

УДК 581.1:577.352:577.115

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ РАФТОВЫХ СТРУКТУР ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ

© 2024 г. Н. В. Озолина^а, *, И. С. Капустина^а, В. В. Гурина^а,
Е. В. Спиридонова^а, В. Н. Нурминский^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия
*e-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 14.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 14.12.2023 г.

Проводилось изучение влияния окислительного стресса на липидный состав рафтовых структур вакуолярных мембран, выделенных из корнеплодов столовой свеклы *Beta vulgaris* L. с целью выяснения роли этих мембранных структур в адаптационных механизмах растительной клетки. Анализировали возникающие в результате стресса изменения в качественном и количественном составе основных липидов, стеринов, жирных кислот и сравнивали с изменениями в липидах, роль которых в защите клеток от стресса достоверно установлена. Ранее в вакуолярной мембране было показано присутствие трех видов рафтовых структур. При окислительном стрессе в составе липидов этих структур происходили изменения. Наиболее существенные из них, способные повлиять на защитные механизмы растительной клетки, были выявлены в рафтовых микродоменах 4-й зоны сахарозного градиента (35% сахароза). Они состояли в увеличении содержания сфинголипидов, фосфатидилсерина, β -ситостерина, дигалактозилдиглицерида и снижении фосфатидной кислоты. Менее выраженные отличия были обнаружены в липидном составе у микродоменов 2-й зоны сахарозного градиента (15% сахароза): увеличивалось количество холестерина и сфинголипидов и снижалось содержание фосфатидной кислоты и моногалактозилдиглицерида. Среди изменений липидного состава, способных повлиять на защитные механизмы растительной клетки, у микродоменов 6-й зоны (60% сахароза) было отмечено увеличение содержания фосфатидилхолина, кампестерина и β -ситостерина. Комплекс выявленных изменений липидного состава у изучаемых рафтовых микродоменов вакуолярной мембраны может являться результатом стрессового ответа и участвовать в формировании адаптационных механизмов растительной клетки.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, адаптационные механизмы, мембранные липиды, рафты, окислительный стресс, тонопласт

DOI: 10.31857/S0015330324030091, EDN: NMFSCX

ВВЕДЕНИЕ

Влияние неблагоприятных факторов внешней среды на растения приводит к нарушению метаболизма и существенному снижению продуктивности растений. Изучение изменений, которые происходят в ответ на стрессовые воздействия, и способы их преодоления являются одной из основных задач биологии. Действие экстремальных факторов, вызывающих у клеток состояние стресса, приводит к перестройке метаболизма клетки, которая должна способ-

ствовать успешному преодолению негативной ситуации и восстановлению нарушенного гомеостаза. Одним из наиболее опасных стрессов для растений является окислительный стресс. К нему приводит любое другое стрессовое воздействие [1]. Первыми с неблагоприятными внешними воздействиями сталкиваются биологические мембраны. Известно, что мембранные липиды могут принимать участие в защите растительной клетки от стрессовых воздействий [2]. Вакуолярная мембрана является одной из наименее изученных, хотя имеет большое значение в жизнедеятельности растительной клетки. Тонопласт, как внутренняя мембрана протопласта, ограничивает вакуоль растительной клетки и обладает избирательной проницаемостью, активно участвует в процессах транспорта метаболитов, во многом определяет способность клетки к ос-

Сокращения: ЖК — жирные кислоты; НЖК — насыщенные жирные кислоты; ННЖК — ненасыщенные жирные кислоты; СФ — сфинголипиды; ДГДГ — дигалактозилдиацилглицериды; МГДГ — моногалактозилдиацилглицериды; ФК — фосфатидная кислота; ФХ — фосфатидилхолины; ФЭ — фосфатидилэтаноламины; ФГ — фосфатидилглицерины; ФИ — фосфатидилинозитолы; ФС — фосфатидилсерины.

морегуляции, к регуляции pH и ионного гомеостаза цитозоля, трансдукции сигналов различной природы, а также принимает активное участие в защите клетки от абиотического стресса.

В настоящее время общепринятым является мнение о том, что биологические мембраны неоднородны и имеют доменную организацию [3]. В плазматической мембране выявлено присутствие целого ряда микро- и нанодоменов [4]. Микродомены первыми выделенные из плазмалеммы были названы рафтами [5]. По определению рафты являются микродоменами клеточных мембран, в которых вокруг определенных белков образуются области, обогащенные гликофинголипидами, стеринами и липидами с насыщенными жирными кислотами, что делает их более плотными, чем окружающая мембрана [6]. Известно, что эти мембранные структуры принимают активное участие во многих важных для растительной клетки процессах, таких как экзо- и эндоцитоз, деление, поляризация, внутриклеточная передача сигналов, образование мембранных контактов, связь с цитоскелетом и др. [7]. В тонопласте также были обнаружены рафты [8]. Используя более “мягкий” бездетергентный метод выделения рафтов из вакуолярной мембраны после высокоскоростного разделения в градиенте плотности сахарозы были выделены 3 зоны, в которых присутствовали мембранные фракции, содержащие в большом количестве липиды, характерные для липид-белковых микродоменов относимых к рафтам [9]. В липидном составе рафтов могут происходить определенные изменения, которые будут отражаться на таких биофизических параметрах мембраны как текучесть (микровязкость) и пластичность, что может быть связано с участием этих структур в адаптационных механизмах растительной клетки. Кроме того, изменения в содержании ряда мембранных фосфолипидов и гликоглицеролипидов могут стабилизировать ламеллярную структуру мембраны, предотвращая ее переход в гексагональную фазу [10], что также будет способствовать усилению защитных механизмов при воздействии стресса. Ранее нами была показана важная роль липидов вакуолярной мембраны в защите клетки от абиотических стрессов [11]. В данном исследовании было выявлено, что в выполнении этой защитной функции могут принимать участие липиды микродоменов (рафтов), присутствующие в тонопласте. Анализируя и сравнивая наши результаты с данными других исследователей, изучающих роль мембранных липидов в защите растительной клетки от стрессов, мы полагаем, что липиды, входящие в состав рафтов вакуолярной мембраны, играют важную роль в защите растительной клетки от абиотических стрессов.

