокрема, кілька Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ рису індукуються низькою температурою, а підвищена експресія підвищує стійкість. Фосфорилування кальретикуліну рису та рибосомального білка S6 кукурудзи зростає за дії холоду. Фосфатази (комплементарні ензими) зазвичай виступають негативними регуляторами сигналіngu. Головним підходом очищення є заміщення фосфатної групи більш хімічно стабільною, а також застосування афінної хроматографії. Отримано успішні результати очищення фосфопротеїнів сильною катіонообмінною хроматографією чи комбінованою сильною аніонообмінною та фіксованою метал-афінною. Порядкоопераційтакий: спочатку здійснюється лізис трипсином повного білкового екстракту, після чого проводять естерифікацію метилювання карбоксильних груп, метал-афінну (тривалентні катіони) хроматографію та тандемну

мас-спектрометрію (МС). Перед МС варто провести дефосфорилування, проте втрачається інформація щодо локалізації та кількості сайтів. Ця методика дає можливість ідентифікувати сотні сайтів фосфорилування у різних організмів. Наприклад, функціональний розподіл фосфопротеїнів кореня арабідопсису: сигналінг – 12, трафік – 11, убіквітинування – 4, РНК метаболізм – 22, перебудова хроматину – 13, трансляція пакування білків – 13, ензими – 18, інші – 55. У майбутньому варто провести аналіз розподілу за компартментами. Геном арабідопсису кодує близько 1000 протеїнкіназ, чимало трансмембранних рецептороподібних кіназ, а модулі MAPK вважаються центральними компонентами сигнальних шляхів. Недостатньо зрозуміло, що саме визначає сигнальну специфіку MAPK каскадів рослин, а у тварин та дріжджів – відповідно ключові регуляторні фактори, домени субстратної взаємодії та адаптори. На жаль, лише виділення та секвенування недостатньо прояснюють біологічну роль сигнальних шляхів [42].

Для побудови метаболічної карти застосовують аналіз потоків. Стаціонарна стратегія (метаболіти маркують стабільними ізотопами) ефективна для циклічних, ускладнених численними розгалуженнями реакцій основного метаболізму. Ключем до вимірювання метаболічних потоків є маркування. Істотні зміни іноді викликаються дуже незначними флуктуаціями концентрацій метаболітів. Для повної та всебічної характеристики системи визначальними є як аналіз метаболіту, так і потоків. Мета мережевого аналізу потоків – виміряти одночасно максимальну кількість процесів для побудови карти білків. Домінуючим засобом є введення мітки із подальшим спостереженням закономірностей розподілу. Особливостями рослинних систем є компартменти із однаковими метаболітами, дуплікація реакцій та зворотність і циклічність процесів. Тому постгеномні дослідження метаболіту та транскриптому не дали чіткого розуміння шляхів раціональної інженерії. Динамічні експерименти можуть дати модель, що дозволить дослідити контроль архітектури процесів. Система досягає рівноважного стану в широкому діапазоні часу. Динамічна стратегія пасує за відсутності циклічних складових, зокрема аналізу вторин-

ного метаболізму (недостатньо різнокінетичних розгалужень). Стаціонарна стратегія є інформативною при просторовій ізоляції, зворотних циклах тощо. Стабільні ізотопи переважно застосовують у стаціонарному аналізі, радіоактивні – у динамічному. Стабільні ізотопи можна визначити за допомогою МС чи ЯМР. Завершальний етап – побудова математичної моделі динаміки розподілу мітки.

Актуальними завданнями іншої групи методів, біоінформатики, є розробка ієрархічних баз для впорядкування зростаючих обсягів експериментальних даних, отриманих, зокрема, в галузі геноміки. Можливим ключем інтегральної системної біології є феноміка – аналіз колекцій мутантів. Функціональні групи білків насіння сої мають різні тренди змін кількості впродовж фази накопичення резервів. Біоінформатика інтегрує дані транскриптоміки, протеоміки, метаболоміки та феноміки та є конвергенцією біології та інформаційних технологій. Для подальшого аналізу створено базу даних порівняльної геноміки злаків «Gramene». Стандартним засобом ідентифікації схожості послідовностей є інструмент BLAST (basic local alignment search tool). Головні знахідки в галузі нових ензимів відбуваються шляхом пошуку аналогій із типовими. Цікаво, що для вторинного метаболізму часто не спрацьовує критерій схожості, навіть віддалені ензими можуть каталізувати однакові реакції; іноді проявляється поліфункціональність. Прямі порівняння між експериментами на мікропроменях (оцінка експресії) ускладнені через відсутність стандартизації: наразі це переважно масиви гетерогенних даних. Основною багаторівневою базою даних білкових послідовностей залишається UniProt (universal protein resource). Із зростанням кількості білків з встановленою структурою дедалі легше прогнозувати функції по структурі. На порядку денному стоїть важливе питання трансляції повної геномної ДНК у структури білків, а отже і їхніх функцій. Цей крок утворить необхідний зв'язок генетики організму та фенотипу, бо для білків характерні масові посттрансляційні модифікації. Метаболоміку можна вважати ключем інтегральної системної біології. Метаболіти не мають спільних хімічних властивостей, тож сучасні методи дозволяють

екстрагувати та розділяти лише певну фракцію. У геномі людини близько 20 000 генів, але виявлено близько 100 000 білків. Зміни нуклеотидів у ділянках генів, що піддаються альтернативному сплайсингу, накопичуються швидше.

