

УДК 577.352:577.115

СРАВНЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В СОДЕРЖАНИИ СТЕРИНОВ ПЛАЗМАЛЕММЫ И ТОНОПЛАСТА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ И ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ

© 2023 г. Н. В. Озолина^а, *, В. В. Гурина^а, И. С. Капустина^а,
Е. В. Спиридонова^а, В. Н. Нурминский^а

^аСибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 17.10.2022 г.

После доработки 09.11.2022 г.

Принята к публикации 11.11.2022 г.

Сравнивали изменения в содержании стеринов плазмалеммы и тонопласта, выделенных из хранящихся корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) при окислительном и осмотических стрессах. Наиболее существенные различия между мембранами были отмечены при изменении содержания холестерина при всех изучаемых стрессовых воздействиях: оно уменьшалось в плазмалемме, но в 4–6 раз возрастало в тонопласте. То же самое происходило и с другими стеринами, но при разных стрессах по-разному. Особенно заметные различия были отмечены при гиперосмотическом стрессе. Выявленное намного более заметное увеличение содержания важных для стабилизации мембраны стеринов в вакуолярной мембране по сравнению с плазмалеммой позволяет сделать вывод о более значительной роли тонопласта по сравнению с плазмалеммой в защите растительной клетки от стресса.

Ключевые слова: тонопласт, плазмалемма, стерин, стресс

DOI: 10.31857/S0233475523020056, **EDN:** KYUQKS

Одна из задач физиологии растений – выявление эндогенных механизмов защиты растительных клеток при стрессе. Действие экстремальных факторов, вызывающих состояние стресса, приводит к перестройке метаболизма клетки. Пограничные мембраны являются важными защитными барьерами и при действии стрессоров претерпевают изменения, способствующие преодолению негативных воздействий. В растительной клетке присутствуют две пограничные мембраны. Плазматическая мембрана ограничивает содержимое клетки от окружающей среды. Ее главная функция – поддержание целостности клетки и осуществление взаимосвязи с внешней средой. Плазматическая мембрана регулирует избирательный транспорт веществ в клетку, обеспечивает специфику межклеточных контактов, выполняет структурную, барьерную, информационную и защитную функции. Вакуолярная мембрана, как внутренняя мембрана протопласта, ограничивает вакуоль растительной клетки, обладает избирательной проницаемостью, активно участвует в процессах транспорта метаболитов, во многом определяет способность клетки к осморегуляции, к регуляции pH и ионного гомеостаза цитозоля,

трансдукции сигналов различной природы и так же, как плазмалемма, принимает участие в защите клетки от абиотического стресса. Значительная часть этих функций связана с липидами пограничных мембран. Известно, что мембранные липиды принимают участие в защите растительной клетки от стрессовых воздействий [1]. Среди мембранных липидов именно стерин определяют такие свойства мембраны, как текучесть и проницаемость. Их роль в защите клетки от стресса в настоящее время не вызывает сомнений [2]. Доказана стабилизирующая роль стеринов – при увеличении их содержания происходит упорядочивание липидного бислоя мембраны. Они регулируют микровязкость, пластичность, ригидность мембран и участвуют в защите от стрессовых воздействий [3]. Цель настоящего исследования состояла в анализе качественного и количественного состава стеринов плазмалеммы и тонопласта при окислительном, гиперосмотическом и гипоосмотическом стрессовых воздействиях.

В качестве объекта исследования использовали плазматические и вакуолярные мембраны клеток корнеплодов столовой свеклы *Beta vulgaris* L.,

находящиеся на стадии покоя. Вакуолярные и плазматические мембраны получали описанными ранее методами [4, 5]. Чистоту мембранных фракций оценивали при помощи специфических ингибиторов H^+ -АТФ-аз. Азид натрия (NaN_3), ванадат натрия (Na_3VO_4) и бафиломицин являются ингибиторами F-, P- и V-типа H^+ -АТФ-аз, соответственно. В экспериментах по определению чистоты полученных фракций тонопласта азид натрия и ванадат натрия практически не влияли на активность H^+ -АТФ-аз изолированных везикул, в то время как бафиломицин подавлял активность на 95%. В экспериментах с фракцией плазмалеммы было установлено, что ванадат подавлял активность H^+ -АТФ-азы изолированных везикул на 97%, тогда как бафиломицин и азид ингибирующего влияния почти не оказывали. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что мембранные фракции являются достаточно чистыми и могут быть использованы в экспериментах.