Цель данного исследования состояла в изучении изменений происходящих в составе липи-

дов рафтовых микродоменов тонопласта после окислительного стресса, и выяснении роли рафтовых структур в защитных механизмах растительной клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.), которые самостоятельно выращивали в полевых условиях. Корнеплоды, находились в периоде покоя и хранились в течение нескольких месяцев при температуре 4–6°C.

Вакуолярные мембраны получали описанным ранее методом [12] из контрольных корнеплодов и корнеплодов, подвергнутых окислительному стрессу. Чистоту выделенной мембранной фракции оценивали при помощи специфических ингибиторов H^+ -АТФаз. Азид натрия (NaN_3), ванадат натрия (Na_3VO_4) и бафиломицин являются ингибиторами F-, P- и V-типа H^+ -АТФаз соответственно. В экспериментах по определению чистоты полученных фракций тонопласта, азид натрия и ванадат натрия практически не влияли на активность H^+ -АТФаз изолированных везикул, в то время как бафиломицин подавлял активность на 95%. АТФазную активность измеряли путем количественного определения неорганического фосфата, высвобождаемого из АТФ по методу [13] в модификации Скулачева и выражали как отношение концентрации неорганического фосфата к концентрации белков за 1 ч. Количество белка определяли по методу Брэдфорд [14], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. Проведенные исследования позволили сделать вывод о том, что мембранная фракция является достаточно чистой и может быть использована в экспериментах.

Выделение липидно-белковых микродоменов (рафтов). Схема выделения липид-белковых микродоменов из мембранных везикул тонопласта контрольных корнеплодов и корнеплодов, подвергнутых стрессу, приведена в статье [15]. Мембранные везикулы замораживали и оттаивали, затем встряхивали в течение 30 мин при скорости 1200–1400 об/мин на шейкере (“IKA Werke”, Германия) при 4°C в буфере, содержащем 20 mM Tris-HCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 300 mM сахарозы, 0.2 mM аминокислоты-этилбензол сульфонила фторида, 1 мг/мл аprotинина, 10 мкМ бестатина, 3 мкМ E-64, 10 мг/мл лейпептина, 2 мкМ пепстатин, pH 7.8, и помещали под раствор с градиентом плотности сахарозы 15–60%. Центрифугировали в течение 18 ч при 200000 g. После центрифугирования мембранные фракции в градиенте сахарозы были разделены на зоны, представленные на схеме в ранее опубликованной статье [15]. В ранее проведенных экспериментах было показано, что рафтовые структуры

находятся в зоне 2 (15% сахарозы, плотность 1.050 г/см³), зоне 4 (35% сахарозы, плотность 1.110 г/см³) и зоне 6 (60% сахарозы, плотность 1.154 г/см³). Затем анализировали в этих зонах количественный и качественный состав липидов, стерина и жирных кислот.

Условия создания окислительного стресса. Для создания окислительного стресса кусочки ткани корнеплода инкубировали в растворе 100 мМ H₂O₂ в течение 16 ч. В контрольном варианте инкубацию таких же кусочков ткани корнеплодов проводили в дистиллированной воде. Таким образом, мы исключали влияние гипоосмотического стресса. При подборе эффективных условий стрессового воздействия использовали более низкие концентрации перекиси водорода (20, 40 и 50 мМ), но они не давали достаточно эффективного стрессового воздействия, которое оказывала концентрация 100 мМ. Для характеристики эффективности стрессового воздействия на корнеплоды использовали кондуктометрический метод [16]. Также определяли содержание диеновых конъюгатов, которое проводили по методу [17]. Влияние стрессов на барьерные свойства мембран (стабильность мембран) изучали с использованием цейтраферной видеосъемки [18].

Анализ мембранных липидов. Суммарные липиды из рафтовых микродоменов тонопласта расположенных в 2, 4 и 6 зонах градиента плотности сахарозы экстрагировали по методу [19]. Количество общих липидов в экстрактах определяли гравиметрическим методом в вакууме до постоянной массы аликвот экстракта. Полярные липиды разделяли методом ТСХ с использованием двумерной системы: первое направление — хлороформ—метанол—бензол—28% NH₄OH (65 : 30 : 10 : 6 по объему), второе направление — хлороформ—метанол—уксусная кислота—ацетон—бензол—вода (70 : 30 : 4 : 5 : 10 : 1 по объему). Нейтральные липиды разделяли в системе гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (80 : 20 : 1 по объему). Идентификацию пятен осуществляли распылением специальных реагентов, определением R_f пятен и использованием соответствующих стандартов. Денситометрический анализ проводился с использованием ImageJ и Microsoft Excel. Сканирование выполнялось с помощью МФУ Brother dcp-12500dr. Определение содержания отдельных липидов в зонах градиента плотности сахарозы представлено в процентах от общего количества.