Застосування протеоміки відкриває нові горизонти в розумінні механізму дії опромінення на живі клітини в Чорнобильській зоні. Відтворювана двовимірна протеомна карта є сталим візуальним джерелом. Ідентифікація за пептидними масовими відбитками – швидкий та простий підхід, він чудово працює за наявності секвенованої анотованої геномної інформації. Тепер ми прямо можемо досліджувати системи. Раніше біохіміки вивчали маленькі кластери споріднених компонентів метаболічних шляхів. Можна побачити цілу систему, але інформація, зашифрована у тисячах точок даних, є поза людською здатністю інтуїтивної інтерпретації.

Протеоміка рослин є перспективною аналітичною технікою. Підходи протеоміки варіюють від ідентифікації білків до характеристики посттрансляційних модифікацій чи білкових взаємодій. Для ідентифікації мембранних білків найкраще підходить попереднє фракціонування в органічних розчинниках чи хроматографія. Прогрес протеоміки скерувався швидкими досягненнями МС (м'які техніки іонізації) та зростанням даних послідовностей EST чи геному. Існуючі методики дозволяють швидку ідентифікацію піко/фемпто моль пептидів за наявних даних послідовностей. Методи іонізації MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) чи ESI (electrospray ionization) селективні для різних пептидів, одночасне застосування обох разом із тандемною МС покращує успішність ідентифікації. Через неповну іонізацію виявляється лише частина пептидів зразка. Молярне співвідношення між рідкісними та звичними білками часто становить близько п'яти порядків.

Повноти результатів можна досягти фракціонуванням протеому. Трансмембранні спіралі білків дуже погано розділяються на денатуруючих двовимірних гелях. Кілька досліджень підкреслюють неадекватність застосування гелів для відтвореного та повного аналізу мембранних білків. Протеом хлоропласту складає 2500–3000 білків, а тилакоїди містять 200–230 білків

люмену та периферичних. Недоліком EST-баз є те, що чимало білків відсутні або лише недостатньо присутні через часткове перекриття, а також через великий рівень помилок EST-послідовностей. Часто трапляються помилки анотації (розміщення екзонів-інтронів гена) секвенованих геномів, які можна виправляти, зокрема, інтерпретуючи EST. Комбінування аналізу мікропроменів та протеому вказує на місце регуляції гена.

Протеоміка рослин швидко перетворюється із молоді дисципліни до знавця із вагомим впливом на біологію рослин, але вона має чимало унікальних проблем, які необхідно вирішити [43]. Кількісна протеоміка застосовується, зокрема, для поглибленої характеристики органел рослин. Білки клітини просторово організовані згідно з функціями, тож встановлення субклітинної локалізації сприятиме функціональній ідентифікації. Деякі органели, зокрема мітохондрії та пластиди, відносно легко ізолювати методами диференційного центрифугування, решту практично неможливо очистити без істотних домішок. Після двовимірного електрофорезу, що має чудову роздільну здатність, білки проявляють сріблом (чутливість 0,5–50 нг), кумасі (0,1–10 мг), флуоресцентними барвниками Sypro Ruby чи Deep Purple (0,2–2000 нг). Проблемою є погане відтворення гелів. Аналіз та ідентифікація точок різної кількості вимагає складних статистичних маніпуляцій: багатоваріантні тести по корелятивних змінах за типами даних, комплементарні одноваріантні тести. Варіацією методики, що дозволяє уникнути більшості недоліків, є DIGE (difference in gel electrophoresis). Протокол передбачає попереднє маркування зразків різними флуоресцентними барвниками (Cy2, Cy3, Cy5), що дозволяє аналізувати кілька зразків на одному гелі. На гелях погано ідентифікуються білки із екстремальними ізоелектричними точками чи масами, а також білки, що присутні у малих кількостях, і гідрофобні мембранні білки, які мають тенденцію преципітації під час фокусування. Корисним для характеристики протеому органел є альтернативний підхід PX-MS. Спочатку органели розділяють у градієнті центрифугування, далі проводиться диференційне маркування стабільними ізотопами ICAT (isotope coded affinity tagging). Пеп-

тиди перед MS розділяють багаторівневою рідинною хроматографією. Недоліком цієї техніки є втрата інформації посттрансляційної модифікації. Власне найкорисніші стратегії для аналізу білків органел – це DIGE і маркування ізотопами, спряжене із PX-MS [44].

Протеоміка є методом відбору для аналізу рослин, вирощених на забруднених радіонуклідами територіях, бо здатна кількісно аналізувати сотні білків в одному експерименті [45]. Крім того, протеоміка візуалізує метаболічні зміни незалежно від їх транскрипційної, трансляційної або епігенетичної природи [46]. Зміни в активній експресії ДНК не завжди виявляються на рівні синтезу і накопичення білка, отже протеоміка бажана для поглибленого вивчення росту, розвитку та розмноження рослин. Дані по експресії транскриптів і наявності білків було зібрано на п'яти почергових стадіях дозрівання насіння арабідопсису. Отримано інформацію про 523 білки та понад 22 000 генів, скомпоновано 319 пар білок – транскрипт. Статистично порівняли закономірності накопичення пар, з яких 56 % узгоджувались, проте було також чимало неузгоджених білок/транскрипт дуплексів, корисних для вивчення посттранскрипційної регуляції [47]. За останнє десятиліття дослідженням на основі протеоміки було піддано насіння різних рослин. Сучасною необхідністю протеоміки стало застосування біоінформатичних алгоритмів для інтерпретації неінтуїтивних багатих масивів даних. Протеоміка має потенціал мосту між біохімічними, генетичними, структурними та молекулярними стратегіями аналізу біологічних процесів та трансформацією від банального опису живих систем до характеристики посттрансляційних модифікацій, міжбілкових взаємодій та аналізу контролю метаболічних мереж, а також аналізу даних для розуміння процесу статевого розмноження покритонасінних від фази цвітіння до стадії проростка [48].

