

НЕСТЕРЕНКО О.Г.<sup>✉</sup>, ЛІТВИНОВ С.В., РАШИДОВ Н.М.

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

✉ lenabq@ukr.net

## ЗМІНА ЕКСПРЕСІЇ БІЛКІВ ПІД ЧАС ВЗАЄМОДІЇ СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ У ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ ПІД ВПЛИВОМ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

**Мета.** Метою дослідження є вивчення дії стресорів та їх комбінацій на проростки рослин гороху на молекулярно-біологічному рівні, а саме шляхом дослідження зміни спектра білків, їх якісних та кількісних змін. **Методи.** Для кожної з чотирьох експериментальних груп – контроль, опромінені гамма-променями у дозі 10 Гр рослини, проростки гороху після дії розчину NaCl – в концентрації 0,22 моль/л, рослини після комбінованого впливу опромінення та розчину NaCl було виділено білки та проаналізовано по три гелі після ультрависокоєфективної рідинної хроматографії. **Результати та висновки.** Зміна експресії восьми ідентифікованих білків (transketolase, malate dehydrogenase (43,52 кДа та 41,98 кДа), translation elongation factor EF-2 subunit, 14-3-3-like protein, heat shock cognate protein 80, heat shock cognate 70 kDa-like, 14-3-3-like protein B) підтверджує їх значну роль під час передачі стресових сигналів у процесі формування активної відповіді проростків гороху на пошкоджувальні чинники. Зміна концентрації найбільшої кількості білків спостерігалася у відповідь на поєднаний вплив іонізуючої радіації та засолення.

**Ключові слова:** сигнальні системи, білки, горох, стресові фактори.

Отримання інформації щодо сукупності білків організму, змін у їх складі та концентрації під час розвитку рослин та за зміни умов існування, в тому числі у ході дії різноманітних стресорів, проливає світло на особливості функціонування сигнальних систем. Актуальність дослідження взаємодії сигнальних систем рослин зумовлена, з одного боку, відкриттям нових сигнальних шляхів, з іншого – постійною зміною кількості та інтенсивності абіотичних стресових чинників [1]. Результатом функціонування сигнальних систем під дією стресових факторів є репрограмування експресії генів і синтезу білків, що призводить до змін у метаболічних та біохімічних шляхах. Зміни структури клітин і

молекул у відповідь на стресовий чинник призводять до модифікації фізіологічних функцій, до хромосомних перебудов та інших порушень. Характерною особливістю, наприклад, іонізуючого випромінювання є здатність впливати на організм навіть у малих дозах, причому цей вплив може проявитися через певний час після опромінення [2]. Встановлено, що стійкість до одного зі стресових факторів зумовлює стійкість до інших, у тому числі й до іонізуючого випромінювання. Водночас показано, що дія малих доз радіації за певних умов справляє стимулювальний ефект. Крім того, попередня дія на рослини малих доз радіації може індукувати їх стійкість до наступного опромінення у великих дозах, що дозволяє вести мову про радіоадаптивну реакцію. Також доведена і здатність деяких рослин розвивати системну стійкість до абіотичних факторів, наприклад, до посухи чи підвищених температур після опромінення у стимулюючих дозах [3]. Серед усіх стресових білків найбільш вивченими є білки теплового шоку, зокрема родини БТШ 70 і БТШ 60. Стресові білки активно взаємодіють із фітогормонами, захищають фотосинтетичну активність, беруть участь у формуванні комплексних захисних реакцій [2]. Існують дослідження, присвячені морфометричним змінам та реакціям геному на стреси – гіпертермічний, сольовий, опромінення – та їх комбінації [3]. Зокрема, в умовах засолення негативний вплив пов'язаний як з осмотичним стресом, так і з токсичністю солей. У такому разі відбувається накопичення проміжних продуктів метаболізму, що самі є токсичними, знижується утворення нових білків та підвищується розпад уже утворених білкових комплексів та білків. Ці фактори відбиваються на розвитку та ростових показниках рослин, на метаболічних процесах [4]. Деякі амінокислоти здатні покращити загальний стан рослини, підвищити адаптаційну відповідь організму [5]. Значний інтерес становить з'ясування механізмів регуляції синтезу білків та змін їх

© НЕСТЕРЕНКО О.Г., ЛІТВИНОВ С.В., РАШИДОВ Н.М.