Анализ стерина. Для анализа стерина использовали одномерную ТСХ в системе растворителей нейтральных липидов гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (80 : 20 : 1 по объему). Стерины, элюированные с пластинок хлороформом и этилацетатом, силилировали гексаметилдисилазаном и N,O-бис(триметилсил)

ацетамидом. Полученные триметилсилильные производные стерина анализировали с помощью хромато-масс-спектрометра GC-MS 7000/7890A Triple Quad (“Agilent Technologies”, США). Стерины идентифицировали путем сравнения времени их удерживания со стандартами. Также использовались библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7. Количественный анализ проводили с использованием калибровочной кривой для холестерина, кампестерина, стигмастерина и β-ситостерина. В качестве внутреннего стандарта использовали эргостерин. Распределение содержания каждого стерина в зонах градиента плотности сахарозы, содержащих рафтовые микродомены, представлено в процентах от общего количества.

Анализ жирных кислот. Экстрагированные липиды были использованы в экспериментах по изучению состава жирных кислот (ЖК) в рафтовых микродоменах тонопласта, выделенных из 2, 4 и 6 зон сахарозного градиента. Метилловые эфиры жирных кислот получали по методу [20]. Анализ метиловых эфиров ЖК тонопласта проводили с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS (“Agilent Technologies”, США). Детектором служил квадрупольный масс-спектрометр (“Agilent Technologies”, США); в качестве метода ионизации использовался электронный удар; энергия ионизации составляла 70 эВ. Для анализа использовался режим регистрации полного ионного тока. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30 м × 250 мкм × 0.50 мкм) (“Hewlett-Packard”, США). Неподвижной фазой служил полиэтиленгликоль. Подвижной фазой служил гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Температура составляла: 250°C для испарителя, 230°C для источника ионов, 150°C для детектора и 280°C для линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром. Диапазон сканирования составлял 4–450 а.е.м. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл при соотношении потоков 5 : 1. Хроматографию проводили в изотермическом режиме при 200°C. Для идентификации пиков метиловых эфиров ЖК использовали стандарты метиловых эфиров (“Sigma”, США) и метод масс-спектрометрии с использованием библиотеки масс-спектров NIST 05. Результаты представлены в процентах от общего количества ЖК.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программный пакет SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили не менее чем в трех независимых повторностях. Результаты приведены в %. В таблицах данные представлены как медианы в виде межквартильной широты (25; 75 процентиль). Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (* — $P < 0.01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе проводилась оценка влияния окислительного стресса. Результаты проведенных экспериментов показали, что в условиях окислительного стресса выход электролитов из кусочков тканей корнеплода увеличивался более чем в 1.5 раза. Это свидетельствовало о нарушении избирательной проницаемости мембран растительной клетки при окислительном стрессе. Подобные результаты были полу-

чены при оценке стабильности изолированных вакуолей. Было показано, что при окислительном стрессе период полураспада вакуолей уменьшался более чем в 2 раза, то есть темпы разрушения были очень высокими. О процессах перекисного окисления липидов, которые происходили при окислительном стрессе судили по увеличению количества диеновых конъюгатов, которое возросло на 15%. Таким образом, был сделан вывод, что стрессовая нагрузка при

Таблица 1. Количественное содержание основных классов липидов в рафтовых микродоменах из 2, 4 и 6 зон сахарозного градиента после высокоскоростного центрифугирования тонопласта, выделенного из контрольных и подвергнутых окислительному стрессу корнеплодов, % от общей массы липидов

Липиды, %	Рафты зоны 2		Рафты зоны 4		Рафты зоны 6	
	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс
ФХ	3.5 [3.5; 4.1]	3.4 [3.4; 3.6]	3.4 [3.3; 3.9]	4.4 [4.2; 4.5]	0.5 [0.4; 0.5]	2.4 [2.0; 3.8]*
ФЭ	2.6 [2.5; 3.1]	2.8 [2.3; 2.8]	4.0 [3.0; 5.5]	3.0 [2.8; 4.3]	—	1.2 [1.1; 1.8]
ФХ/ФЭ	1.4	1.2	0.9	1.5	—	2.0
ФС	0.8 [0.6; 0.8]	0.2 [0.1; 0.3]*	0.2 [0.1; 0.2]	0.4 [0.4; 0.4]*	—	—
ФИ	0.8 [0.8; 1.2]	1.4 [1.4; 1.8]*	0.9 [0.8; 1.0]	0.9 [0.7; 1.1]	—	0.5 [0.5; 1.1]
ФГ	1.0 [0.8; 1.1]	0.7 [0.6; 0.9]	1.0 [0.9; 1.0]	0.2 [0.2; 0.2]*	—	1.0 [1.0; 1.1]
ФК	4.0 [3.2; 4.0]	0.5 [0.4; 1.1]*	4.3 [3.3; 4.4]	0.3 [0.3; 0.3]*	—	1.5 [1.4; 1.9]
ДГДГ	9.9 [8.2; 10.4]	6.2 [6.0; 6.4]	1.4 [1.4; 1.8]	7.2 [6.9; 7.3]*	5.2 [5.1; 6.0]	8.3 [7.3; 10.2]
МГДГ	6.3 [6.0; 6.9]	4.6 [4.4; 4.7]*	4.9 [4.6; 5.3]	5.7 [5.4; 6.3]	1.5 [1.3; 1.7]	4.8 [4.5; 6.4]*
МГДГ/ДГДГ	0.6	0.7	3.5	0.8	0.3	0.6
СФ	13.6 [12.3; 13.8]	19.8 [19.0; 20.4]*	4.3 [3.2; 5.3]	18.0 [17.2; 18.6]*	8.8 [8.2; 9.2]	10.5 [9.4; 10.6]
Стерины	5.8 [5.8; 5.9]	4.1 [4.0; 4.5]*	6.4 [6.1; 6; 7]	7.2 [7.2; 7.6]*	4.0 [4.0; 4.4]	3.7 [3.5; 4.2]
Эфиры стеринов	9.7 [9.3; 9.9]	5.4 [5.2; 6.2]*	7.2 [6.8; 7.6]	7.0 [6.7; 7.6]	10.3 [9.7; 11.2]	9.2 [8.8; 10.0]
Углеводороды	12.2 [11.8; 12.7]	14.2 [12.7; 14.2]	23.8 [21.0; 24.1]	15.6 [15.2; 16.3]*	29.7 [27.6; 31.0]	22.9 [22.3; 25.2]