Дослідження, що дають великі надійні набори даних про численні білки, включають роботу по конюшині. Протеоміка розвитку насіння конюшини як моделі для аналізу розвитку насіння бобових визначає, що 120 білків мали різну кінетику накопичення: легуміни, віцеліни, конвіцеліни та ліпоксигенази, β -тубулін і анексин ймовірно задіяні у поділі клітин. Ви-

явлено також динаміку накопичення білків вуглецевого метаболізму і фотосинтезу зародку. Ймовірно ензими, задіяні у біосинтезі метіоніну, беруть участь у регуляції переходу від активності до стану спокою [49]. Крім цього, були виконані роботи на сої, ріпаку, ячменю та рицині. Порівняння протеомів дозрівання насіння рицини, сої та ріпаку дозволило підкреслити відмінності фотосинтетичного і нефотосинтетичного метаболізмів цих рослин. Схоже, що олійні не використовують енергію фотосинтезу в насінні для накопичення запасних резервів.

Використання DIGE дозволило розділити 660 білкових груп. Основними функціональними групами є запасання — 34 %, енергія — 19 %, первинний метаболізм — 15 %. Показано, що у рицини в 6 разів більше ізоформ каталаз, ніж у сої, також більший сумарний вміст. Разом з тим у рицини в 11 разів менше сумарного вмісту ізоформ рубіско. Як бачимо, наявні чіткі принципів відмінності енергетики запасання вуглецю у порівняних рослин [50]. Представлені дані є необхідною прелюдією для порівняння з протеомами іншого багатого на олію насіння. Результати цих досліджень дали цінну інформацію про метаболізм насіння. Для дослідження молекулярних механізмів, які дозволяють рослинам в Чорнобилі адаптуватись до середовища, геномні та протеомні підходи ще не застосовувалися раніше. Часткові пояснення можуть бути знайдені в результатах попередніх геномних аналізів. Незважаючи на високу ймовірність суттєвих змін в ДНК у відповідь на ріст у радіаційному середовищі, не обов'язково значні зміни проявляються в кількості білків зрілого насіння. Протеоміка є наступним кроком в розумінні адаптації до постійно підвищеного рівня іонізуючого випромінювання. Кількісний підхід на основі протеоміки ще не був використаний для аналізу насіння, зібраного з рослин сої та льону, вирощених як у забрудненому, так і контрольному середовищі Чорнобильської зони. Гіпотетично ефекти зростання в забрудненому радіонуклідами довкіллі на протеом є незначними. Подібні результати було отримано по впливу іонізуючого випромінювання на клітини тварин, але маркери окисного стресу змінюються під впливом радіації. Чимало різ-

них білків печінки зазнали змін внаслідок опромінення щурів. Показано, що протеоміка є тонким інструментом вивчення клітинних реакцій на іонізуючу радіацію [51].

Локальне опромінення внаслідок нещасного випадку може спричинити серйозні пошкодження шкіри, тому його прогнозування важливе для успішної терапії. Для вивчення змін на білковому рівні, включаючи посттрансляційні модифікації (ПТМ) білків, використали DIGE. Деякі білки, що змінилися за короткий час після опромінення, а також ймовірні ПТМ було запропоновано на роль прогностичних маркерів [52]. Для доповнення цих досліджень дозрівання насіння вивчали у другому поколінні чорнобильських рослин і виявлено зміни у вмісті олії в зрілому насінні. Дослідження сої показало зниження рівня білків β-конгліцинінів, а також змінено кількість білків, асоційованих з метаболізмом вуглецю, біосинтезом жирних кислот і циклом трикарбонових кислот. Така адаптація також включає коригування метаболізму вуглецю в цитоплазмі і пластидах, підвищення активності циклу трикарбонових кислот і зниження конденсації малоніл-ацил білка — носія в процесі біосинтезу жирних кислот [53]. У льону ми спостерігали змінено кількість білків, пов'язаних із біосинтезом пірувату, окисленням етанолу, а також багатофункціонального ферменту ізоцитратдегідрогенази [54]. У цьому контексті наша дослідницька група систематично порівнювала протеоміку насіння рослин, вирощених як у радіозабруднених, так і нерадіоактивних районах поблизу Чорнобиля. Наступні додаткові аналізи показали змінено кількість білків, пов'язаних із асиміляцією вуглецю і метаболізму жирних кислот як у сої, так і у льону. Щоб поширювати дані поточних досліджень протеома насіння рослин, вирощених на забрудненій ділянці Чорнобильської зони, створено базу даних «Seeds in Chernobyl» (<http://www.chernobyl-proteomics.sav.sk>).

Геномні ресурси експериментальних рослин

Льон (*Linum usitatissimum* L.) — це однорічна трав'яниста рослина, третя за обсягом виробництва натуральних волокон серед сільськогосподарських культур і одна з п'яти основних олійних культур у світі. Льон, який в першу

чергу вирощують як олійну культуру для продуктів харчування, кормів і в додатках біопродукції, є малогабаритною та самозапилювальною травою [55]. Більшість сортів олійного льону багаті на жирні кислоти омега-3 та омега-6 (альфа-ліноленова кислота, 55–57 %), які функціонально пов'язані з численними медичними ефектами. Ляну олію використовують у виробництві фарб, мила, замазки і полімерів. Волокна використовуються в текстильній, автомобільній і будівельній промисловості, а насіння льону – в харчовій промисловості. Поліпшення, зберігання, оцінка та використання зародкової плазми льону є в даний час найбільш важливим напрямком у лляній промисловості. Льон за оцінками має невеликий розмір геному ~ 370 Мб [56] і добре підходить для швидкого прогресу в галузі геноміки. Як правило, насіння льону містить 41 % олії, 20 % білка і 28 % дієтичних волокон [57, 54].