Методика создания и оценка эффективности окислительного и осмотического стрессов подробно описана в работе, опубликованной ранее [6]. Для создания гиперосмотического стресса корнеплоды в течение 3 суток выдерживали (подсушивали) на открытом воздухе при комнатной температуре, что приводило к снижению массы корнеплодов и увеличению осмоляльности клеточного сока (общая концентрация растворенных частиц в 1 кг воды). Для создания гипоосмотического стресса корнеплоды выдерживали в течение суток в дистиллированной воде при комнатной температуре, в результате чего уменьшалась осмоляльность клеточного сока. Осмоляльность оценивали на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Россия). Осмотика в контрольных корнеплодах составляла 645 ± 35 мОсм $кг^{-1}$ H_2O , после гиперосмотического стресса – 749.4 ± 42.3 , а после гипоосмотического – 568.3 ± 7.6 мОсм $кг^{-1}$ H_2O . Для создания окислительного стресса кусочки ткани корнеплода размером $1 \times 1 \times 1$ см инкубировали в растворе 100 мМ H_2O_2 в течение суток также при комнатной температуре. В контрольном варианте использовали корнеплоды, не подвергнутые стрессам. Для характеристики стрессового воздействия на корнеплоды использовали кондуктометрический метод [7]. Также определяли содержание диеновых конъюгатов по методу [8]. Влияние стрессов на барьерные свойства мембран (стабильность мембран) изучали с использованием цейтраферной видеосъемки [9].

Из плазмалеммы и тонопласта, которые были выделены из контрольных и подвергнутых окислительному и осмотическим стрессам корнеплодов, экстрагировали липиды по методу [10]. Количество стерина определяли методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (GC-MS

7000/7890A Triple Quad chromatography-mass spectrometer, Agilent Technologies (США)). Идентификацию стерина проводили путем сравнения их времен удержания со стандартами, а также использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7. Количественный анализ был проведен с использованием калибровочной кривой по холестерину, кампестерину, стигмастерину и β -ситостерину с учетом отклика внутреннего стандарта, в качестве которого использовали эргостерин.

Сравнивая контрольные варианты двух пограничных мембран, мы видим, что в плазмалемме сумма стерина существенно выше, чем в тонопласте. В данном исследовании нас интересовали изменения как в суммарном содержании, так и в содержании отдельных классов стерина при окислительном и осмотическом стрессах. Результаты экспериментов показали, что в плазмалемме при осмотических стрессах идет двукратное снижение содержания стерина, тогда как при окислительном стрессе наоборот их количество в 2 раза увеличивается (табл. 1). В тонопласте также отмечено увеличение содержания стерина при окислительном стрессе, но заметно более существенное (в 3 раза). При осмотических стрессах изменения в суммарном содержании стерина в тонопласте по сравнению с плазмалеммой отличаются еще более заметно. Так, при гиперосмотическом стрессе в тонопласте происходило такое же увеличение суммарного содержания стерина, как и при окислительном стрессе, хотя в плазмалемме происходило существенное снижение общего содержания стерина. При гипоосмотическом стрессе достоверных изменений в содержании общих стерина в тонопласте не происходило, но не отмечено и снижение их содержания, которое мы видим у плазмалеммы. Увеличение содержания стерина является важным защитным механизмом, поскольку хорошо известно, что стерин стабилизируют мембрану и способствуют упорядочению структурных компонентов мембраны [2].

В табл. 1 приведены результаты измерений содержания отдельных классов стерина в плазмалемме и тонопласте при изучаемых стрессах. Видно, что все виды стресса вызывали изменения содержания всех классов стерина. Так, содержание холестерина в плазмалемме уменьшалось и при окислительном, и при осмотических стрессах, тогда как в тонопласте оно, наоборот, возрастало в 4–6 раз. Известно, что хотя содержание холестерина в растительных мембранах сравнительно низкое, он играет заметную роль в регуляции биофизических характеристик мембран. Ранее было показано, что холестерин экранирует отрицательные заряды и тем самым снижает поверхностный заряд мембраны [11]. Это способствует более плотной упаковке углеводородных цепей в

Таблица 1. Количественное содержание основных классов стеридов плазмалеммы и тонопласта из контрольных корнеплодов и корнеплодов, подвергнутых окислительному и осмотическим стрессам

Стерин	Содержание стеридов (мкг/мг общих липидов) при стрессе			
	контроль	гиперосмотическом	гипоосмотическом	окислительном
Плазмалемма				
Холестерин	0.9 ± 0.3	0.3 ± 0.1*	Следы	0.6 ± 0.1
Кампестерин	1.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1*	0.3 ± 0.1*	1.2 ± 0.1
Стигмастерин	4.9 ± 0.5	1.1 ± 0.1*	0.9 ± 0.1*	7.5 ± 0.3*
β-Ситостерин	9.3 ± 2.9	5.2 ± 1.6*	7.1 ± 0.6	21.0 ± 1.4*
Σ	16.4 ± 2.8	7.0 ± 1.7*	8.3 ± 0.6*	30.3 ± 1.2*
Тонопласт				
Холестерин	0.2 ± 0.01	1.0 ± 0.2*	1.34 ± 0.1*	0.8 ± 0.1*
Кампестерин	0.4 ± 0.02	1.2 ± 0.1*	0.4 ± 0.1	1.7 ± 0.2*
Стигмастерин	3.3 ± 0.3	5.0 ± 0.9*	1.0 ± 0.3*	6.9 ± 0.7*
β-Ситостерин	5.6 ± 0.9	19.3 ± 1.4*	8.3 ± 2.0	18.1 ± 3.0*
Σ	9.4 ± 1.2	26.5 ± 1.3*	11.0 ± 2.0	27.4 ± 3.1*