Примечание. Данные представлены в виде медиан, а диапазон значений представлен в виде межквартильной широты [25; 75 процентиль]. Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (* — $P < 0.01$). Данные были получены методом ТСХ-денситометрии. ДГДГ — диэлактозилдиацилглицерин; МГДГ — моноэлактозилдиацилглицерин; ФК — фосфатидная кислота; ФХ — фосфатидилхолин; ФЭ — фосфатидилэтаноламин; ФГ — фосфатидилглицерин; ФИ — фосфатидилинозитол; ФС — фосфатидилсерин; СФ — сфинголипид.

воздействию перекиси водорода на клетки корнеплода столовой свеклы была достаточно интенсивной.

В табл. 1 приведены результаты анализа содержания основных классов липидов в рафтовых микродоменах тонопласта после окислительного стресса. Отличия наблюдались во всех микродоменах, но в каждом виде микродоменов в разной степени. В микродоменах, выделенных из 4-й зоны сахарозного градиента изменения в составе липидов связаны с заметным увеличением содержания сфинголипидов (СФ), дигалактозилдиацилглицеридов (ДГДГ) и небольшим увеличением содержания фосфатидилсеринов (ФС) и стерина. В то же время отмечено снижение фосфатидной кислоты (ФК), фосфатидилглицеринов (ФГ) и углеводов. Среди липидов микродоменов 2-й зоны сахарозного градиента произошло небольшое увеличение содержания СФ и фосфатидилинозитолов (ФИ) и снижение содержания ФК, ФС, моногалактозилдиацилглицеридов (МГДГ), стерина и эфиров стерина. Изменения после окислительного стресса среди липидов микродоменов из 6-й зоны сахарозного градиента были связаны с заметным увеличением содержания фосфатидилхолинов (ФХ) и МГДГ. Также было обнаружено появление небольшого количества таких фосфолипидов как фосфатидилэтаноламины (ФЭ), ФК, ФИ и ФГ, которые до стресса не выявлялись.

Рассматривая изменения в содержании стерина микродоменов тонопласта после окислительного стресса, можно отметить, что, как и в предыдущей серии экспериментов были выявлены заметные различия между микродоменами (табл. 2). Так, содержание холестерина увеличивалось в рафтах из 2 зоны сахарозного

градиента, снижалось в рафтах из 4 зоны и не изменялось в рафтах из 6 зоны сахарозного градиента. Увеличение β -ситостерина после окислительного стресса происходило в рафтах из 4 и 6-й зон сахарозного градиента. Изменения в составе кампестерина и стигмастерина происходили только в рафтах из 6-й зоны, причем содержание кампестерина увеличивалось, а стигмастерина снижалось.

При анализе изменений в составе ЖК рафтовых микродоменов тонопласта после окислительного стресса отмечено, что почти во всех микродоменах преобладала пальмитиновая ЖК (C16:0) (табл. 3). Наименее заметные изменения отмечены в микродоменах 2-й зоны сахарозного градиента. Произошло перераспределение в составе насыщенных жирных кислот (НЖК): уменьшилось содержание пальмитиновой ЖК и, соответственно, увеличилось содержание миристиновой (C14:0), маргариновой (C17:0) и стеариновой (C18:0) ЖК. Сумма НЖК после окислительного стресса достоверно не изменилась. В составе ЖК микродоменов из 4 зоны сахарозного градиента были также отмечены различия связанные, главным образом, с изменениями в содержании НЖК, кроме того произошло увеличение ненасыщенной линоленовой ЖК (C18:3(n-3)). В результате этого уменьшилась сумма НЖК и, соответственно, увеличилось соотношение Σ ННЖК/ Σ НЖК. Другие изменения произошли в составе ЖК у рафтовых микродоменов 6 зоны сахарозного градиента. Здесь в отличие от предыдущих микродоменов наблюдается хорошо заметное увеличение содержания ненасыщенной линолевой ЖК (C18:2(n-6)), еще более заметное снижение суммы НЖК и увеличение соотношения Σ ННЖК/ Σ НЖК.