При хронічній дії радіації в Чорнобильській зоні встановлено збільшення кількості купінових білків в кількох поколіннях льону. Ці білки здатні викликати алергії при їхньому споживанні [68]. Купінові білки можуть мати поведінку, подібну до пріонових білків, але поки їхні функції для рослин залишаються невідомими. Ми припускаємо, що такі білки мають регуляторну функцію трансгенераційної епігенетичної пам'яті від дії стресового фактора, та збільшення їх кількості після опромінення свідчить про роль в адаптаційному процесі.

Основною перешкодою для аналізу протеому льону є обмежені ресурси геному. Ця ситуація останнім часом покращилася з появою послідовностей для 59 626 «unigenes» разом з реконструкцією усього геному із даних секвенування нового покоління [58]. Крім того, великомасштабний аналіз експресованих послідовностей в різних тканинах льону надав нову інформацію, відмінну від набору даних «UniGene» [59]. Власне, було ідентифіковано нові гени, залучені у дозрівання насіння льону [60]. Важливо зазначити, що аналіз насіння на семи фазах розвитку підтвердив важливість біосинтезу ліпідів під час ембріогенезу і фази заповнення насіння [61]. Льон, як і всі інші багаті на олію культури, містить велику кількість запасних білків насіння. З використанням традиційної системи класифікації на основі роз-

чинності описано два компоненти запасних білків насіння: велика солерозчинна фракція (12S) і мала водорозчинна основна фракція (2S), а також виділено 365 кДа глобулярний комплекс насіння льону [62].

На сьогоднішній день відомо кілька протеомних досліджень льону. У одному з ранніх досліджень двовимірний гель-електрофорез (2-VE) був використаний для виявлення змін у вегетативному протеомі внаслідок холодового шоку проростків льону. Крім того, виявлено відмінності між двома сортами льону при порівнянні клітинних культур, отриманих з гіпокотилів та оброблених кадмієм [63]. Раніше ми аналізували зріле насіння льону, зібране в 2008 р. з ремедійованої області міста Чорнобиль [64]. Для аналізу зрілого насіння льону, зібраного з рослин, які вирощені у відновлених полях, що локалізовані безпосередньо в Чорнобилі, використовували 2-VE і подальшу ультрависокоефективну рідинну хроматографію, спряжену з МС для ідентифікації основних білків зі зрілого насіння льону. Молекулярна характеристика культурних рослин, вирощених в ремедійованих землях, які раніше були забруднені радіонуклідами, може встановити напрями для майбутніх методів ведення сільськогосподарства в ремедійованих областях та в подальшому використанні цих районів для сільськогосподарських цілей. Тим більш, що дані, отримані в довготривалому експерименті стосовно еволюції, який проводився з *Escherichia coli* протягом трьох десятиліть, показали здатність організмів пристосовуватись до умов сталого середовища впродовж численної кількості поколінь та покращувати свої властивості. Це може свідчити про наявність пам'яті щодо дії стресових факторів в минулих поколіннях, яка продовжує процес адаптації навіть в незмінному середовищі [65].

Основні запасні резерви сої синтезуються протягом 4–5 тижнів. Запасні білки нагромаджуються у білкових вакуолях і білкових тілах (асоційовані із ендоплазматичним ретикуломом). Процес відбувається після закінчення поділу клітин; близько 20 % сухої ваги насіння становить олія. Встановлено функціональний розподіл 216 виявлених унікальних білків: 28 % – невідомої функції; 22 % – білки метаболізму (27 метаболізм ліпідів і стеролів);

10 % – запасуючих білків; 8 % – росту та поділу клітини; 7 % – сигналіngu; 7 % – захисту від інфекцій; 4 % – енергії; 4 % – транспортери; 3 % – вторинного метаболізму; 2 % – синтезу білків; 2 % – структури клітини; 1 % – транс-крипції; 1 % – внутрішнього трафіка; 1 % – не ідентифіковані.

Кількість білків, задіяних у метаболізмі, знижується протягом досліджуваного періоду, запасні білки та білки локалізації навпаки зростають. Експресія транспортерів практично стабільна; стресових білків спочатку багато, але згодом кількість падає на 50 %, а кількість енергетичних білків зростає. Насіння імпортує цукрозу для забезпечення вуглецем основних класів запасних продуктів, тож регуляція транспорту має величезний вплив на ріст і продуктивність. Активність кількох пластидних гліколітичних ензимів зменшується під час синтезу олії в зародках ріпаку [66].

* *
*

Підсумовуючи результати досліджень на зрілому насінні сої та льону, яке було зібрано на контрольних і забруднених ділянках в регіоні Чорнобильської АЕС, протеоміка дає можливість розгадати можливі механізми, за допомогою яких ці рослини витримали радіаційне забруднення. Розроблено також робочу модель трансгенераційних змін та адаптації рослин до життя у високій іонізуючій радіації середовища [45, 67, 68]. З 2007 р. сою та льон щорічно вирощують в радіоактивних та контрольних ділянках. Це забезпечило унікальну можливість спостерігати за рослинами у період їх адаптації до радіоактивних умов і пролити світло на зміни протеома в насінні впродовж кількох поколінь. Дані, отримані в ході цих експериментів, були депоновані на інтерактивну базу даних і доступні після публікації на www.chernobylproteomics.sav.sk. Це важливо для розробки стратегії по відновленню сільського господарства в районах, забруднених радіоактивністю, для непродовольчих цілей і для розробки стратегій рослинництва, що будуть ефективними в умовах космічної радіації при тривалих космічних місіях у майбутньому.

