

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2023 г. С.С. Тарасов*,#, Е.К. Крутова*

*Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия,
пр. Гагарина, 97, Нижний Новгород, 603022, Россия

#E-mail: tarasov_ss@mail.ru

Поступила в редакцию 27.09.2021 г.

После доработки 21.07.2022 г.

Принята к публикации 20.08.2022 г.

Изучено влияние продолжительности ультразвукового воздействия (5, 10 и 20 мин) с интенсивностью 25 кВт/м² и частотой 26.1 кГц на уровень перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков, активность цистеиновых протеиназ и экспрессии гена цистеиновой протеиназы в прорастающих семенах гороха. Показано, что интенсивность в области локализации семян, т.е. непосредственно над центральным пьезопреобразователем, распределялась достаточно равномерно, но при этом носила диффузный характер. Наблюдалась разнонаправленная тенденция изменения исследуемых показателей в ответ на ультразвуковое воздействие. Уровень малонового диальдегида возрастал с увеличением времени воздействия. Повышенное содержание окисленных белков зафиксировано в прорастающих семенах гороха при десятиминутном действии ультразвука, тогда как при двадцатиминутном воздействии выявлено снижение уровня окислительной модификации белков. Активность цистеиновых протеиназ была выше в семенах гороха после пятиминутного воздействия ультразвуком, а содержание транскриптов иРНК возрастало во всех опытных образцах.

Ключевые слова: ультразвуковое воздействие, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов, цистеиновые протеиназы, прорастание семян.

DOI: 10.31857/S000630292303016X, EDN: FSPRQM

Прорастания семян – это ключевой этап роста и развития растений, который до конца еще не исследован. Важное значение на данном этапе принадлежит процессам катаболизма, в том числе, дыханию и гидролизу веществ, содержащихся в запасных тканях [1–3]. Ключевыми ферментами прорастания являются гидролазы, расщепляющие запасные вещества до мономеров, включающихся в общий метаболизм [4–6]. Одними из наиболее значимых ферментов данного класса для прорастания семян гороха являются цистеиновые протеиназы. По их активности можно судить об уровне катаболизма прорастающих семян.

Исследования влияния ультразвука на прорастание семян представляют как теоретический интерес, для понимания механизмов ответа расте-

ния на действия ультразвуковой волны, так и практический, дающий возможность оценки перспектив его применения в растениеводстве. В литературе имеются данные по влиянию ультразвука на морфофизиологические показатели прорастания различных растений [7–11]. Однако мало внимания уделено его воздействию на уровень окислительного гомеостаза и гидролиза запасного вещества при прорастании семян. Это формирует определенный пробел в понимании его комплексного физиологического действия.

Значительный интерес представляет изучение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12, 13] и окислительной модификации белков (ОМБ) [14], свидетельствующих об окислительном гомеостазе, который является важным параметром оценки степени ультразвукового воздействия, как возможного модифицирующего фактора [15, 16].

Особый интерес в исследовании содержания окисленных метаболитов представляет определение продуктов ОМБ в прорастающих семенах го-

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов, ОМБ – окислительная модификация белков, АФК – активные формы кислорода, СР – ген цистеиновой протеиназы, МДА – малоновый диальдегид.

гороха. С одной стороны, в литературе мало информации по вопросам оборота окисленных белков в растениях, с другой стороны, в связи с большим количеством белка, содержащегося в семенах бобовых, именно они чаще всего встречаются с активными формами кислорода (АФК) [17–19], и, как следствие, являются важными маркерами окислительного гомеостаза. Стоит так же отметить, что «сломанные», в том числе окисленные аминокислоты, вероятно, могут встраиваться в синтезируемый белок в процессе трансляции [20–22]. В частности, была показана возможность встраивать канаванин вместо аргинина с использованием белоксинтезирующего комплекса *E. coli* [23], алкилированного D-аланина – в пептидогликаны бактерий [24], а также способность мутантов *E. coli* включать алкильные группировки в молекулы белка за счет работы тиразил-тРНК-синтазы [25]. Однако процесс встраивания «сломанных» аминокислот – нечастое явление, так как система защиты создаваемых белков от бракованных аминокислот работает довольно хорошо.

Известно, что в настоящее время расшифровано множество геномов, в том числе и у растений (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), протеом же остается не изученным ни у одного организма. Немаловажное значение стоит уделять именно обороту окисленных белков и аминокислот, как одного из возможных факторов формирования протеома.

У гороха именно белки являются ключевыми запасными веществами, которые на стадии прорастания претерпевают существенный метаболизм [26–29], с этой точки зрения горох является удобной модельной культурой.

На основании сказанного целью работы явилось изучение влияния продолжительности ультразвукового воздействия на уровень ПОЛ, ОМБ, активность цистеиновой протеиназы и экспрессию ее гена (СР) в прорастающих семенах гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали семена гороха посевного (*Pisum sativum*), сорта «Альбумен». Семена обрабатывали ультразвуком через 24 ч после замачивания. Исследуемые семена общей массой 50 г помещали в центр ультразвуковой ванны UM-4 (LABIMEX, Польша), имеющей три пьезоэлектрических преобразователя, встроенных в центральную часть ее дна. Семена были размещены непосредственно на дне ванны одним слоем без применения каких-либо сосудов, их удерживали в центре с помощью пластиковых пластин, образовавших барьер по периферии центрального пьезопреобразователя высотой 2 см. Используемые в работе семена