Таблица 2. Количественное содержание основных классов стерина в рафтовых микродоменах из 2, 4 и 6 зон сахарозного градиента после высокоскоростного центрифугирования тонопласта в контроле и после окислительного стресса, % от суммы всех стерина

Стерины, %	Рафты зоны 2		Рафты зоны 4		Рафты зоны 6	
	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс
холестерин	4.3 [4.2; 4.6]	11.0 [10.2; 11.1]*	9.1 [8.2; 9.3]	3.6 [3.6; 4.0]*	5.9 [5.5; 6.0]	5.8 [5.4; 5.9]
кампестерин	10.0 [9.4; 10.2]	9.8 [8.4; 9.9]	7.5 [6.6; 7.8]	7.2 [6.3; 7.6]	9.9 [9.3; 10.0]	11.2 [10.9; 11.5]*
стигмастерин	36.1 [33.2; 37.4]	31.5 [31.2; 36.6]	46.1 [43.4; 46.7]	39.7 [34.7; 40.4]	37.3 [35.3; 39.0]	26.0 [23.6; 28.3]*
β -ситостерин	49.1 [48.0; 52.8]	47.7 [44.8; 47.9]	38.5 [38.2; 40.4]	49.9 [49.3; 54.21]*	47.7 [45.5; 49.7]	57.5 [55.0; 59.6]*

Примечание. Данные представлены как медианы в виде межквартильной широты [25-й; 75-й процентиль]. Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (* – $P < 0.01$). Данные были получены методом ГХ-МС.

Таблица 3. Содержание жирных кислот в рафтовых микродоменах из 2, 4 и 6 зон сахарозного градиента после высокоскоростного центрифугирования тонопласта из контрольных и подвергнутых окислительному стрессу корнеплодов столовой свеклы, % от суммы всех ЖК

ЖК, %	Рафты зоны 2		Рафты зоны 4		Рафты зоны 6	
	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс	Контроль	Окислит. стресс
C14:0	—	7.2 [7.0; 7.6]	—	—	—	—
C15:0	1.7 [1.6; 1.8]	1.7 [1.5; 2.8]	1.4 [1.4; 1.4]	1.2 [1.1; 1.2]*	9.3 [8.2; 9.5]	1.4 [1.1; 1.6]*
C16:0	53.2 [51.8; 56.9]	37.8 [37.3; 39.3]*	36.3 [36.1; 37.1]	27.7 [26.5; 28.5]*	46.4 [45.4; 47.7]	37.1 [36.3; 40.8]
C17:0	—	0.4 [0.4; 0.4]	—	1.7 [1.6; 1.8]	—	—
C18:0	8.4 [7.5; 9.5]	12.1 [12.0; 12.7]*	7.4 [5.9; 8.0]	2.6 [2.5; 2.9]*	24.5 [22.4; 24.4]	12.3 [11.9; 12.8]*
C18:1(n-9)	22.2 [18.6; 22.2]	23.0 [22.9; 23.9]	23.1 [21.3; 23.3]	22.0 [21.8; 24.6]	10.0 [8.1; 10.3]	19.7 [14.8; 20.4]
C18:1(n-7)	3.9 [3.8; 4.0]	5.6 [3.1; 6.2]	5.6 [4.2; 5.6]	8.4 [6.7; 8.5]	4.6 [3.8; 7.0]	9.7 [9.4; 10.0]
C18:2(n-6)	10.6 [9.4; 12.8]	11.1 [10.5; 11.4]	26.3 [24.9; 29.0]	35.0 [32.9; 35.7]	4.9 [4.4; 7.8]	20.7 [20.3; 21.0]*
C18:3(n-3)	—	—	1.1 [1.1; 1.4]	2.3 [1.9; 2.5]*	—	—
ΣНЖК	65.5 [62.3; 68.0]	59.7 [59.2; 62.6]	46.0 [44.1; 46.3]	32.84 [31.5; 34.2]*	80.6 [77.2; 81.5]	51.4 [49.9; 55.0]*
ΣННЖК	34.5 [32.0; 37.7]	40.3 [37.4; 40.8]	54.0 [53.8; 55.9]	67.2 [65.8; 68.5]*	19.4 [18.5; 22.8]	48.6 [45.0; 50.1]*
ΣННЖК/ ΣНЖК	0.5 [0.5; 0.6]	0.7 [0.6; 0.7]	1.2 [1.2; 1.3]	2.2 [1.9; 2.2]*	0.2 [0.2; 0.3]	0.9 [0.8; 1.0]*

Примечание. Данные представлены как медианы в виде межквартильной широты [25; 75 процентиль]. Статистическую значимость различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (* — $P < 0.01$). Данные получены методом ГХ-МС. НЖК — насыщенные жирные кислоты; ННЖК — ненасыщенные жирные кислоты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучению роли мембранных липидов в защите клеток от стресса посвящено много исследований. Выявлены классы мембранных липидов, которые могут принимать активное участие в защите растительной клетки от стресса. Отчетливо показана стабилизирующая, упорядочивающая роль мембранных стеринных и сфинголипидов при стрессовых воздействиях. Они регулируют микровязкость (текучесть) и пластичность мембран, участвуют в адаптационных механизмах растительных клеток [21]. В наших экспериментах после окислительного стресса хорошо заметно увеличение этих липидов в микродоменах 2 и особенно 4-й зоны