Робота виконана за підтримки Сьомої рамкової програми Європейського Союзу, проект IRSES-GA-2013-612587 «Plant DNA tolerance».

SYSTEMS BIOLOGY IS AN EFFICIENT TOOL FOR INVESTIGATION OF LOW-DOSE CHRONIC IRRADIATION INFLUENCE ON PLANTS IN THE CHERNOBYL ZONE

M. Danchenko, K. Klubicova, M.V. Krivohizha, V.V. Berezhna, V.I. Sakada, M. Hajduch, N.M. Rashydov

Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Bratislava
Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Nitra
Institute Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: nrashydov@yahoo.com

The paper discusses different methodological approaches to the study of transgenerational alterations of metabolic pathways in soybean and flax seeds in the process of adaptation to chronic irradiation in the Chernobyl alienation zone. A combination of general biological methods and novel approaches, such as genomics, proteomics, cytogenetics, and mutagenesis, allows researchers to analyze an organism's systemic response and identify the latent chronic irradiation effects in plants from the Chernobyl zone. The proteomic approaches are especially efficient, since they range from the identification of changes in abundance and folding of individual proteins to the characterization of posttranslational modifications, trends of qualitative changes during seed maturation, or protein-protein interactions during plant growth and development under permanent impacts of stress factors. The application of proteomics opens new horizons in the understanding of the hidden mechanisms behind the impact of chronic low-dose radiation on living cells and makes it possible to visualize metabolic network alterations regardless of their transcriptional, translational, or epigenetic nature.

СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ МАЛЫХ ДОЗ ХРОНИЧЕСКОЙ РАДИАЦИИ НА РАСТЕНИЯ В ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЕ

Н. Данченко, К. Клубицова, М.В. Кривохижа, В.В. Бережна, В.И. Сакада, М. Хайдух, Н.М. Рашидов

Обсуждаются различные методологические подходы для исследования трансгенерационных изменений метаболических путей в семенах сои и льна в процессе адаптации к хроническому облучению в

Чернобыльской зоне отчуждения. Сочетание общих биологических и тонких методов, таких как геномика, протеомика, цитогенетические методы, мутагенез, позволяет проанализировать системный ответ организма и выявить скрытые эффекты хронического облучения у растений Чернобыльской зоны. Особенно эффективны подходы протеомики, которые варьируют от идентификации синтеза и фолдинга отдельных белков к характеристике пост-трансляционных модификаций, профилей экспрессии, синтеза протеинов в период заполнения семян после цветения до полной зрелости или белковых взаимодействий при росте и развитии растений под перманентным воздействием стрессовых факторов. Применение протеомики открывает новые горизонты в понимании скрытых механизмов действия малых доз хронического облучения на живые клетки и дает возможность визуализировать метаболические изменения независимо от их транскрипционной, трансляционной или эпигенетической природы.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Anspaugh, L.R., Catlin, R.J., and Goldman, M., The global impact of Chernobyl reactor accident, *Science*, 1988, vol. 242, no. 4885, pp. 1513–1519.
2. Moller, A.P., and Mousseau, T.A., Biological consequences of Chernobyl: 20 years on, *Trends Ecol. Evol.*, 2006, vol. 21, no. 4, pp. 200–207.
3. Rashydov, N., Kliuchnikov, O., Seniuk, O., Gorovyy, L., Zhidkov, A., Ribalka, V., Berezhna, V., Bilko, N., Sakada, V., Bilko, D., Borbuliak, I., Kovalev, V., Krul, M., and Petelin, G., Radiobiological characterization environment around object «Shelter», *Nuclear Power Plant*, Soon Heung Chang, 2012, 342 p. Chapter 7, pp. 231–279.
4. Geraskin, S.A., Dikarev, V.G., Zyablitskaya, Y.Y., Oudalova, A. A., Spirin, Y.V., and Alexakhin, R. M., Genetic consequences of radioactive contamination by the Chernobyl fallout to agricultural crops. *J. Environ. Radioact.*, 2003, vol. 66, no. 1–2, pp. 155–169.
5. Jacob, P., Fesenko, S., Bogdevitch, I., Kashparov, V., Sanzharova, N., Grebenshikova, N., Isamov, N., Lazarev, N., Panov, A., Ulanovsky, A., Zhuchenko, Y., and Zhurba, M., Rural areas affected by the Chernobyl accident: radiation exposure and remediation strategies, *Sci. Total. Environ.*, 2009, vol. 408, no. 1, pp. 14–25.
6. Rashidov, N.M., and Kutsokon, N.K., Target and non-target radiobiological reactions – their threshold and doorsteps, *Problems of nuclear power and Chernobyl*, 2005, vol. 3, part 2, pp. 42–50.
7. Fesenko, S.V., Alexhakin, R.M., Balonov, M.I., Bodgevitch, J.M., Howard, B.J., Kashparov, V.A., Sanzharova, N.I., Panov, A.V., Voigt, G., and Zhuchenka, Y.M., An extended critical review of twenty years of countermeasures used in agriculture after the Chernobyl accident, *Sci. Total Environ.*, 2007, vol. 383, no. 1–3, pp. 1–24.
8. Balonov, M., Third annual Warren K. Sinclair keynote address: retrospective analysis of impacts of the Chernobyl accident, *Health Phys.*, 2007, vol. 93, no. 5, pp. 383–409.
9. Berlizov, A.N., Rashidov, N.M., Grodzinsky, D.M., Trisin, V.V., and Berezhnaya, V.V., Model root ¹³⁷Cs income in the early stages of ontogeny of some crops, *Scientific papers of the Institute for nuclear research*, 2005, no. 1(14), pp. 83–90.
10. Tagami, K., Uchida, S., Ishii, N., and Kagiya, S., Translocation of radiocesium from stems and leaves of plants and the effect on radiocesium concentrations in newly emerged plant tissues, *J. Environ. Radioact.*, 2012, vol. 111, pp. 65–69.
11. Zhu, Y.-G., and Smolders, E., Plant uptake of radiocaesium: a review of mechanisms, regulation and application, *J. Exp. Bot.*, 2000, vol. 51, no. 351, pp. 1635–1645.
12. Rashydov, N.M., and Berezhna, V.V., Radiobiological effects of ²⁴¹Am incorporated in cells of organism and methods of prevention of the menace of combined toxicity of the transuranic elements, *New techniques for the detection of nuclear and radioactive agents*, ed. G.A. Aycik, Springer Verlag, 2009, pp. 313–321.
13. Esnault, M.-A., Legue, F., and Chenal, C., Ionizing radiation: Advances in plant response. *Environ. Exp. Bot.*, 2010, vol. 68, no. 3, pp. 231–237.
14. Grodzinsky, D.M., Shilina, J.V., Dmitriev, O.P., Hushcha, M.I., and Kolomiets, O.D., *Radiobiological effects of chronic exposure to plants in the zone of the Chernobyl disaster*, ed. D.M. Grodzynsky, Kyiv, 2008, 345 p.
15. De Micco, V., Arena, C., Pignalosa, D., and Durante, M., Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants, *Radiat. Environ. Biophys.*, 2011, vol. 50, no. 1, pp. 1–19.
16. Paasikallio, A., Rantavaara, A., and Sippola, J., The transfer of cesium-137 and strontium-90 from soil to food crops after the Chernobyl accident, *Sci. Total Environ.*, 1994, vol. 155, no. 2, pp. 109–124.
17. Cooper, B., Clarke, J.D., Budworth, P., Kreps, J., Hutchison, D., Park, S., Guimil, S., Dunn, M., Luginbuhl, P., Ellero, C., Goff, S.A., and Glazebrook, J., A network of rice genes associated with stress response and seed development, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 8, pp. 4945–4950.
18. Nakagami, H., Pitzschke, A., and Hirt, H., Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling, *Trends Plant Sci.*, 2005, vol. 10, no. 7, pp. 339–346.
19. Dani, V., Simon, W.J., Duranti, M., and Croy, R.R., Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in