были откалиброваны по массе и размеру и являлись морфологически идентичными. Ультразвуковая ванна имела следующие характеристики: частота – 26.1 кГц, характерная максимальная амплитуда акустического давления (p) – 250 ± 20 кПа, интенсивность излучения – 25 кВт/м^2 , объем – 4 л, размеры ванны – длина 260 мм, ширина 160 мм, глубина 120 мм. Для определения параметров воздействующего ультразвука использовали метод визуализации распределений интенсивностей в ультразвуковых пучках и кавитационных микропузырьков, генерируемых пьезопреобразователями, путем визуализации ультразвуковых полей с использованием красителей методом «краска/бумага» предложенным в работах [30, 31], в качестве красителя применяли 0.005%-й водный раствор метиленового синего, регистрируемой пластинкой служила белая офисная бумага размером 260×160 мм. Бумажную пластинку помещали непосредственно на дно ультразвуковой ванны, а также на расстоянии 2 и 10 см от него. Ультразвуковое воздействие на бумажную пластинку проводили в течение минуты. Семена находились в акустическом поле, образованном устойчивой структурой стоячих волн. Обработку проводили в водной среде объемом 3 л в течение 5, 10 и 20 мин, без термостатирования. Температура в течении 20 мин увеличивалась на 7°C (с 24°C до 31°C). Контролем служили одновременно замоченные, но не обработанные ультразвуком семена. По окончании обработки в семенах определяли уровень ПОЛ путем определения содержания малонового диальдегида (МДА), уровень ОМБ – путем определения производных 2,4-динитрофенилгидразина, активность тиоловой протеиназы и экспрессию ее гена. Гомогенизацию семян осуществляли в течении 30 мин после обработки ультразвуком целиком, в случае исследования экспрессии гена использовали только зародышевую ткань. Навески всех исследуемых групп в рамках применяемой методики имели равное количество семян. Содержание МДА определяли согласно методике, основанной на его способности реагировать с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенных производных [32]. Продукты ОМБ определяли по методике, основанной на способности окисленных белков взаимодействовать с 2,4-динитрофенилгидразином [33] с авторской модификацией, применимой к растительным объектам. Растительный материал массой 1 г растирали в форфоровой ступке с 9 мл фосфатного буфера (рН 7.2), полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 3000 g. К 0.1 мл супернатанта добавляли 1 мл 10 mM 2,4-динитрофенилгидразина, растворенного в 1 M HCl, инкубировали в течении 60 мин, по окончании инкубации добавляли 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты, затем центрифугировали 15 мин при 3000 g. Надосадочную жидкость

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для проведения ПЦР

№	Ген	Тип праймера	Последовательность 5'–3'	Номер NCBI	Температура отжига	Размер ампликона
1	CP	F:	ACATCACCTTGGGTGCTGAG	AJ278699.1	60.00°C	292 bp
		R:	CATGCACCACCTCAAATGCC		60.00°C	
2	Act	F:	AACCGGAATGGTTAAGGCTG	U81047.1	59.86°C	84 bp
		R:	AAGCGGAGCTTCAGTGAGAA		60.11°C	

сливали, осадок промывали трижды раствором этанол/ацетон в соотношении 1:1, далее осадок просушивали в течение 12 ч и ресуспендировали в 3 мл 8 М мочевины в закрытых пробирках на водяной бане. После полного растворения осадка пробирки охлаждали и измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре СФ-2000 (ЛОМО, Россия) при четырех длинах волн: 356 нм – соответствует алифатическим альдегид-динитрофенилгидразонам нейтрального характера, 370 нм – алифатическим альдегид-динитрофенилгидразонам основного характера, 430 нм – алифатическим кетон-динитрофенилгидразонам нейтрального характера и 530 нм – алифатическим кетон-динитрофенилгидразонам основного характера. Активность протеиназ определили по методике Ансона [34]. Экспрессию гена *CP* в прорастающих семенах определяли полуколичественно с помощью полимеразной цепной реакции по конечной точке с последующей визуализацией в агарозном геле [35]. Для этого 0.05 г растительного материала зародышевой ткани гомогенизировали с использованием набора «ExtractRNA» для выделения тотальной РНК («Евроген», Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции ОТ-1 с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами («Синтол», Россия). В качестве референсного гена использовали ген актина. Подбор праймеров проводили по кодирующему участку гена в программе Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Полученные олигонуклеотиды представлены в табл. 1.

Количественную оценку ампликонов проводили путем анализа агарозного геля и выражали в условных (относительных) единицах [36].

Результаты обрабатывали статистически; рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартные отклонения (σ) с использованием программы Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано пространственное распределение интенсивностей в ультразвуковом пучке, формируемом тремя пьезопреобразователями в ультразвуковой ванне, как в горизонтальном, так и в вертикальном сечении ультразвукового пучка. Данное распределение обусловлено сложной интерференционной картиной волн, формируемой как за счет расположения пьезопреобразователей (рис. 1), так и за счет отражения волн от стенок ванны. Так, на дне ванны области с наибольшей интенсивностью локализованы непосредственно над пьезопреобразователями, а также на двух участках между ними (рис. 1а), на периферии интенсивность распределялась в виде параллельных дорожек. На расстоянии 2 см от дна ванны было показано распределение интенсивностей над пьезопреобразователями (рис. 1б). На расстоянии 10 см наблюдалось более равномерное распределение интенсивности ультразвуковой волны по сравнению с предыдущими картинками распределения интенсивностей ультразвука (рис. 1в).

Пространственное распределение кавитационных микропузырьков отражает пространственное распределение интенсивностей в ультразвуковом пучке.