сахарозного градиента. Рассматривая подробно изменения в составе стеринных вакуолярной мембраны после окислительного стресса, можно отметить более чем двукратное увеличение в микродоменах 2-й зоны содержания холестерина. Этот стерин, который встречается в растительных мембранах в небольшом количестве, играет важную роль в регуляции биофизических характеристик мембран. Ранее было показано, что холестерин экранирует отрицательные заряды и, тем самым, снижает поверхностный заряд мембраны [22]. Это способствует более плотной упаковке углеводородных цепей в фазе геля, а, следовательно, дополнительному повышению микровязкости мембраны и возможно-

му уменьшению ее проницаемости. Также из изменений, которые могут иметь адаптивный характер можно отметить увеличение содержания “антистрессового” стерина — кампестерина в микродоменах 6-й зоны, который, по мнению ряда исследователей, связан с защитными механизмами растительной клетки [23]. В микродоменах 4 и 6 зон отмечено увеличение содержания ситостерина. Известно, что среди различных стероидов β -ситостерин является основным стероидом, укрепляющим растительные мембраны [24]. Кроме того, известно, что β -ситостерин обладает высокой антиоксидантной активностью [25] и способен регулировать текучесть и проницаемость мембран путем взаимодействия с насыщенными алкильными цепями фосфолипидов и сфинголипидов, ограничивая их подвижность, так же, как и холестерин в клетках млекопитающих [26]. Мутанты с повышенным содержанием β -ситостерина обладали большей устойчивостью к окислительному стрессу по сравнению с диким типом [27].

После воздействия окислительного стресса отмечены также изменения среди полярных липидов в исследуемых рафтовых микродоменах. Фосфолипиды и гликолипиды играют существенную роль в стабилизации липидного бислоя, что особенно важно при защите от стрессового воздействия. Известно, что увеличение содержания таких липидов как ФХ, ФИ, ФГ и ДГДГ обеспечивает стабилизацию бислоевой структуры, тогда как увеличение содержания ФЭ и МГДГ способствует переходу мембран в гексагональную фазу [28]. Изменения в составе фосфолипидов у разных микродоменов существенно различались. Из липидов, которые стабилизируют бислоевую структуру в рафтовых микродоменах отмечено увеличение ДГДГ у рафтов из 4-й зоны сахарозного градиента и увеличение ФИ в рафтовых микродоменах из 2-й зоны. В рафтовых структурах из 6 зоны также увеличилось содержание ФХ, ФИ и ФГ, что может быть связано со стабилизацией липидной мембраны. Наиболее заметные изменения среди фосфолипидов этих микродоменов произошли в содержании ФК, которые существенно уменьшились в микродоменах 2 и 4 зон и увеличивались в рафтовых микродоменах 6 зоны. Это изменение в содержании ФК могут быть связаны с адаптивной защитной реакцией, поскольку из литературных данных известно, что снижение содержания ФК способствовало поддержанию бислоевой структуры мембраны, усиливало ее текучесть, процессы дегидратации и препятствовало индукции гидрофильных водных каналов [29]. Высокое содержание ФК среди фосфолипидов является отличительной особенностью вакуолярной мембраны. В тонопласте, выделенном из корнеплодов столовой

свеклы, содержание ФК составляло 14.6% от всех фосфолипидов [30]. Тогда как в других мембранах содержание ФК было значительно меньше — так в плазмалемме из ананаса содержание ФК составляло 3–4% от суммы фосфолипидов [31]. При изучении влияния стрессов на липидные профили другие исследователи наиболее часто отмечали повышение содержания ФК [32, 33]. После низкотемпературной обработки в 10 раз увеличивалось содержание ФК в листьях *Arabidopsis*, но в этих экспериментах содержание ФК в контрольных растениях составляло 0.7% от суммы всех фосфолипидов [34], а не 14.6%, как в вакуолярной мембране из корнеплодов столовой свеклы. У микродоменов 6 зоны сахарозного градиента адаптивные изменения в большей степени связаны с увеличением содержания ФХ, который хорошо стабилизирует ламеллярную структуру мембран [10].

После окислительного стресса произошли изменения и среди гликоглицеролипидов: заметно увеличилось содержание МГДГ у микродоменов 6 зоны и снизилось в микродоменах 2 зоны, в то время как для ДГДГ отмечено увеличение содержания, но только в микродоменах 4 зоны. Эти изменения привели к существенному снижению соотношения МГДГ/ДГДГ у микродоменов 4 зоны и увеличению в других микродоменах, особенно заметному для микродоменов 6 зоны. Известно, что у более устойчивых растений увеличение этого соотношения связывают со стабилизацией структуры мембраны [35]. Также с процессом стабилизации мембраны и упорядочением липидного бислоя связывают повышение содержания ДГДГ, тогда как увеличение содержания МГДГ может нарушать целостность липидного бислоя, вызывая переход в гексагональную липидную фазу [36]. Таким образом, изменения содержания гликоглицеролипидов также могут участвовать в защите растительной клетки от окислительного стресса.