- response to salt stress, *Proteomics*, 2005, vol. 5, no. 3, pp. 737–745.
20. Vij, S., and Tyagi, A.K., Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants, *Plant Biotechnol. J.*, 2007, vol. 5, no. 3, pp. 361–380.
 21. Lucht, J.M., Mauch-Mani, B., Steiner, H.J., Metraux, J.P., Ryals, J., and Hohn, B., Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*, *Nat. Genet.*, 2002, vol. 30, no. 3, pp. 311–314.
 22. Madlung A., and Comai L., The effect of stress on genome regulation and structure, *Ann. Bot.*, 2004, vol. 94, no. 4, pp. 481–495.
 23. Boubriak, I.I., Grodzinsky, D.M., Polischuk, V.P., Naumenko, V.D., Gushcha, N.P., Micheev, A.N., McCready, S.J., and Osborne, D.J., Adaptation and impairment of DNA repair function in pollen of *Betula verrucosa* and seeds of *Oenothera biennis* from differently radionuclide-contaminated sites of Chernobyl, *Ann. Bot.*, 2008, vol. 101, no. 2, pp. 267–276.
 24. Dmitrieva, S.A., The adaptation of natural plant populations to chronic irradiation due to the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station, *Cytol. Genet.*, 1996, vol. 30, pp. 3–8.
 25. Shilina, Yu.V., Mammadly, S.A., and Rashidov, N.M., Spontaneous and induced genetic instability of somatic cells of plants, *News Tovaristva Genetikiv i Seleksioneriv*, 2006, vol. 4, no. 2, pp. 249–271.
 26. Mammadly, S.A., Grodzinskiy, D.M., Role in the manifestation of pollination types of radiation-induced genomic instability in plants, *Reports of NAS of Ukraine*, 2007, no. 7, pp. 165–170.
 27. Syomov, A.B., Ptitsyna, S.N., and Sergeeva, S.A., Analysis of DNA strand break induction and repair in plants from the vicinity of Chernobyl, *Sci. Total Environ.*, 1992, vol. 112, no. 1, pp. 1–8.
 28. Meeks, H.N., Chesser, R.K., Rodgers, B.E., Gaschak, S., and Baker, R.J., Understanding the genetic consequences of environmental toxicant exposure: Chernobyl as a model system, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2009, vol. 28, no. 9, pp. 1982–1994.
 29. Bell, J.N., and Shaw, G., Ecological lessons from the Chernobyl accident, *Environ. Int.*, 2005, vol. 31, no. 6, pp. 771–777.
 30. Geraskin, S.A., Fesenko, S.V., and Alexakhin, R.M., Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident, *Environ. Int.*, 2008, vol. 34, no. 6, pp. 880–897.
 31. Kovalchuk, I., Abramov, V., Pogribny, I., and Kovalchuk, O., Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone, *Plant Physiol.*, 2004, vol. 135, no. 1, pp. 357–363.
 32. Zaka, R., Vandecasteele, C.M., and Misset, M.T., Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G6PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae), *J. Exp. Bot.*, 2002, vol. 53, no. 376, pp. 1979–1987.
 33. Sahr, T., Voigt, G., Schimmack, W., Paretzke, H., and Ernst, D., Low-level radiocaesium exposure alters gene expression in roots of *Arabidopsis*, *New Phytol.*, 2005, vol. 168, no. 1, pp. 141–148.
 34. Kuchma, O., Vornam, B., and Finkeldey, R., Mutation rates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers, *Mutat. Res.*, 2011, vol. 725, no. 1–2, pp. 29–35.
 35. Vornam, B., Arkhipov, A., and Finkeldey, R., Nucleotide diversity and gene expression of Catalase and Glutathione peroxidase in irradiated Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Chernobyl exclusion zone, *J. Environ. Radioact.*, 2012, vol. 106, pp. 20–26.
 36. Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Hohn, B., and Dubrova, Y.E., Extremely complex pattern of microsatellite mutation in the germline of wheat exposed to the post-Chernobyl radioactive contamination, *Mutat. Res.*, 2003, vol. 525, no. 1–2, pp. 93–101.
 37. Goldstein, D.M., and Stawkowski, M.E., James V. Neel and Yuri E. Dubrova: Cold War debates and the genetic effects of low-dose radiation, *J. Hist. Biol.*, 2015, vol. 48, no. 1, pp. 67–98.
 38. Kovalchuk, I., Molinier, J., Yao, Y., Arkhipov, A., and Kovalchuk, O., Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation, *Mutat. Res.*, 2007, vol. 624, no. 1–2, pp. 101–113.
 39. Hinton, T.G., Bedford, J.S., Congdon, J.C., and Whicker, F.W., Effects of radiation on the environment: a need to question old paradigms and enhance collaboration among radiation biologists and radiation ecologists, *Radiat Res.*, 2004, vol. 162, no. 3, pp. 332–338.
 40. Kadhim, M., Salomaa, S., Wright, E., Hildebrandt, G., Belyakov, O.V., Prise, K.M., and Little, M.P., Non-targeted effects of ionising radiation. Implications for low dose risk, *Mutat. Res.*, 2013, vol. 752, no. 1, pp. 84–98.
 41. Holtorf, H., Guitton, M., and Reski, R., Plant functional genomics, *Naturwissenschaften*, 2002, vol. 89, no. 6, pp. 235–249.
 42. de la Fuente van Bentem, S., Roitinger, E., Anrather, D., Csaszar, E., and Hirt, H., Phosphoproteomics as a tool to unravel plant regulatory mechanisms, *Physiol. Plant.*, 2006, vol. 126, no. 1, pp. 110–119.
 43. van Wijk, K.J., Challenges and prospects of plant proteomics, *Plant Physiol.*, 2001, vol. 126, no. 2, pp. 501–508.