Примечание. Данные получены методом ГХ-МС. * – достоверно при $p \leq 0.01$. Жирным шрифтом отмечены варианты увеличения содержания липидов по сравнению с контролем, курсивом – снижение.

фазе геля, что играет важную роль в обеспечении барьерной функции клеточных мембран.

Содержание других классов стеридов в плазмалемме при гиперосмотическом стрессе снижалось в 3–4 раза, тогда как в тонопласте вновь отмечено заметное увеличение. При гипоосмотическом стрессе в плазмалемме содержание всех классов липидов заметно уменьшалось, за исключением β-ситостерина. В тонопласте при этом виде стресса снижалось только содержание стигмастерина, тогда как количество других стеридов не менялось, за исключением холестерина, содержание которого существенно возрастало.

Наиболее интересные изменения в содержании стеридов, на наш взгляд, отмечены после окислительного стресса. В этом случае происходило существенное увеличение содержания не только суммы стеридов тонопласта, но и всех отдельных классов стеридов. В плазмалемме отмечены похожие изменения, но не увеличивалось содержание кампестерина, и снижалось содержание холестерина. При гиперосмотическом стрессе существенно увеличивалось только суммарное содержание стеридов в тонопласте, тогда как в плазмалемме оно снижалось. Наименее заметные изменения в сторону увеличения содержания стеридов отмечены при гипоосмотическом стрессе.

Таким образом, при окислительном и осмотическом видах стрессового воздействия изменения в содержании стеридов, связанные с выполнением защитных функций от стресса, были значительно более выражены на вакуолярной мембране. Полученные результаты позволяют выдвинуть пред-

положение о существенной роли тонопласта в защите растительной клетки от стресса.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена с частичным использованием средств гранта РФФИ № 19-04-00013 на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Okazaki Y., Saito K. 2014. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant J.* **79**, 584–596.
- Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А., Минибаева Ф.В. 2016. Растительные стериды: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия.* **18**, 1050–1068.
- Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* **23** (6), 785–794.
- Саляев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. 1981. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений. *Физиология растений.* **28**, 1295–1305.

5. Larsson C., Widell S., Kjellbon P. 1987. Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods in Enzymology*. **148**, 558–568.
6. Ozolina, N.V., Gurina V.V., Nesterkina, I.S. Nurminsky V.N. 2020. Variations in the content of tonoplast lipids under abiotic stress. *Planta*. **251**, 107.
7. Ristic Z., Ashworth E.N. 1993. Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma*. **172**, 111–123.
8. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. 1972. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М.: Наука. 252 с.
9. Nurminsky V.N., Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Koleznikova E.V., Korzun A.M., Chernyshov M.Yu., Tikhonov N.V., Tarkov M.S., Salyaev R.K. 2011. Stability of plant vacuolar membranes under the conditions of osmotic stress and influence of redox agents. *Biochemistry (Moscow). Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. **5** (2), 185–190.
10. Bligh E., Dyer W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** (8), 911–917.
11. Болдырев А.А. 1985. *Биологические мембраны и транспорт ионов*. М.: МГУ. 208 с.

Comparison of Changes in the Content of Plasma Membrane and Tonoplast Sterols under Oxidative and Osmotic Stress

N. V. Ozolina¹, *, V. V. Gurina¹, I. S. Kapustina¹, E. V. Spiridonova¹, V. N. Nurminsky¹

¹*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

*e-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Changes in the content of plasma membrane and tonoplast sterols isolated from stored beet root crops (*Beta vulgaris* L.) under oxidative and osmotic stress were compared. The most significant differences between the membranes were noted when the cholesterol content changed under all the studied stress effects: it decreased in the plasmalemma but increased 4–6 times in the tonoplast. Similar changes occurred with other sterols, but in different ways under different stresses. Particularly noticeable differences were noted in hyperosmotic stress. The increase in the content of sterols was much more pronounced in the vacuolar membrane compared to the plasmalemma. This observation allows us to conclude that the tonoplast plays a more significant role in protecting the plant cell from stress than the plasmalemma.

Keywords: tonoplast, plasmalemma, sterols, stress