Изменения в составе ЖК мембранных липидов при стрессе ответственны за структурные перестройки клеточных мембран, поэтому в настоящее время они рассматриваются как один из механизмов адаптации организмов к стрессовому воздействию [37]. Анализируя результаты экспериментов по изменению содержания ЖК в рафтовых микродоменах 2, 4 и 6-й зон сахарозного градиента после высокоскоростного разделения тонопласта из контрольных корнеплодов и корнеплодов, подвергнутых окислительному стрессу, можно сделать вывод, что наиболее существенные изменения произошли в микродоменах из 4 и 6 зон. Эти изменения привели к увеличению суммы ННЖК и соотношения $\Sigma\text{ННЖК}/\Sigma\text{НЖК}$. Важным показателем включения защитных механизмов клетки при небла-

гоприятных воздействиях является увеличение содержания ненасыщенных ЖК в составе мембранных липидов [38]. Это явление было отмечено при разных видах абиотического стресса. Увеличение концентрации ненасыщенных ЖК один из важнейших факторов низкотемпературной адаптации, что было неоднократно продемонстрировано на многих растительных объектах [39]. Установлено также, что повышение содержания ненасыщенных ЖК в мембранах растительных тканей увеличивает устойчивость растений к действию патогенов [40]. Увеличение ненасыщенных ЖК мембранных липидов определяет такие показатели как микровязкость, проницаемость и делает мембрану более эластичной.

Ранее нашим коллективом исследовалось влияние окислительного стресса на липидный состав исходной вакуолярной мембраны [11]. Было показано, что в тонопласте после окислительного стресса из наиболее заметных адаптивных изменений отмечалось существенное снижение ФК (37% от контроля), увеличение содержания ДГДГ (353%), увеличение содержания суммы стеринов (194%). В полученных нами результатах по анализу состава липидов рафтовых структур тонопласта после окислительного стресса мы видим подобные изменения в составе липидов, что подтверждает роль рафтовых структур в защитных механизмах растительной клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассматривая участие рафтовых микродоменов из разных зон сахарозного градиента после высокоскоростного разделения тонопласта в защитных механизмах растительной клетки можно сделать вывод о том, что после окислительного стресса во всех зонах, были отмечены изменения в составе липидов, которые можно отнести к адаптационным. Так, в микродоменах 2 и 4 зон сахарозного градиента отмечено увеличение содержания СФ, способных стабилизировать структуру мембран и приводить к снижению содержания ФК, что способствует поддержанию бислойной структуры мембраны. Кроме того, в 4 зоне отмечено увеличение содержания β -ситостерина и ДГДГ, что может усиливать защитные механизмы клетки. У микродоменов 2 зоны из изменений, которые можно отнести к адаптивным отмечено уменьшение содержания МГДГ, а среди стеринов увеличение содержания холестерина. Другие варианты возможных защитных механизмов присутствовали у микродоменов из 6 зоны сахарозного градиента. Это увеличение содержания ФХ и соотношения МГДГ/ДМГДГ, которые способствовали стабилизации ламеллярной структуры мембран, а также увеличение

среди стеринов доли “антистрессового” кампестерина.

Комплекс выявленных изменений липидного состава у рафтовых микродоменов вакуолярной мембраны может быть связан с защитными механизмами, которые запускаются в клетках растений в условиях окислительного стресса, а функциональная роль мембранных рафтовых структур связана с адаптационными механизмами растительной клетки.

Работа выполнена с использованием оборудования Центрального аналитического центра “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск. Данная работа выполнена в рамках проекта, финансируемого за счет государственного бюджета (№ 122041100052-0).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Меньшикова Е.Е., Зенков Н.А.* Антиоксиданты и ингибиторы радикальных процессов // *Успехи современной биологии.* 1993. Т. 113. № 4. С. 442.
2. *Okazaki Y., Saito K.* Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants // *Plant J.* 2014. V. 79. P. 584.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12556>
3. *Gronnier J., Gerbeau-Pessot P., Germain V., Mongrand S., Simon-Plas F.* Divide and rule: plant plasma membrane organization // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 23. P. 899.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.07.007>
4. *Cassim A.M., Gougnet P., Gronnier J., Laurent N., Germain V., Grison M., Boulté Y., Gerbeau-Pissot P., Simon-Plas F., Mongrand S.* Plant lipids: key players of plasma membrane organization and function // *Prog. Lipid Res.* 2019. V. 73. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.11.002>
5. *Peskan T., Westermann M., Oelmüller R.* Identification of low-density Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains in higher plants // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 6989.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01776.x>
6. *Lingwood D., Simons K.* Lipid rafts as a membrane-organizing principle // *Sci.* 2010. V. 327. P. 46.
<https://doi.org/10.1126/science.1174621>
7. *Pike L.J.* Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1746. P. 260.
<https://doi.org/10.106/jbbamcr.200.05.005>
8. *Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Yu.* Tonoplast of Beta

- vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains // *Planta*. 2013. V. 237. P. 859.
<https://doi.org/10.1007/s00425-012-1800-1>
9. Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N. Non-detergent isolation of membrane structures from beet plasmalemma and tonoplast having lipid composition characteristic of rafts // *J. Membr. Biol.* 2020. V. 253. P. 479.
<https://doi.org/10.1007/s00232-020-00137-y>
 10. Narayanan S., Tamura P.J., Roth M.R., Vara Prasad P.V., Welti R. Wheat leaf lipid composition during heat stress: I. High day and night temperatures result in major lipid alterations // *Plant Cell Environ.* 2015. V. 39. P. 787.
<https://doi.org/10.1111/pce.12649>
 11. Ozolina N.V., Gurina V.V., Nesterkina I.S., Nurminsky V.N. Variations in the content of tonoplast lipids under abiotic stress // *Planta*. 2020. V. 251. P. 107.
<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03399-x>
 12. Салеев Р.К., Кузеванов В.Я., Хантагаев С.Б., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // *Физиология растений*. 1981. Т. 28. С. 1295.
<https://elibrary.ru/item.asp?id=26264616>
 13. Никулина Г.Н. Обзор методов количественного определения фосфора по образованию молибденовой сини. Ленинград: Наука, 1965. 45 с.
 14. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
 15. Ozolina N.V., Kapustina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N. Role of tonoplast microdomains in plant cell protection against osmotic stress // *Planta*. 2022. V. 255. P. 65.
<https://doi.org/10.1007/s00425-021-03800-3>
 16. Ristic Z., Ashworth E.N. Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation // *Protoplasma*. 1993. V. 172. P. 111.
<https://doi.org/10.1007/BF01379368>
 17. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., Франк Г.М. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва: Наука, 1972. 252 с.
 18. Нурминский В.Н., Корзун А.М., Розинев С.В., Салеев Р.К. Компьютерная цейтраферная видеосъемка фракции изолированных вакуолей // *Биомедицинская химия*. 2004. Т. 50. С. 180.
 19. Folch J., Lees M., Sloan Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. P. 497.
[http://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](http://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
 20. Christie W.W. Equivalent chain lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1988. V. 447. P. 305.
<https://lipidlibrary.aocs.org/lipid-analysis/selected-topics-in-the-analysis-of-lipids/preparation-of-ester-derivatives-of-fatty-acids-for-chromatographic-analysis>
 21. Zhou Y., Pan X., Qu H., Underhill S.J. Low temperature alters plasma membrane lipid composition and ATPase activity of pineapple fruit during blackheart development // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2014. V. 46. P. 59.
<https://doi.org/10.1007/s10863-013-9538-4>
 22. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов. Москва: МГУ, 1985. 208 с.
 23. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева Ф.Г., Минабаева Ф.В. Растительные стеринны: многообразие, биосинтез, физиологические функции // *Биохимия*. 2016. Т. 81. С. 1050.
<https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
 24. Shuler I., Milon A., Nakatani Y., Ourisson G., Albrecht A.M., Benveniste P., Hartman M.A. Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain phosphatidylcholine bilayers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 6926.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.6926>
 25. Wang T., Hicks K.B., Moreau R. Antioxidant activity of photosterols, oryzanol, and other phytosterols conjugates // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002. V. 79. P. 1201.
<https://doi.org/10.1007/s11746-002-0628-x>
 26. Hartmann M.A. Plant sterols and the membrane environment // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3. P. 170.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01233-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01233-3)
 27. Wegener A., Gimbel W., Werner T., Hani J., Ernst D., Sandermann H. Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-syntas // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1350. P. 247.
 28. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. Москва: Мир, 1997. 624 с.
 29. Wu J.L., Seliskar D.M., Gallagher J.L. The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress // *Am. J. Bot.* 2005. V. 92. P. 852.
<https://doi.org/10.3732/ajb.92.5.852>
 30. Макаренко С.П., Коненкина Т.А., Салеев Р.К. Химический состав и структура вакуолярных мембран // *Биологические мембраны*. 1992. Т. 9. С. 290.
 31. Zhou Y., Pan X., Qu H., Underhill S.J. Low temperature alters plasma membrane lipid composition and ATPase activity of pineapple fruit during blackheart development // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2014. V. 46. P. 59.
<https://doi.org/10.1007/s10863-013-9538-4>
 32. Arisz S.A., van Wijk R., Roels W., Zhu J.K., Haring M.A., Munnik T. Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase // *Front. Plant Sci.* V. 4.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00001>
 33. McLeoughlin F., Arzis S.A., Dekker H.L., Kramer G., de Koster C.G., Haring M.A., Munnik T., Testerink C. Identification of novel candidate phosphatidic acid-binding proteins involved in the salt-stress response of *Arabidopsis thaliana* roots // *Biochem. J.* 2013. V. 450. P. 573.
<https://doi.org/10.1042/BJ20121639>

34. *Welti R., Li W., Li M., Sang Y., Biesiada H., Zhou H.E., Rajashekar C.B., Williams T.D., Wang X.* Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 3199.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M205375200>
35. *Шишова М.Ф., Емельянов В.В.* Изменение протеома и липидома мембран растительной клетки в ходе развития // *Физиология растений.* 2021. Т. 68. С. 800.
<https://doi.org/10.31857/S001533032105016X>
36. *Su K., Bremer D.J., Jeannotte R., Welti R., Yang C.* Membrane lipid composition and heat tolerance in cool-season turfgrasses, including a hybrid bluegrass // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2009. V. 134. P. 511.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.134.5.511>
37. *Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Генерозова И.П., Шугаев А.Г., Фаттахов С.Г.* Жирнокислотный состав липидов мембран и энергетика митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды // *Физиология растений.* 2013. Т. 60. С. 205.
<https://doi.org/10.1134/S1607672911020104>
38. *Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I.* Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // *Photosynth. Res.* 2013. V. 116. P. 489.
<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9823-4>
39. *Badea C., Basu S.K.* The effect of low temperature on metabolism of membrane lipids in plants and associated gene expression // *Plant OMICS.* 2009. V. 2. P. 78.
https://www.pomics.com/Saikat_2_2_2009_78_84.pdf
40. *Дёмин И.Н., Нарайкина Н.В., Цыдендамбаев В.Д., Мошков И.Е., Трунова Т.И.* Введение гена desA 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерий повышают устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией // *Физиология растений.* 2008. Т. 55. С. 710.