складу за впливу стресових факторів.

Загалом гени первинної відповіді, як правило, кодуєть синтез регуляторних білків, які, у свою чергу, впливають на експресію інших генів, запускаючи так званий «каскадний» механізм гормонально-індукованої зміни експресії комплексу генів, необхідних для регуляції певної онтогенетичної програми [6] та формування відповіді організму в цілому. Окремому вивченню кожного з факторів присвячено багато робіт, кожен стресор зокрема вивчено досить глибоко. Їх же взаємодію, узгодженість специфічних та неспецифічних реакцій організму, спільну роботу сигнально-ефекторних метаболічних каскадів вивчено недостатньо. Нерухомий спосіб життя рослин зумовлює необхідність розвитку захисних механізмів, які стосуються безпосередньо білоксинтезуючої системи та її функціонування. Метою дослідження є вивчення комбінованої дії стресорів на рослини на молекулярно-біологічному рівні, зокрема вивчення зміни спектра білків, їх якісних та кількісних змін.

### Матеріали і методи

У запропонованих нами дослідах насіння гороху пророщують у термостаті в рулонній культурі. Культивування проростків, починаючи з третього дня, відбувалося у водній культурі за температури 24<sup>0</sup>С, освітленості 2286±224 лк і темносвітлового циклу 16 годин світла і 8 годин темряви, природного радіаційного фону (12 мкР/год). На стадії 3-х добових проростків горох піддавався впливу стресорів, після чого продовжував культивуватися у водній культурі. Гостре іонізуюче опромінення було обрано як модифікуючий фактор впливу на відповідь організму. Рослини піддавалися гострому гамма-опроміненню, сумарна доза становила 10 Гр. Крім того, як стресовий чинник використовувалося занурення проростків у сольовий розчин (NaCl) у концентрації 0,22 моль/л на одну годину.

Експеримент полягав у визначенні кількісних та якісних змін білків за умов гострого впливу іонізуючої радіації, засолення та їх комбінації (час між дією стресорів становив 2 години). Для цього було використано методику класичного двовимірного гель-електрофорезу (2-ДЕ). Для першого виміру було використано стрічки з іммобілізованим вузьким градієнтом рН 4-7 для максимального розділення найбільш багатобілкової зони. Для другого виміру вико-

ристовував вертикальний поліакриламід гель-електрофорез (ПАГЕ) протягом 14 годин. Відскановані цифрові зображення аналізувалися комплексним програмним пакетом ImageMaster 2D Platinum версія 4.9 (GE Healthcare), який охоплює оптимізовані алгоритми для виявлення плям, кількісного обрахунку, фільтрування фону та порівняння і співставлення плям. Плями, інтенсивність та площа яких статистично відрізнялися, були вирізані із гелю. Для ідентифікації білків виділені суміші пептидів розділяли шляхом ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ), бази даних та онлайн-інструменти порталу NCBI. Для кожної з чотирьох експериментальних груп (контроль, опромінені рослини, проростки після засолення, проростки після впливу обох стресових чинників) було проаналізовано по три гелі.

Статистична обробка даних проводилася у програмі Excel пакету Microsoft Office 2010 та SPSS 13.0. Перед проведенням статистичних тестів для оцінки достовірності змін масиви експериментальних даних перевірялися на однорідність розподілу повторностей досліду. У зв'язку з високою варіацією даних у якості оцінки концентрації білків було використано медіану. Застосування медіанних оцінок зумовило використання непараметричних критеріїв і статистик для порівняння відмінностей між варіантами досліду і контролем. Тому статистичну значущість відмінностей між експериментальними варіантами перевіряли за допомогою критеріїв У. Манна-Уїтні та Н. Крускала-Волліса [7].

### Результати та обговорення

У результаті проведеного аналізу 2-ДЕ електрофореграм було виокремлено 223 білкові плями, з яких 54 статистично достовірно відрізнялися від контролю хоча б для однієї з експериментальних груп. Серед усіх білків, що були присутні принаймні на двох гелях із трьох, найбільшу кількість склали білки з молекулярною масою від 30 до 60 кДа (51 %), менше третини – білки масою 60–120 кДа (31 %). Найменше виявилось білків із молекулярною масою менше 30 кДа (13 %) та більше 120 кДа (5 %) (рис. 1 а). При цьому розподіл за рІ (ізоелектрична точка) був таким: майже однакова кількість білків з рІ у діапазоні 5–6 та 6–7 (43 % і 41 % відповідно) та 16 % білків з 4–5 рІ (рис. 1 б).