Стоит отметить, что интенсивности в области локализации семян, т.е. непосредственно над центральным пьезопреобразователем на дне и на 2 см выше распределялись достаточно равномерно. Таким образом, на прорастающие семена в достаточном количестве и равномерно оказывалось воздействие ультразвуком высокой интенсивности, сопровождающимся генерацией кавитационных микропузырьков, с изменением редокс-равновесия. Воздействие осуществлялось одновременно по трем механизмам: а) за счет механических колебаний в среде и объекте исследования, увеличения микротечений в среде и вокруг объекта воздействия; б) за счет теплового воздей-

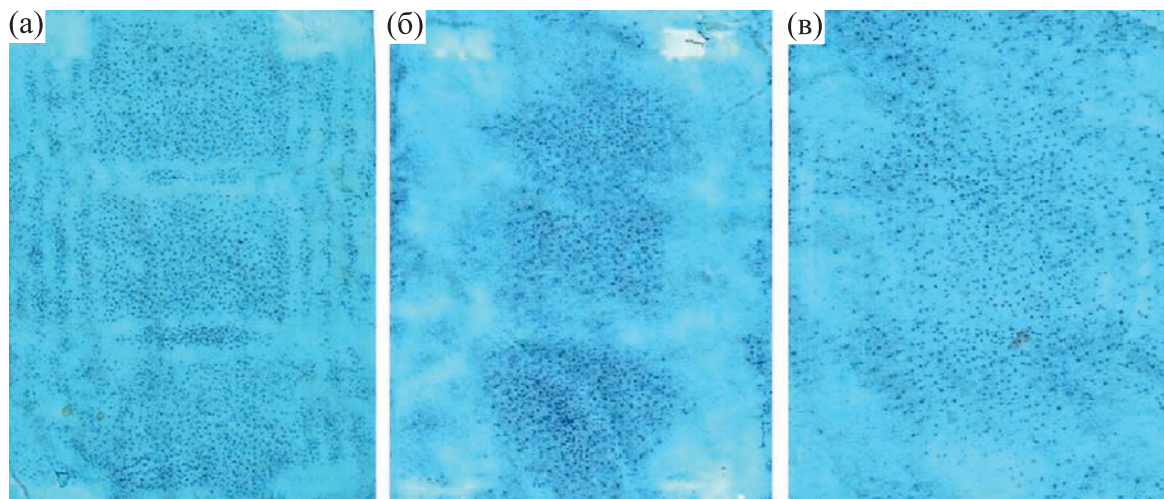


Рис. 1. Распределение интенсивностей ультразвуковой волны, зарегистрированных методом «краска/бумага», в ультразвуковой ванне УМ-4 в сечении пучка при средней интенсивности 25 кВт/м^2 и времени облучения 1 мин: на дне установки (а), на расстоянии 2 см (б) и 10 см (в) от пьезоэлектрических преобразователей.

ствия вследствие поглощения ультразвуковых волн; в) за счет интенсификации процессов массообмена вблизи колеблющихся кавитационных ми кропузырьков, возможных разрывов различного типа связей за счет кавитации, возможного кавитационного повреждения клеточных мембран и оболочек исследуемого объекта.

Было выявлено неоднозначное действие ультразвука на изучаемые показатели. Наблюдалось увеличение содержания МДА во всех прорастающих семенах, подверженных ультразвуковому воздействию, но существенное усиление процессов ПОЛ показано после 20-минутного воздей-

ствия ультразвуком, что проявилось в увеличении содержания МДА в несколько раз относительно контроля ($P \leq 0.05$) (рис. 2а).

Интересно отметить, что окисленные метаболиты белковой природы вели себя иначе, чем метаболиты липидной природы. Не было замечено статистически значимых отличий в суммарном содержании 2,4-динитрофенилгидразонов в образцах, на которые воздействовали ультразвуком в течение 5 мин ($P \geq 0.05$). Однако в прорастающих семенах, на которые действовали ультразвуком в течение 10 мин, наблюдалось увеличение содержания окисленных метаболитов, а в образ-

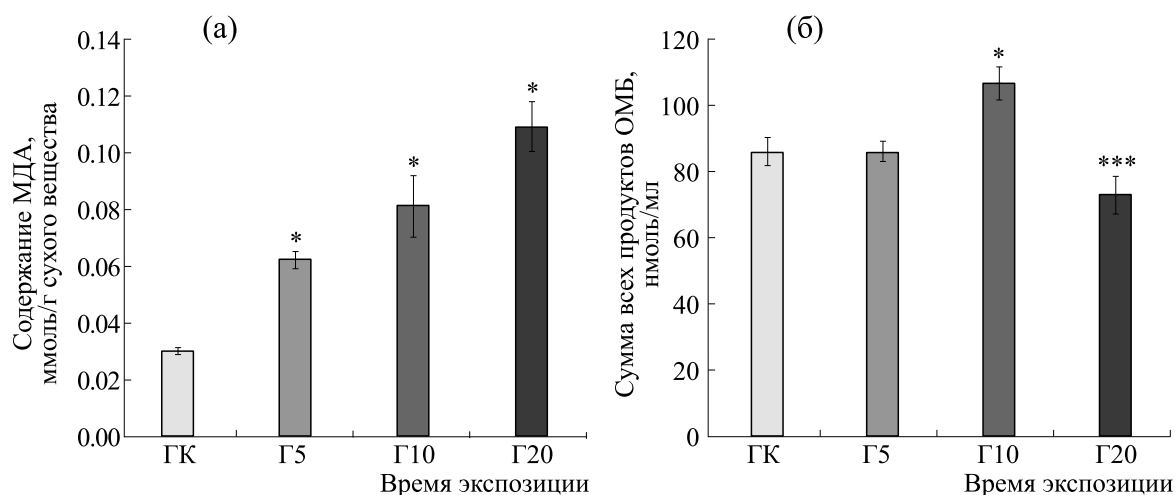


Рис. 2. Содержание МДА (а) и сумма всех продуктов ОМБ (б) в прорастающих семенах гороха в зависимости от продолжительности ультразвукового воздействия: ГК – контроль, Г5, Г10 и Г20 – прорастающие семена были подвержены ультразвуковому воздействию в течение 5, 10 и 20 мин соответственно; * – $p \leq 0.05$ относительно контроля по критерию Стьюдента; *** – $p \leq 0.05$ относительно предыдущей опытной группы по критерию Стьюдента.

