

На правах рукописи



ГУРИНА Вероника Валериевна

**ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПИДНОГО СОСТАВА
ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ КОРНЕПЛОДОВ *BETA VULGARIS L.*
ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ
1.5.21 – физиология и биохимия растений**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск, 2022

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель:

Озолина Наталья Владимировна
доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Жигачева Ирина Валентиновна
доктор биологических наук, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем.

Аксенов-Грибанов Денис Викторович

кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», г. Иркутск, руководитель лаборатории фармацевтической биотехнологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «21» апреля 2022 года в 10.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952)510-754, e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Д 033.047.01,
кандидат биологических наук



Акимова Галина Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В силу прикрепленного образа жизни растения зависят от сезонных или глобальных климатических колебаний. Неблагоприятные факторы окружающей среды отрицательно влияют на метаболические процессы в растениях, вызывая молекулярные, биохимические, физиологические и морфологические изменения. В живой клетке с различными внешними воздействиями первыми сталкиваются именно биологические мембраны. При абиотических стрессовых воздействиях функции клеточных мембран изменяются, при этом нарушается синтез липидов, а также происходит их гидролиз. Показано, что при стрессе может увеличиваться синтез уникальных липидов, которые в нормальных условиях содержатся в следовых количествах. Такие липиды могут являться сигнальными молекулами или быть предшественниками вторичных мессенджеров. Определенные мембранные липиды (стерины и сфинголипиды) участвуют в образовании рафтовых структур. Липидные рафты – это особые области (микродомены) бислоя, которые характеризуются более высокой плотностью и температурой плавления. Предполагается, что эти структуры обеспечивают мембранные контакты, участвуют в сигналинге, транспорте и апоптозе.

Центральная вакуоль у растений служит для запасаения, детоксикации и деградации эндогенных и экзогенных соединений, а также для защиты при стрессе на клеточном уровне. Внутреннее пространство вакуоли отделено от цитоплазмы вакуолярной мембраной. Как и плазмалемма, вакуолярная мембрана относится к пограничным мембранам растительной клетки, и принимает активное участие не только в поддержании тургора клетки, но и в регуляции транспорта метаболитов, обеспечивая запасающую, регуляторную и защитную функции.

В настоящее время исследования липидного состава вакуолярной мембраны проводились только при разных видах температурного стресса. Изучение влияния осмотического и окислительного стрессов на липидный состав тонопласта не проводилось.

Поэтому цель данной работы заключалась в исследовании липидного состава тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* при абиотических стрессах для выяснения возможной роли липидов в защитных механизмах растительной клетки.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Создать и оценить условия стрессового воздействия на корнеплоды *Beta vulgaris*.
2. Провести анализ качественных и количественных изменений преобладающих липидов (фосфолипидов, гликоглицеролипидов), стеринов и жирнокислотного состава общих липидов вакуолярной мембраны в условиях окислительного стресса.
3. Исследовать качественные и количественные изменения преобладающих липидов (фосфолипидов, гликоглицеролипидов), стеринов и жирнокислотного состава общих липидов вакуолярной мембраны в условиях гиперосмотического стресса.
4. Изучить качественные и количественные изменения преобладающих липидов (фосфолипидов, гликоглицеролипидов), стеринов и жирнокислотного состава общих липидов вакуолярной мембраны при гипоосмотическом стрессовом воздействии.
5. Оценить возможную роль липидов тонопласта в защите растительной клетки от стресса.

Положение, выносимое на защиту:

Липиды вакуолярной мембраны принимают участие в защите растительной клетки от абиотических стрессовых воздействий. Для каждого стресса характерны общие и специфические изменения липидного состава, которые определяют стратегию защиты растительных клеток в окислительных и осмотических условиях стресса.

Научная новизна исследования. Впервые получены данные о количественных и качественных изменениях содержания фосфолипидов, гликоглицеролипидов, стерина и жирных кислот вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris* при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах, что позволило выявить специфические и неспецифические стратегии защиты растительных клеток от стресса, связанные с липидами вакуолярной мембраны. При всех изучаемых стрессовых воздействиях отмечено увеличение содержания минорных жирных кислот и кампестерина, снижение количества фосфатидной кислоты и отношения стигмастерин/ β -ситостерин. Особенностью реакции мембранных липидов на окислительный стресс было существенное увеличение всех классов стерина, что, по-видимому, связано с усилением такого важного процесса как аутофагия. При гиперосмотическом стрессе было отмечено уменьшение гликоглицеролипидов, а также отношения фосфатидилхолин/фосфатилэтанолламин. Гипоосмотическое стрессовое воздействия особенно повлияло на рост уровня фосфатидинозитов. Большая часть выявленных изменений липидного состава тонопласта связана со стабилизацией бислоевой структуры мембраны и сигнальными функциями липидов, что характерно и для других мембран растительной клетки.