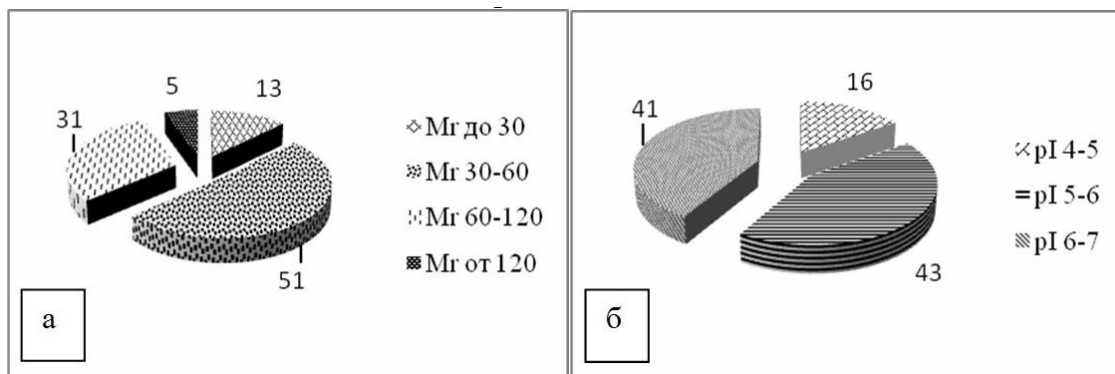


Рис. 1. Розподіл білків за молекулярними масами (а) та рІ (б) на 2-ДЕ електрофореграмах.

Усі білки після проведення статистичної обробки було розділено за рівнем експресії на групи (рис. 2) відповідно до фактора, який мав найбільший вплив на його концентрацію в гелі, тобто інтенсивність його синтезу та деградації.

Зміна концентрації найбільшої кількості білків спостерігалась у відповідь на поєднаний вплив іонізуючої радіації та засолення (11 % загальної кількості виокремлених білків). Частка білків, концентрація яких суттєво змінилася після сольового стресу та опромінення, становила 4,6 % та 5,9 % відповідно (рис. 2 а, б). При цьому частка білків, вміст яких зріс у відповідь на стресори, була найбільшою у варіанті 10Гр+NaCl – 2,5 % (рис. 2 в), дещо менше їх було у варіанті опроміненних проростків (2,1 %), а у рослин після осмотичного шоку вона становила всього 0,8 %.

Вісім плям, що відповідають ідентифіко-

ваним нами білкам, представлено у табл. 1. Деякі з них були ідентифіковані у різних видів рослин, зазвичай близьких до гороху (боби, нут, люцерна, соя), але з високою ймовірністю характерні для проростків гороху.

Два з ідентифікованих білків (№ 7 та 8 у таблиці) належать до білків теплового шоку рослин. Їх молекулярна маса дещо вища за очікувану, що може вказувати на модифікацію білків, приєднання до них невеликих білків, функціональних груп, зміну структури.

Білки родини БТШ 70 запобігають нагромадженню денатурованих поліпептидів, що утворюються внаслідок різних типів стресу, вступають в короткочасні взаємодії з новосинтезованими цитоплазматичними білками, сприяють укладанню останніх у нативну конформацію.