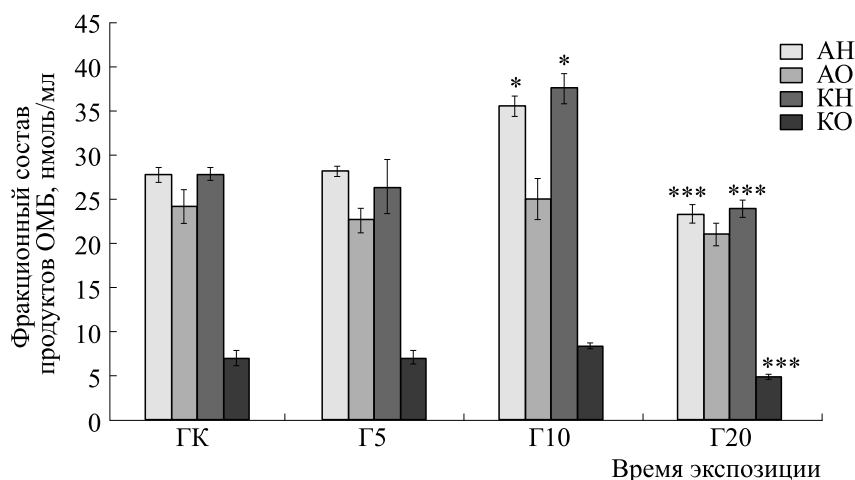


Рис. 3. Фракционный состав продуктов ОМБ 2,4-динитрофенилгидразонов в прорастающих семенах гороха в зависимости от продолжительности ультразвукового воздействия: АН — алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, АО — алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера, КН — алифатические кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, КО — алифатические кетон-динитрофенилгидразоны основного характера. Остальные обозначения как на рис. 2.

цах после 20-минутного ультразвукового воздействия, напротив, было зафиксировано снижение суммарного содержания 2,4-динитрофенилгидразонов ($P \leq 0.05$) (рис. 2б).

Резюмируя динамику содержания продуктов ПОЛ и ОБМ, можно отметить ее независимость относительно точек ультразвукового воздействия. Так, чем длительнее было действие ультразвука, тем больше накапливалось МДА в прорастающих семенах, а в случае с окисленными белками наблюдалось вначале накопление продуктов, а далее прослеживалась тенденция снижения количества продуктов. Фактически наблюдались более резкие колебания в содержании продукта ПОЛ по сравнению с продуктами ОМБ. Вероятно, это связано с большим содержанием белка в запасных тканях, которые слабо подвержены действию АФК на ранних этапах прорастания семян, а также большим содержанием ферментов белкового обмена, в том числе входящих в состав протеасом, которые, в свою очередь, участвуют в деградации окисленных белков [37–41]. Например, ряд авторов рассматривает протеолитический комплекс как вторичную антиоксидантную защиту, которая, по сути, регулирует оборот окисленных белков [14, 42].

На рис. 3 представлен фракционный состав исследуемых продуктов ОМБ. Отчетливо видно преобладание альдегид и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера, при этом не наблюдается преобладание какого-либо из этих продуктов. Содержание же алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов основного характера ниже. Стоит так же отметить явный перевес в содержании альдегид-динитрофенилгид-

разонов по сравнению с кетон-динитрофенилгидразонами.

Важным показателем является не только общее количество карбонильных групп белков и их фракционный состав, но и соотношение первичных (альдегидных) и вторичных (кетонных) группировок [43]. По их соотношению можно судить о степени фрагментации и агрегации окисленных белков [44]. На рис. 4 показано соотношение первичных и вторичных маркеров ОМБ относительно общего содержания всех карбонильных производных белков. Как было сказано выше, во всех группах преобладают первичные маркеры ОМБ, при этом их максимальное количество зафиксировано в образцах подверженных 10-минутному ультразвуковому воздействию. Во всех остальных группах показано примерно равное соотношение первичных и вторичных маркеров ОМБ. Если рассматривать их соотношение в динамике, можно сказать, что при воздействии ультразвуком в течении 5 мин соотношение маркеров ОМБ не изменяется, 10-минутное ультразвуковое воздействие увеличивало долю первичных маркеров, а 20-минутное воздействие, напротив, приводило к повышению вторичных маркеров по сравнению с образцами после 10-минутного ультразвукового воздействия.