44. Lilley, K.S., and Dupree, P., Methods of quantitative proteomics and their application to plant organelle characterization, *J. Exp. Bot.*, 2006, vol. 57, no. 7, pp. 1493–1499.
45. Rashydov, N.M., and Hajduch, M., Chernobyl seed project. Advances in the identification of differentially abundant proteins in a radio-contaminated environment, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, p. 493.
46. Azimzadeh, O., Atkinson, M.J., and Tapio, S., Proteomics in radiation research: present status and future perspectives, *Radiat. Environ. Biophys.*, 2014, vol. 53, no. 1, pp. 31–38.
47. Hajduch, M., Hearne, L.B., Miernyk, J.A., Castel, J.E., Joshi, T., Agrawal, G.K., Song, Z., Zhou, M., Xu, D., and Thelen, J.J., Systems analysis of seed filling in Arabidopsis: using general linear modeling to assess concordance of transcript and protein expression, *Plant Physiol.*, 2010, vol. 152, no. 4, pp. 2078–2087.
48. Miernyk, J.A., Pretova, A., Olmedilla, A., Klubicova, K., Obert, B., and Hajduch, M., Using proteomics to study sexual reproduction in angiosperms, *Sex. Plant Reprod.*, 2011, vol. 24, no. 1, pp. 9–22.
49. Gallardo, K., Le Signor, C., Vandekerckhove, J., Thompson, R.D., and Burstyn, J., Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation, *Plant Physiol.*, 2003, vol. 133, no. 2, pp. 664–682.
50. Houston, N.L., Hajduch, M., and Thelen, J.J., Quantitative proteomics of seed filling in castor: comparison with soybean and rapeseed reveals differences between photosynthetic and nonphotosynthetic seed metabolism, *Plant Physiol.*, 2009, vol. 151, no. 2, pp. 857–868.
51. Park, E.C., Yoon, J.B., Seong, J.S., Choi, K.S., Kong, E.S., Kim, Y.J., Park, Y.M., and Park, E.M., Effect of ionizing radiation on rat tissue: Proteomic and biochemical analysis, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2006, vol. 36, no. 1, pp. 19–35.
52. Guipaud, O., Holler, V., Buard, V., Tarlet, G., Royer, N., Vinh, J., and Benderitter, M., Time-course analysis of mouse serum proteome changes following exposure of the skin to ionizing radiation, *Proteomics*, 2007, vol. 7, no. 21, pp. 3992–4002.
53. Klubicova, K., Danchenko, M., Skultety, L., Berezna, V.V., Uvačková, L., Rashydov, N.M., and Hajduch, M., Soybeans grown in the Chernobyl area produce fertile seeds that have increased heavy metal resistance and modified carbon metabolism, *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 10, e48169.
54. Klubicova, K., Danchenko, M., Skultety, L., Berezna, V.V., Rashydov, N.M., and Hajduch, M., Radioactive Chernobyl environment has produced high-oil flax seeds that show proteome alterations related to carbon metabolism during seed development, *J. Proteome Res.*, 2013, vol. 12, no. 11, pp. 4799–4806.
55. Millam, S., Obert, B., and Pretova, A., Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – A review, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2005, vol. 82, no. 1, pp. 93–103.
56. Cloutier, S., Niu, Z., Datla, R., and Duguid, S., Development and analysis of EST-SSRs for flax (*Linum usitatissimum* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 2009, vol. 119, no. 1, pp. 53–63.
57. Damude, H.G., and Kinney, A.J., Engineering oilseed plants for a sustainable, land-based source of long chain polyunsaturated fatty acids, *Lipids*, 2007, vol. 42, no. 3, pp. 179–185.
58. Wang, Z., Hobson, N., Galindo, L., Zhu, S., Shi, D., McDill, J., Yang, L., Hawkins, S., Neutelings, G., Datla, R., Lambert, G., Galbraith, D.W., Grassa, C.J., Geraldes, A., Cronk, Q.C., Cullis, C., Dash, P.K., Kumar, P.A., Cloutier, S., Sharpe, A.G., Wong, G.K.-S., Wang, J., and Deyholos, M.K., The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled de novo from short shotgun sequence reads, *Plant J.*, 2012, vol. 72, no. 3, pp. 461–473.
59. Venglat, P., Xiang, D., Qiu, S., Stone, S.L., Tibiche, C., Cram, D., Alting-Mees, M., Nowak, J., Cloutier, S., Deyholos, M., Bekkaoui, F., Sharpe, A., Wang, E., Rowland, G., Selvaraj, G., and Datla, R., Gene expression analysis of flax seed development, *BMC Plant Biol.*, 2011, vol. 11, p. 74.
60. Gutierrez, L., Conejero, G., Castelain, M., Guénin, S., Verdeil, J.L., Thomasset, B., and van Wuytswinkel, O., Identification of new gene expression regulators specifically expressed during plant seed maturation, *J. Exp. Bot.*, 2006, vol. 57, no. 9, pp. 1919–1932.
61. Barvkar, V.T., Pardeshi, V.C., Kale, S.M., Kadoo, N.Y., Giri, A.P., and Gupta, V.S., Proteome profiling of flax (*Linum usitatissimum*) seed: Characterization of functional metabolic pathways operating during seed development, *J. Proteome Res.*, 2012, vol. 11, no. 12, pp. 6264–6276.
62. Chung, M.W.Y., Lei, B., and Li-Chan, E.C.Y., Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.), *Food Chem.*, 2005, vol. 90, no. 1–2, pp. 271–279.
63. Hradilova, J., Rehulka, P., Rehulkova, H., Vrbova, M., Griga, M., and Brzobohaty, B., Comparative analysis of proteomic changes in contrasting flax cultivars upon cadmium exposure, *Electrophoresis*, 2010, vol. 31, no. 2, pp. 421–431.
64. Klubicova, K., Bercak, M., Danchenko, M., Skultety, L., Rashydov, N.M., Berezna, V.V., Miernyk,