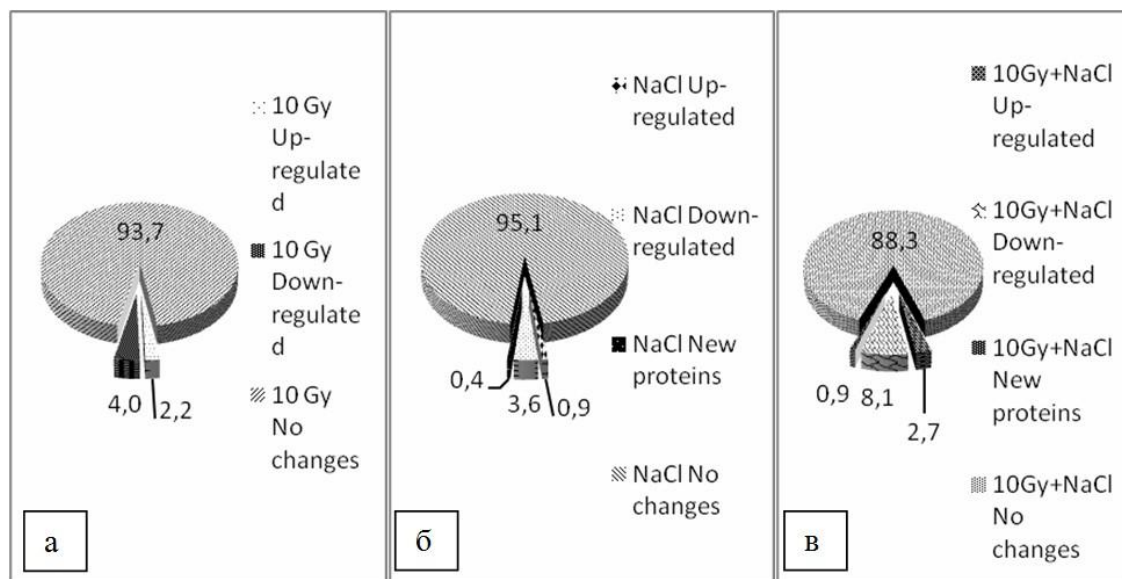


Рис. 2. Зміна концентрації білків у відповідь на дію стресових факторів (опромінення – а, засолення – б) та їх комбінації (в).

Таблиця 1. Дані ідентифікованих білків

Стресові фактори	№ п/п	Ідентифікаційний номер білку «UniProt»	Mr	pI	Білок	Вид рослин, у яких ідентифіковано відповідний білок	Концентрація білку (NaCl, % до контролю)	Концентрація білку (10 Gy, % до контролю)	Концентрація білку (10Gy+NaCl, % до контролю)
10 Gy	1	P42654	34,96	4,8	14-3-3-like protein B	Боб	89	312	0
	2	A0A1S2YLD1	122,37	6,5	Transketolase, chloroplastic	Нут	94	69	130
	3	A0A072TRS0	41,98	6,5	Malate dehydrogenase	Люцерна	17	27	107
NaCl	4	B7FJQ4	43,52	6,7	Malate dehydrogenase	Люцерна	7	169	51
10Gy+NaCl	5	A0A072VT43	47,02	6,0	Translation elongation factor EF-2 subunit	Люцерна	268	194	480
	6	Q9T0N0	34,43	4,9	14-3-3-like protein	Горох	42	222	0
	7	A0A0B2RH95	117,5	5,0	Heat shock cognate protein 80 kDa	Соя	128	151	0
	8	A0A072TV12	89,31	5,2	Heat shock cognate 70 kDa-like protein	Люцерна	113	129	0

Вони присутні в усіх компартментах клітин, крім того, реагують підвищенням концентрації на різні стресові фактори [8]. Цитозольні БТШ 70 беруть участь у транспорті білків через мембрани органел, запобігають деградації білків. Це неспецифічні стресові білки, синтез яких є складовою загального адаптаційного синдрому [9]. Вважається, що механізм захисної дії БТШ 70 зумовлений деагрегацією аномальних білок-білкових взаємодій. Виходячи з отриманих даних, на їх концентрацію більший вплив має іонізуюче опромінення в порівнянні із засоленням. При цьому за умов поєднаної дії стресорів синтез обох білків пригнічується, що може вказувати на «перемикання» сигнальних шляхів під час реакції рослинного організму на комбінований стрес через дві доби після впливу.

Також супресії за впливу комбінації стресорів зазнали білки родини 14-3-3 (№ 6 та № 1 у

таблиці 1). Представники сімейства 14-3-3 присутні у клітинах всіх еукаріот і виступають у ролі регуляторів апоптозу, клітинного циклу, поділу, транскрипції, реплікації, функціонування іонних каналів, організації цитоскелету [10]. Перенесення залишку фосфорної кислоти супроводжується зміною заряду, що часто призводить до істотних конформаційних перебудов, які впливають на структуру, властивості та функціональну активність білків. 14-3-3-подібний білок відноситься до білків, які впізнають та специфічно взаємодіють із певними ділянками фосфорильованих ферментів, причому таких мішеней у них понад 300. Ріст концентрації білків групи 14-3-3 у відповідь на абіотичні стреси досліджувався раніше. Було показано, що експресія генів білків 14-3-3 у коренях проростків ячменю за сольового стресу змінюється ізоформ-специфічно: найбільш контрастні зміни