Для более глубокого понимания влияния времени ультразвукового воздействия на уровень окислительного гомеостаза прорастающих семян гороха были изучены некоторые детали оборота окисленных продуктов. Одним из механизмов безусловно является протеолиз запасного вещества семени, у бобовых растений, в том числе и у гороха, это белки, окисление которых было рас-

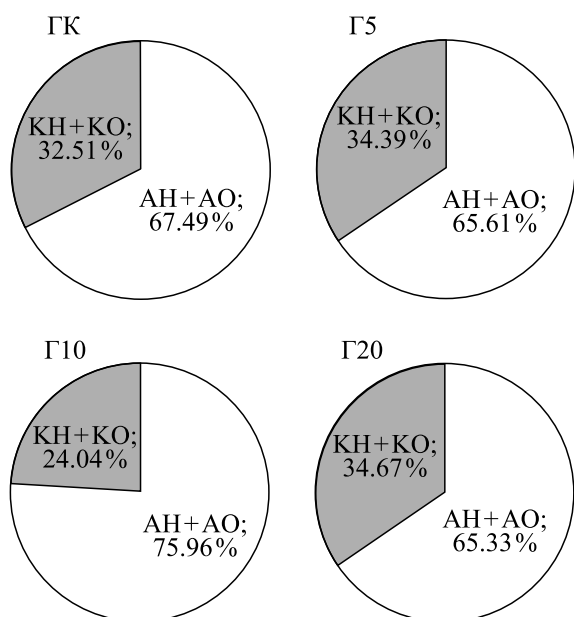


Рис. 4. Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков. Обозначения как на рис. 2.

смотрено выше. Ключевыми ферментами, участвующими на начальных этапах прорастания семян растений, являются кислые протеиназы [45], в том числе цистеиновые протеиназы. Так как реакции карбонилирования белков — необратимый процесс, для нормальной жизнедеятельности клетка осуществляет их деградацию путем протеолиза [46].

Изучая активность данного фермента, мы выявили ее усиление в образцах, подверженных 5-минутному ультразвуковому воздействию, по-

сле чего активность начинает падать и становится существенно ниже контрольного значения (рис. 5а). По-видимому, схожим образом проходила и экспрессия гена *CP*. На рис 5б показана динамика накопления транскриптов иРНК данного гена. Стоит отметить существенное усиление транскрипции в образцах, подверженных 5-минутному ультразвуковому воздействию. В семенах, на которые воздействовали ультразвуком в течении 10 и 20 мин, содержание транскриптов не сильно отличается от образцов после 5-минутного действия ультразвуком. Это может свидетельствовать об отсутствии дозозависимости экспрессии данного гена, а также о стимулирующем эффекте ультразвукового воздействия интенсивностью 25 кВт/м² и частотой 26.1 кГц в течении 5–20 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обсуждая и интерпретируя полученные результаты, стоит выделить ряд ключевых аспектов, связанных с эффектом ультразвукового воздействия на живые объекты. В частности, это образование кавитационных микропузырьков, как в водном растворе, так и в биологических тканях, эффект генерации электродвижущей силы (соно-ЭДС) на мембранах клеток, тепловыделение в биологических тканях, обусловленное акустическими и механическими свойствами [30, 47] и влияние ультразвука на отдельные молекулы в водных растворах [48] с учетом особенностей используемого объекта исследований.

Так, известно, что в водной среде в результате соносенсibilизированных реакций образуются отрицательно заряженные кавитационные микропузырьки [49], в состав которых входят АФК

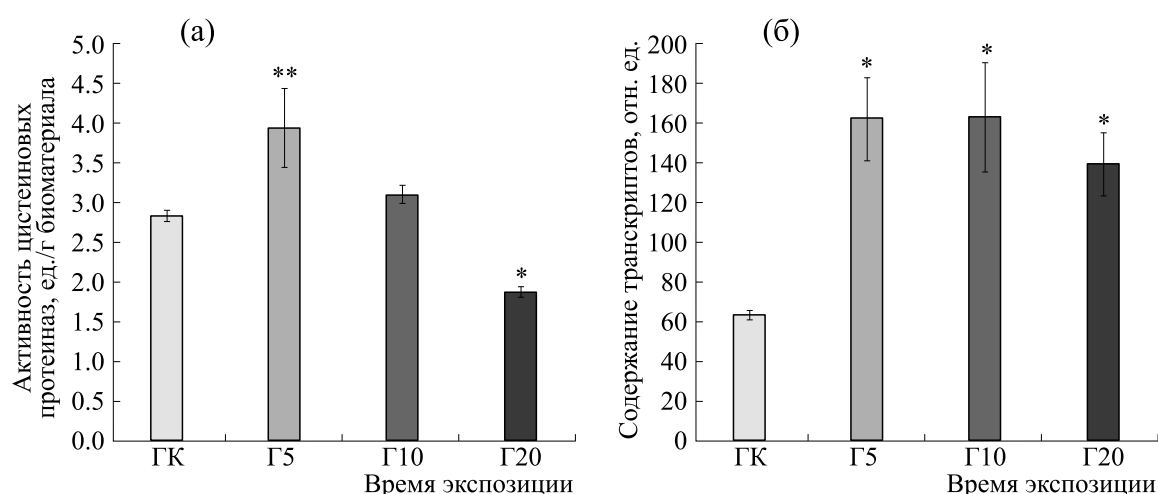


Рис. 5. Активность цистеиновых протеиназ (а) и экспрессия гена *CP* (б) в прорастающих семенах гороха в зависимости от продолжительности ультразвукового воздействия. ** — Достоверные различия в сравнении с контролем по критерию Крускала–Уоллиса, остальные обозначения как на рис. 1.