- J.A., and Hajduch, M., Agricultural recovery of a formerly radioactive area. I. Establishment of high-resolution quantitative protein map of mature flax seeds harvested from the remediated Chernobyl area, *Phytochemistry*, 2011, vol. 72, no. 10, pp. 1308–1315.
65. Lenski, R.E., Wisser, M.J., Ribeck, N., Blount, Z.D., Nahum, J.R., Morris J.J., Zaman, L., Turner, C.B., Wade, B.D., Maddamsetti, R., Burmeister, A.R., Baird, E.J., Bundy, J., Grant, N.A., Card, K.J., Rowles, M., Weatherspoon, K., Papoulis, S.E., Sullivan, R., Clark, C., Mulka, J.S., Hajela, N., Sustained fitness gains and variability in fitness trajectories in the long-term evolution experiment with *Escherichia coli*, *Proc. Biol. Sci.*, 2015, vol. 282, no. 1821, doi: 10.1098/rspb.2015.2292.
66. Danchenko, M., Skultety, L., Rashydov, N.M., Berezhna, V., Matel, L., Salaj, T., Pretova, A., and Hajduch, M., Proteomic analysis of mature soybean seeds from the Chernobyl area suggests plant adaptation to the contaminated environment, *J. Proteome Res.*, 2009, vol. 8, no. 6, pp. 2915–2922.
67. Aghaei, K., Ehsanpour, A.A., Shah, A.H., and Komatsu, S., Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress, *Amino Acids*, 2009, vol. 36, no. 1, pp. 91–98.
68. Gabrisova, D., Klubicova, K., Danchenko, M., Gormory, D., Berezhna, V.V., Skultety, L., Miernyk, J., Rashydov, N., and Hajduch, M., Do cupins have a function beyond being seed storage proteins? *Front. Plant Sci.*, 2016, vol. 6, p. 1215.

Надійшла 01.08.16