відбуваються в експресії гена ізоформи 14-3-3В в стійкому сорті Московський-121 (експресія зменшується в 2 рази), а в нестійкому Ельф – збільшується в 2 рази [11]. У нашому випадку ми спостерігаємо зменшення концентрації цього білка у відповідь на сольовий та комбінований стрес (для ізоформи 14-3-3В на 11 % та 100 % у порівнянні з контролем, для ізоформи 14-3-3 на 58 % і 100 % відповідно). При цьому у відповідь на дію радіації концентрація ізоформи 14-3-3В зростала у 3,1 раза, а ізоформи 14-3-3 у 2,2 раза.

Білки № 3 та № 4 таблиці 1, які були ідентифіковані як малатдегідрогеназа (МДГ), дещо відрізнялися за рІ (6,5 та 6,7 відповідно) і молекулярною масою (41,98 кДа та 43,52 кДа). МДГ є одним із найважливіших ферментів рослинного метаболізму та представлена чотирма дегідрогеназами, дві з яких мають оксидоредуктазну активність, а дві інші – декарбоксілюючу [12]. Ідентифіковані ізоформи або посттрансляційні модифікації МДГ по-різному реагували на дію стресових чинників. Так, концентрація МДГ № 3 у варіанті рослин, що піддавалися впливу засолення або опромінення, в порівнянні з контролем значно знижувалася (до 17 % та 27 % контролю відповідно). Але за комбінованої дії стресорів концентрація МДГ № 3 становила 107 % від показника контрольних рослин, тобто майже не змінилася. Концентрація МДГ № 4 навпаки, за комбінованої дії факторів знизилася вдвічі (до 51 % від контролю). Але дія іонізуючої радіації призвела до зростання концентрації цього ферменту у 1,7 раза. При цьому реакція проростків на осмотичний стрес проявилася у зниженні вмісту МДГ № 4 до 7 % контрольної величини. В експериментах по дії сольового стресу на рівень експресії гена однієї з МДГ показано її ріст разом із ростом активності самого ферменту у рослин амаранта [13]. МДГ відносять до ферментів окисних реакцій САМ-шляху. Цикл трикарбонових кислот – ключовий етап клітинного дихання, однією з ланок якого є перетворення малата за допомогою малатдегідрогеназного комплексу. Малатдегідрогеназа виконує важливу функцію в підтримці співвідношення NADH/NAD, зберігаючи NADH на низькому рівні [14].

Білок № 2 з молекулярною масою 122,37 кДа ідентифікований як транскетолаза. Його вміст в умовах комбінованої дії стресорів зріс до 130 % порівняно з контролем. Транскетолаза є важливим ферментом циклу реакцій відновлення CO<sub>2</sub> до рівня вуглеводів (цикл Кальвіна).

Збільшення кількості цього білка може вказувати на активацію темної фази фотосинтезу та підвищення синтезу вуглеводів. Водночас за умови окремого впливу досліджуваних пошкоджувальних чинників концентрація цього білка була меншою за контрольні значення (наприклад, для опромінених рослин вона склала 69 %). У дослідженнях проростків кукурудзи в умовах водного дефіциту реакція стійкої та нестійкої ліній протягом першої доби відрізняється: у стійкій лінії спостерігали підвищення активності транскетолази порівняно з контролем на 80–90 %, в той час як у нестійкій активність транскетолази падає вже з перших годин досліду, але значне зниження спостерігається в обох лініях [15]. Єдиний ідентифікований білок, концентрація якого значно зростала як у відповідь на стресори окремо, так і за їх комбінованої дії, – це фактор елонгації трансляції EF-2 (далі ФЕТ), що є гомологом прокариотичного фактора EF-G (№ 5 у таблиці 1). Його концентрація у клітинах рослин після осмотичного стресу перевищувала контрольне значення у 2,7 раза, а після опромінення – у 1,9 раза. При цьому комбінований вплив стресових факторів викликав збільшення концентрації ФЕТ у 4,8 раза. ФЕТ відіграє значну роль у процесах росту, розвитку та регуляції життєдіяльності рослин, тобто у здійснюваному рибосомами на рибосомах синтезі білків. У зв'язку з цим ріст його кількості у проростках дослідних варіантів може вказувати як на активацію клітинної відповіді в процесі адаптації до несприятливих чинників, так і на відновлення розвитку рослинного організму через дві доби після стресового впливу.