[48], а интенсивность их генерации, количество и природа будут обусловлены показателями ультразвука (мощностью, частотой), временем воздействия и природой раствора. Выявлена способность ультразвука усиливать мембранную проницаемость [50] и образовывать микротрещины в семенной коже [51], что может способствовать выходу продуктов гидролиза запасных веществ семян в водный раствор, с одной стороны и проникновение АФК, образовавшихся в результате ультразвуковой кавитации в воде, с другой стороны. Ряд работ показывает, что ароматические вещества способны усиливать образование АФК под действием ультразвука [48, 52], а, следовательно, можно сделать предположение о некой цепной сонохимической реакции в биосистемах, богатых ароматическими соединениями. В частности, при усиленном гидролизе белка в среду поступают ароматические аминокислоты, которые, по-видимому, могут являться катализаторами образования АФК, что, в свою очередь, способствует усилению свободнорадикальных процессов в водной среде, в которой находились прорастающие семена. В работах [30, 49] также было показано образование кавитационных микропузырьков в биологических тканях, что, безусловно, не могло не сказываться на процессах окисления биомолекул, в том числе исследуемых липидов и белков.

Таким образом, основными причинами усиления процессов ПОЛ и ОМБ в прорастающих семенах гороха вероятнее всего можно считать:

- усиление мембранной проницаемости, и образование микротрещин в семенной коже, что, по-видимому, усиливало мембранный транспорт в обоих направлениях, в том числе приводило к увеличению проникновения АФК, образовавшихся в водной среде в результате генерации кавитационных микропузырьков;

- выход ароматических соединений из семян в водную среду в результате образования микротрещин в семенной коже и усилении мембранной проницаемости, что способствовало увеличению степени генерации АФК, которые, в свою очередь, проникали внутрь тканей семян;

- механическое и тепловое воздействие на клеточные структуры семян, что могло приводить к нарушению функционирования электронно-протонного транспорта, в том числе митохондриальной электронно-транспортной цепи, что, в свою очередь, усиливало утечку электронов и образование АФК;

- образование кавитационных микропузырьков в тканях прорастающих семян гороха, компонентами которых являются АФК.

АФК, образовавшиеся в результате ультразвуковой кавитации, вероятнее всего участвуют в окислении биологических молекул, в том числе

исследуемых в работе липидов и белков [53–57], что объясняет усиление процессов ПОЛ и ОМБ в прорастающих семенах после ультразвукового воздействия. Однако в работе показано и снижение содержания исследуемых метаболитов (продуктов ОМБ). Известно, что ультразвуковое воздействие заранее окисленного белка способствовало увеличению степени его растворения [58], однако длительное воздействие ультразвука на неокисленный белок, напротив, способствовало его агрегации и снижало степень растворимости [59, 60]. Вероятнее всего, 5-минутное ультразвуковое воздействие только запускало процессы ОМБ, а его прерывание фактически не приводило к существенному изменению содержания продуктов ОМБ. Действие ультразвука на прорастающие семена гороха в течение 10 мин, возможно, в полной мере активировали свободнорадикальные процессы, что выражалось в увеличении первичных продуктов ОМБ (альдегидных группировок). Несмотря на то, что количество регистрируемых продуктов ОМБ при ультразвуковом воздействии в течение 20 мин уменьшалось, само воздействие, вероятнее всего, продолжало усиливать деструктивные процессы. Исходя из процентных соотношений первичных и вторичных продуктов ОМБ в прорастающих семенах после 20-минутного ультразвукового воздействия, которые приближались к контрольным значениям и процентным соотношениям продуктов ОМБ в прорастающих семенах, подвергнутых 10-минутному ультразвуковому воздействию (рис. 3), можно предположить, что происходило существенное увеличение вторичных продуктов (кетонных группировок), однако из-за того, что данных продуктов было много, они с высокой долей вероятности агрегировали между собой, образуя белковые конгломераты за счет формирования битиризиновых сшивок [61], S–S-сшивок и конъюгации с продуктами окисления, что в итоге затрудняло их фиксацию и визуально демонстрировало их снижение [14, 62].

Усиление активности цистеиновой протеиназы в образцах, подвергавшихся 5-минутному воздействию ультразвуком, можно объяснить увеличением общей доступности белкового субстрата для фермента. Последующее падение активности, вероятно, связано как с прямым действием ультразвука, так и с действием АФК на структуру фермента, что приводит к нарушению его конформации, а следовательно, существенно снижает как процесс образования фермент-субстратных комплексов, так и регуляцию работы молекулы фермента.

Усиление уровня экспрессии гена *CP* в прорастающих семенах при кратковременном воздействии на них ультразвуком согласуется с литературными данными. Например, было показано усиление экспрессии гена оксигеназы-1 в эндоте-

лиях при воздействии с частотой 1 МГц при интенсивности 0.3 Вт/см^2 в течение 20 с [63]. Возможной причиной активации экспрессии гена *CP* можно назвать снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов и увеличение концентрации АФК, которые генерируются за счет ультразвукового воздействия и являются сигнальными веществами для активации протеолитического комплекса [64]. Также известно, что увеличение содержания АФК характерно для стареющей клетки, а в ряде работ демонстрировалось усиление уровня экспрессии генов цистеиновых протеиназ в стареющих участках растений [65–67]. Таким образом, можно предположить, что данное явление наблюдается при увеличении содержания АФК, вызванном иными факторами, в том числе и ультразвуковым воздействием. Содержание транскриптов иРНК больше во всех опытных образцах. Однако об усилении экспрессии гена достоверно можно судить только в образцах, на которые действовали ультразвуком в течение 5 мин, так как в остальных объектах могут некоторое время сохраняться наработанные транскрипты, образованные в первые минуты действия ультразвуком. Это наталкивает на мысль об ингибирующем влиянии длительного воздействия ультразвука на процессы транскрипции. По видимому, этому способствуют дезактивация ферментов транскрипции, а также воздействие ультразвука на структуру ДНК через разрыв сахаро-фосфатного остова, что требует включения репарирующих механизмов, а следовательно, замедляется процесс транскрипции [68, 69]. Как было сказано ранее, увеличение содержания АФК в клетках по-видимому активирует протеолиз, но это происходит до определенного момента, после которого концентрация АФК достигает такого значения, при котором их разрушительное действие на структуры ферментов превалирует над их стимулирующим эффектом. Следовательно, одной из причин замедления накопления транскриптов в образцах, обработанных ультразвуком в течение 10 и 20 мин, можно считать действие АФК на структуру ДНК и ферменты транскрипции, вызывающее их окисление [70].

ВЫВОДЫ

1. Продолжительность ультразвукового воздействия неоднозначно повлияла на уровень окислительного гомеостаза прорастающих семян гороха. Было показано увеличение содержания МДА во всех опытных группах подверженных ультразвуковому воздействию. Содержание производных 2,4-динитрофенилгидразина статистически значимо не изменялось в прорастающих семенах, подверженных ультразвуковому воздействию в течение 5 мин, увеличивалось в образцах,

на которые воздействовали ультразвуком в течение 10 мин и снижалось в семенах, обработанных ультразвуком в течение 20 мин.

2. Активность цистеиновых протеиназ была выше контроля в образцах, на которые воздействовали ультразвуком 5 мин; в семенах, обработанных в течение 20 мин, активность данного фермента снижалась.

3. Содержание транскриптов иРНК было больше во всех опытных образцах, что может свидетельствовать об отсутствии дозозависимой экспрессии гена *CP*, а также о стимулирующем эффекте ультразвукового воздействия интенсивностью 25 кВт/м^2 и частотой 26.1 кГц в течение 5–20 мин на суточные прорастающие семена.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. H. J. Leveau and S. E. Lindow, Appl. Environ. Microbiol., **71** (5), 2365 (2005).
2. Ю. В. Сеницына, Я. В. Середнева, А. П. Веселов и В. С. Сухов, Современные проблемы науки и образования, № 6, 1374 (2014).
3. Ю. В. Сеницына, Л. Н. Олюнина, Е. К. Крутова и др., Современные проблемы науки и образования, № 6, 663 (2015).
4. C. Han and P. Yang, Proteomics, **15** (10), 1671 (2015).
5. S. Penfield, Curr. Biol., **27** (17), 874 (2017).
6. H. Nonogaki, J. Integr. Plant Biol., **61** (5), 541 (2019).
7. Q. Wang, G. Chen, H. Yersaiyiti, et al., PLoS One, **7** (10), 47204 (2012).
8. X. Liu, C. Zhao, Q. Liu, et al., Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, **29** (6), 1857 (2018).
9. A. C. Miano, Food Res. Int., **106**, 928 (2018).
10. A. C. Miano and V. D. Sabadoti, J. Food Sci., **84** (11), 3179 (2019).
11. J. Ding, J. Johnson, Y. Fang Chu, and H. Feng, Food Chem., **283**, 239 (2019).
12. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, Перекисное окисление липидов в биологических мембранах (Наука, М., 1972).
13. J. M. C. Gutteridge, Clin. Chem., **41** (12), 1828 (2005).
14. Е. Е. Дубинина, Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (Медицинская пресса, СПб., 2006).
15. G. Noctor, C. Lelarge-Trouverie, and A. Mhamdi, Phytochemistry, **112**, 33 (2015).