Кожен з ідентифікованих білків, концентрація якого змінювалася залежно від стресових факторів чи їх комбінацій, впливає на реакції організму, на пошкоджуючі чинники та може відігравати важливу роль у передачі сигналів і, як результат, у взаємодії сигнальних систем рослин.

Загалом 223 виявлені білки можна розділити на групи за принципом впливу на зміни їх концентрації від характеру взаємодії стресорів (табл. 2). Визначення типу взаємодії стресових факторів є феноменологічним та ґрунтується на аналізі змін концентрації білків після дії опромінення, засолення та їх комбінації. Відгук організму неможливо передбачити, виходячи лише з інформації про ефекти роздільного впливу кожного з факторів [16]. Тому ефекти зміни експресії певного білка (Е), залежно від впливу

кожного зі стресорів (З-засолення, Іо-іонізуюче опромінення) та характеру взаємодії стресорів із погляду величини ефекту зміни концентрації білка, поділили на чотири типи: некооперативний адитивний, некооперативний мультиплікативний, кооперативний синергічний та кооперативний антагоністичний (табл. 2).

Виходячи з отриманих даних щодо концентрації білків на електрофореграмах, було визначено, що найбільш вираженим є кооперативний антагоністичний ефект. Це явище притаманне для 63 % білків (№ 1, № 4, № 6–8 у таблиці 1) із 223 плям. Для них величина ефекту впливу комбінації факторів виявилася значно нижчою за очікувану в разі адитивної та мульт-

типлікативної взаємодії факторів. Протилежна ситуація з 20 "спотами" від загальної кількості виділених білків, для яких ефект комбінованої дії значно перевищував теоретично очікуваний. Також були визначені білки, на експресію яких опромінення та засолення впливають адитивно або мультиплікативно (28 та 34 білків відповідно). Такі результати можуть вказувати на складні механізми регуляції експресії генів і синтезу білків у відповідь на комбіновані стреси, а також на комплексну систему адаптації організмів до пошкоджувальних чинників, на взаємодію сигнальних систем під час формування реакції рослин на стрес на молекулярному рівні.

Таблиця 2. Типи взаємодії стресових факторів та їх вплив на вміст білків

Схема взаємодії факторів*	Тип взаємодії	Кількість білків, експресія яких визначається відповідним типом взаємодії стресорів
$E=3+I_o$	некооперативний адитивний	28
$E=3 \times I_o$	некооперативний мультиплікативний	34
$E \gg 3+I_o$ та $E \gg 3 \times I_o$	кооперативний синергічний	20
$E \ll 3+I_o$ та $E \ll 3 \times I_o$	кооперативний антагоністичний	141

*Примітка.* Можливі однонаправлені чи різнонаправлені ефекти стресорів З та Іо. \*Рівність з урахуванням статистичної похибки.

### Висновки

Засолення, іонізуюче опромінення та їх комбінація суттєво впливають на експресію білків проростків гороху. Концентрація більшості білків змінюється у відповідь на комбінований вплив іонізуючої радіації та засолення. Зміна експресії ідентифікованих білків вказує на їх значну роль у передачі стресових сигналів та в

процесі формування відповіді рослин на дію пошкоджувальних чинників. Найпоширенішим типом взаємодії стресорів виявилася кооперативна антагоністична взаємодія. Це вказує на складні механізми взаємодії сигнальних систем під час формування відповіді рослин на вплив стресових факторів.

### Література

1. Nesterenko, O., Rashydov, N. Features of the Proline Synthesis of Pea Seedlings in Depend of Salt and Hyperthermia Treatment Coupled with Ionizing Radiation. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2018. Vol. 5 (2). p. 94–108. doi: 10.21448/ijsm.407285.
2. Косаковская И.В. Стрессовые белки растений. К.: Фитосоциоцентр, 2008. 152 с.
3. Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М. Реакція рослин гороху на дію солевого і термічного стресових факторів залежно від попереднього іонізуючого опромінення. *Біологічні Студії*. 2018. Т. 12 (1). С. 5–12.
4. Гогуз Д.О., Холодова В.П., Кузнецов В.В. Влияние солевого стресса на рост и некоторые физиологические показатели растений рода *Nigella*. *Вестник РУДН*. 2013. № 2. С. 12–19.
5. Нестеренко О.Г., Рашидов Н.М. Визначення кореляції між вмістом проліну та води у коренях *Pisum sativum* L. під впливом абіотичних стресових факторів. *Biological systems*. 2017. Т. 9 (2). С. 192–196.
6. Романов Г.А. Рецепторы фитогормонов. *Физиол. раст.* 2002. Т. 49 (4). С. 615–625.
7. Гржибовский А.М., Иванов С.В., Горбатова М.А. Сравнение количественных данных трех и более парных выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии. *Наука и Здоровоохранение*. 2016. № 5. С. 5–29.
8. Косаківська І.В., Голов'янюк І.В. Адаптація рослин: біосинтез та функції стресових білків. *Український фітоценологічний збірник*. 2006. № 24. С. 3–17.

9. Веселов Д.С., Сабиржанова И., Ахиярова Г.Л. и др. Роль гормонов в быстром ростовом ответе растений пшеницы на осмотический и холодовой шок. *Физиол. раст.* 2002. Т. 49 (4). С. 572–576.
10. Obsilová V1, Silhan J, Boura E, Teisinger J, Obsil T. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res.* 2008. № 57. p. 11–21.
11. Шанько А.В., Месенко М.М., Клычников О.И., Носов А.В., Иванов В.Б. Активность протонной помпы в растущей части корня кукурузы: корреляция с 14-3-3 белками и изменениями при осмотическом стрессе. *Биохимия.* 2003. Т. 68 (12). С. 1639–1647.
12. Faleiro A.C. Malate dehydrogenase isozyme patterns in cladophylls of a *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) clonal population. *Acta sci. Biol. Sci.* 2003. Vol. 25 (1). P. 207–211.
13. Хаба А.М., Федорина О.С., Сальников А.В., Зайчикова М.В., Епринцев А.Т. Экспрессионная регуляция генов малатдегидрогеназы в амаранте сорта «харьковский» при засолении. *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация.* 2013. № 2. С. 88–90.
14. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Front. in Plant Sci.* 2016. Vol. 7. P. 1–15.
15. Тихонова О.В., Молодченкова О.О., Петров С.А. Активность гексокиназы и транскетолазы в зерне кукурузы при его прорастании в условиях водного дефицита *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія.* 2007. № 788, вип. 6. С. 182–186.
16. Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С. Влияние сочетанного радиоактивного и химического (тяжелые металлы, гербицид) загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2002. No. 4. С. 369–383.