16. M. A. Farooq, A. K. Niazi, J. Akhtar, et al., *Plant Physiol. Biochem.*, **141**, 353 (2019).
17. J. M. Gebichi, *Redox Rep.* **3** (2), 9 (1997).
18. M. Gracanin, C. L. Hawkins, D. I. Pattison, and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, **47** (1), 92 (2009).
19. C. L. Hawkins, P. E. Morgan, and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, **46** (8), 965 (2009).
20. B. Wiltschi, *Fungal Genetics and Biology*, **89**, 137 (2016).
21. Q. Gan and Ch. Fan, *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*, **1861** (11), Part B., 3047 (2017).
22. J. T. Stieglitz, H. P. Kehoe, M. Lei, and J. A. Van Deventer, *ACS Synth. Biol.*, **7** (9), 2256 (2018).
23. E. G. Worst, M. P. Exner, A. De Simone, et al., *J. Vis. Exp.*, **114**, 54273 (2016).
24. M. S. Siegrist, S. Whiteside, J. C. Jewett, et al., *ACS Chem. Biol.* **8**, 500 (2013).
25. A. Deiters and P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 1521 (2005).
26. L. Tan, S. Chen, T. Wang, and S. Dai, *Proteomics*, **13** (12–13), 1850 (2013).
27. W. Q. Wang, S. J. Liu, S. Q. Song, and I. M. Møller, *Plant Physiol. Biochem.*, **86**, 1 (2015).
28. S. Penfield and D. R. MacGregor, *J. Exp. Bot.*, **68** (4), 819 (2017).
29. T. Steinbrecher and G. Leubner-Metzger, *J. Exp. Bot.*, **68** (4), 765 (2017).
30. Т. Н. Пашовкин, Дис. ... д-ра биол. наук (ИБК РАН, М., 1998).
31. Т. Н. Пашовкин и Г. В. Шильников, *Научное приборостроение*, **10** (3), 17 (2000).
32. И. Д. Стальная и Т. Г. Гаришвили, *Современные методы в биохимии* (Медицина, М., 1977).
33. Е. Е. Дубинина и др., *Вопр. мед. химии*, **41** (1), 24 (1995).
34. И. Ф. Александрова, А. П. Веселов и Ю. Р. Ефременко, *Физиол. растений*, **46** (1), 223 (1999).
35. A. B. Gál, J. W. Carnwath, et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, **18** (3), 365 (2006).
36. T. D. Schmittgen, B. A. Zakrajsek, et al., *Anal. Biochem.*, **285** (2), 194 (2000).
37. K. A. Wilson and A. T. Wilson, *J. Plant Physiol.*, **224–225**, 86 (2018).
38. M. Bourgeois, F. Jacquin, V. Savoie, et al., *Proteomics*, **9** (2), 254 (2009).
39. M. Bourgeois, F. Jacquin, F. Cassecuelle, et al., *Proteomics*, **11** (9), 1581 (2011).
40. Z. X. Lu, J. F. He, Y. C. Zhang, and D. J. Bing, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **60** (15), 2593 (2019).
41. P. Maharjan, J. Penny, D. L. Partington, and J. F. Panozzo, *J. Sci. Food Agric.*, **99** (12), 5409 (2019).
42. C. L. Hawkins and M. J. Davies, *J. Biol. Chem.*, **294** (51), 19683 (2019).
43. Ю. И. Губский и др., *Совр. пробл. токсикологии*, **8** (3), 20 (2005).
44. М. А. Фомина и Ю. В. Абаленихина, *Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации* (РиО РязГМУ, Рязань, 2014).
45. C. E. Salas, M. T. R. Gomes, M. Hernandez, and M. T. P. Lopes, *Phytochemistry*, **69** (12), 2263 (2008).
46. K. J. Davies, *Biochem. Soc. Trans.*, **21** (2), 346 (1993).
47. В. Б. Акопян и Ю. А. Ершов, *Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами* (Изд-во МГТУ, Москва, 2005).
48. W. Duco, V. Grosso, D. Zaccari, and A. T. Soltermann, *Methods*, **109**, 141 (2016).
49. T. N. Pashovkin, P. A. Grigoriev, A. P. Sarvazyan, and H. I. Hein, *Brit. J. Cancer*, **45**, 225 (1982).
50. Е. В. Мельникова, В. К. Утешев, Т. Н. Пашовкин и др., *Биофизика*, **50** (3), 500 (2005).
51. I. López-Ribera and C. M. Vicent, *Plant Methods*, **13** (31) (2017).
52. P. Riesz, D. Berdahl, and C. L. Christman, *Environ. Health Perspect.*, **64**, 233 (1985).
53. P. Riesz, D. Berdahl, and C. L. Christman, *Environ. Health Perspect.*, **64**, 233 (1985).
54. P. Riesz and T. Kondo, *Free Radic. Biol. Med.*, **13** (3), 247 (1992).
55. N. Murano, M. Ishizaki, S. Sato, et al., *Arch. Ophthalmol.*, **126** (6), 816 (2008).
56. K. Okada, N. Kudo, M. A. Hassan, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **16** (4), 512 (2009).
57. Q. A. Zhang, Y. Shen, X. H. Fan, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **27**, 96 (2015).
58. H. Cao, R. Sun, J. Shi, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **77**, 105685 (2021).
59. X. Deng, Y. Ma, Y. Lei, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **76**, 105659 (2021).
60. J. Su and A. Cavaco-Paulo, *Ultrason. Sonochem.*, **76**, 105653 (2021).
61. M. B. Feeney and C. Schöneich, *Antioxid. Redox Signal.*, **17** (11), 1571 (2012).
62. P. Kay, J. R. Wagner, H. Gagnon, et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **26** (9), 1333 (2013).
63. R. Ogawa, A. Watanabe, and A. Morii, *J. Med. Ultrason.*, **42** (4), 467 (2015).
64. K. Groten, C. Dutilleul, P. D. van Heerden, et al., *FEBS Lett.*, **580** (5), 1269 (2006).
65. I. V. Kardailsky and N. J. Brewin, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **9** (8), 689 (1996).
66. B. Belenghi, M. Salomon, and A. Levine, *J. Exp. Bot.*, **55** (398), 889 (2004).
67. S. Li, X. Yang, Y. Zhang, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **31**, 20 (2016).
68. Y. Hoshino, T. Kawasaki, and Y. Okahata, *Biomacromolecules*, **7** (3), 682 (2006).
69. M. H. Ali, K. A. Al-Saad, and C. M. Ali, *Phys. Med.*, **30** (2), 221 (2014).
70. T. Kondo, C. M. Krishna, and P. Riesz, *Free Radic. Res. Commun.*, **6** (2–3), 109 (1989).

Oxidative Homeostasis in Germinating Pea Seeds (*Pisum sativum* L.) Depending on Ultrasonic Exposure Duration

S.S. Tarasov and E.K. Krutova

Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, prosp. Gagarina 97, Nizhny Novgorod, 603022 Russia

The effects of ultrasonic exposure durations (5, 10 and 20 min) with intensity of 25 kW/m² and the frequency of 26.1 kHz on the extent of lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, the activity of cysteine proteinases, and gene expression in germinating pea seeds were studied. It has been shown that the intensity in the area that had seeds planted (just over the central ultrasound generator) was rather uniformly distributed, but at the same time gave rise to diffuse reflection. A range of tendencies in changes of the indicators under study were seen after ultrasound exposure. The level of malonic dialdehyde increased with increasing duration of ultrasound exposure. This study revealed the increased amount of oxidized proteins in germinating pea seeds after a 10 min-exposure to ultrasound, and a decrease in the level of oxidative modification of proteins present in seeds subjected to ultrasound for a period of 20 min. The activity of cysteine proteinases was higher in pea seeds after a 5-min exposure to ultrasound, but the amount of mRNA transcripts increased in all experimental samples.

Keywords: ultrasonic action, oxidative modification of proteins, lipid peroxidation, cysteine proteinases, seed germination