## References

1. Nesterenko, O., Rashydov, N. Features of the proline synthesis of pea seedlings in depend of salt and hyperthermia treatment coupled with ionizing radiation. *International Journal of Secondary Metabolite.* 2018. Vol. 5 (2). p. 94–108. doi: 10.21448/ijsm.407285.
2. Kosakovskaya I.V. Stressovyye belki rasteniy. K.: Fitosotsiotsentr. 2008. 152 p.
3. Nesterenko O.G., Rashydov N.M. Reaktsiya roslin gorohu na diyu solovogo i termichnogo stresovih faktoriv zalezno vid poperednogo ionizuyuchogo oprominennya. *Biologichni studiyi.* 2018. Vol. 12 (1). P. 5–12.
4. Gogue D.O., Holodova V.P., Kuznetsov V.V. Vliyanie solevogo stressa na rost i nekotorye fiziologicheskie pokazateli rasteniy roda Nigella. *V. RUDN.* 2013. № 2. P. 12–19.
5. Nesterenko O.G., Rashydov N.M. Vznachennya korelyatsiyi mizh vmistom prolinu ta vodi u korenyah *Pisum sativum* L. pid vplyvom abiotichnih stresovih faktoriv. *Biological sytems.* 2017. Vol. 9 (2). P. 192–196.
6. Romanov G.A. Retseptoryi fitogormonov. *Fiziol.rast.* 2002. Vol. 49 (4). P. 615–625.
7. Grzhibovskiy A.M., Ivanov S.V., Gorbatova M.A. Sravnenie kolichestvennyih dannyih treh i bolee parnyih vyiborok s ispolzovaniem programmnogo obespecheniya statistica i spss: parametricheskie i neparametricheskie kriterii. *Nauka i Zdravoohranenie.* 2016. № 5. P. 5–29.
8. Kosakivska I.V., Golov'yanko I.V. Adaptatsiya roslin: biosintez ta funktsiyi stresovih bilkiv. *Ukrayinskiy fltotsenologichniy zbirnik.* 2006. № 24. P. 3–17.
9. Veselov D.S., Sabirzhanova I., Ahiyarova G.L. i dr. Rol gormonov v bystrom rostovom otvete rasteniy pshenitsyi na osmoticheskiy i holodovoy shokyu. *Fiziol. rast.* 2002. Vol. 49 (4). P. 572–576.
10. Obsilová V1, Silhan J, Boura E, Teisinger J, Obsil T. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res.* 2008. № 57. p. 11–21.
11. Shanko A.V., Mesenko M.M., Klychnikov O.I., Nosov A.V., Ivanov V.B. Aktivnost protonnoy pompyi v rastuschey chasti kornya kukuruzyi: korrelyatsiya s 14-3-3 belkami i izmeneniyami pri osmoticheskom stresse. *Biohimiya.* 2003. Vol. 68 (12). P. 1639–1647.
12. Faleiro A.C. Malate dehydrogenase isozyme patterns in cladophylls of a *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) clonal population. *Acta sci. Biol. Sci.* 2003. Vol. 25 (1). P. 207–211.
13. Haba A., Fedorina O.S., Salnikov A.V., Zaychikova M.V., Eprintsev A.T. Ekspressionnaya regulyatsiya genov malatdegidrogenazyi v amarante sorta «harkovskiy» pri zasolenii. *Vestnik VGU, seriya: Himiya. Biologiya. Farmatsiya.* 2013. № 2. P. 88–90.
14. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Front. in Plant Sci.* 2016. Vol. 7. P. 1–15.
15. Tihonova O.V., Molodchenkova O.O., Petrov S.A. Aktivnost geksokinazyi i transketolazyi v zerne kukuruzyi pri ego prorastanii v usloviyah vodnogo defitsita. *Visnik Harkivskogo natsionalnogo universitetu imeni V.N.KarazIna. Seriya: biologiya.* 2007. № 788, Vol. 6. P. 182–186.
16. Geraskin S.A., Dikarev V.G., Dikareva N.S. Vliyanie sochetannogo radioaktivnogo i himicheskogo (tyazhelye metallyi, gerbitsid) zagryazneniya na vyihod tsitogeneticheskikh narusheniy v interkalyarnoy meristeme yarovogo yachmenya *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya.* 2002. No. 4. P. 369–383.

**NESTERENKO O.G., LITVINOV S.V., RASHYDOV N.M.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 148, e-mail: lenabq@ukr.net*

#### **THE PROTEIN EXPRESSION CHANGES DURING THE SIGNALING SYSTEMS INTERACTION IN STRESSED PEA SEEDLINGS**

**Aim.** The plant's signaling systems functioning under stress impact is expressed in changes of the genes expression and protein synthesis. The purpose of this study is to investigate the effect of stressors and their combinations on pea seedlings at the molecular level, qualitative and quantitative changes in the spectrum of plant proteins. **Methods.** This phenomenon were investigated on four experimental groups: control seedlings, plants irradiated with gamma rays in the dose of 10 Gy, pea exposed to salt stress (0.22 Mol/L NaCl solution) and both stressors consequently. Proteins were isolated from each group and analyzed using ultra-high performance liquid chromatography. **Results and conclusions.** We observed the modification of expression of eight identified proteins: transketolase, malate dehydrogenase (43.52 kDa and 41.98 kDa), translation elongation factor EF-2 subunit, 14-3-3-like protein, heat shock cognate protein 80, heat shock cognate 70 kDa-like, 14-3-3-like protein B. Their significant role in the stress signals transduction and in the processes of forming an active response to the adverse factors is confirmed by concentration fluctuations between groups. The largest number of proteins has changed in response to the combined effect of ionizing radiation and salinity. Each factor by itself cause changes in less quantity of proteins.

**Keywords:** signaling systems, proteins, pea seedlings, stress factors.