Методология и методы исследования. В работе были использованы следующие методы и подходы: определение выхода электролитов, содержание диеновых конъюгатов, компьютерная цейтраферная видеосъемка, выделение вакуолей и тонопласта, экстракция липидов, метилирование жирных кислот, тонкослойная хроматография, количественный спектрофотометрический анализ фосфолипидов и гликоглицеролипидов, силилирование стерина, статистическая обработка полученных данных с помощью программы Sigma-Plot.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Результаты детального исследования изменения липидного состава вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris* при окислительном и осмотических стрессах значимы для понимания механизмов адаптации растений к изменяющимся условиям окружающей среды. Особенности изменения липидного состава при изучаемых стрессовых воздействиях важны для создания толерантных к стрессу растений сельскохозяйственного назначения.

Материалы диссертации могут быть рекомендованы при разработке курсов лекций по физиологии растений и биохимии на кафедрах соответствующего профиля.

Апробация работы. Результаты исследования по теме научно-квалификационной работы были представлены и обсуждались на Международной молодежной научно-практической конференции Россия-Монголия (Иркутск, 2016), 20-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2016), IX Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз – Россия 2016» (Томск, 2016), Всероссийской конференции и Школе-семинаре с международным участием «Роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе распространенных патологий» (Иркутск, 2016), Всероссийской научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2016), II Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки» (Иркутск, 2018), Годичном собрании Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018), Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 100-летию Иркутского

государственного университета «Социально-экологические проблемы Байкальского региона и сопредельных территорий» (Иркутск, 2018), IX Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019), Всероссийской научной конференции с международным участием «Липиды 2021» (Москва, 2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 5 статей в журналах из Перечня ВАК РФ и 1 статья в иностранном журнале.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, список литературы, включающий 247 источника. Работа изложена на 124 страницах, содержит 27 рисунков и 9 таблиц.

Работа выполнена в лаборатории физиологии растительной клетки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН, г. Иркутск).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах подготовки диссертационной работы: планирование и постановка экспериментов, оценка условий стрессовых воздействий, подготовка материала, анализ липидов, стерина, жирнокислотного состава общих липидов, статистическая обработка данных, подготовка публикаций на основе полученных результатов, апробация на конференциях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) сорт Модана. В данной работе мы исследовали окислительный стресс и два вида осмотического стресса: гиперосмотический и гипоосмотический. *Гипоосмотический стресс* создавали путем помещения очищенных корнеплодов в дистиллированную воду на 24 ч. *Гиперосмотический стресс* создавали следующим образом: неочищенные корнеплоды *Beta vulgaris* в течение трех суток увядали при комнатной температуре. *Окислительный стресс* – кусочки ткани корнеплода размером 1 см³ инкубировали в растворе 100 мМ H₂O₂ в течение 16 ч.

В ходе работы использовались различные контроли для установления влияния осмотического и окислительного стрессов, потому как осмотическому стрессовому воздействию подвергались целые корнеплоды, а окислительному – кусочки ткани корнеплодов. Для осмотических стрессов контролем служили целые корнеплоды без осмотических воздействий, для окислительного стресса – кусочки ткани корнеплодов размером 1 см³ инкубировали в дистиллированной воде. Оценку осмотических воздействий путем определения осмотической концентрации клеточного сока на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Россия) и массы корнеплодов до и после осмотического стресса.

Выход электролитов из тканей корнеплода измеряли кондуктометрическим методом (Грищенко, Лукаткин, 2005) с использованием кондуктометра ОК-104 (Radelkis, Венгрия) с платиновым электродом. Степень выхода электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода.

Оценка барьерных свойств мембран осуществлялась с помощью оригинальной экспериментальной установки цейтраферной компьютерной видеосъемки (ЦКВ), позволяющей получать серии компьютерных изображений микроскопических объектов (Нурминский и др., 2004). Результаты видеосъемки использовались для изучения динамики разрушения мембран вакуолей. Компьютерная обработка данных ЦКВ осуществлялась с помощью программы CellsPro, функционирующей в среде Matlab.

Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов (ДК), проводили на спектрофотометре Specord – S-100 (Analytik Jena AG, Германия) при 203 нм. по методике (Владимиров, Арчаков, 1972).

Изолирование вакуолей и вакуолярных мембран из ткани корнеплодов проводили модифицированным макрообъемный методом, разработанным в лаборатории физиологии растительной клетки СИФИБР СО РАН (Салеев и др., 1981).

Общие липиды из тонопласта экстрагировали модифицированным методом Фолча (Folch et al., 1957).

Метилловые эфиры жирных кислот (ЖК) получали по методу (Christie, 1993). Анализ метиловых эфиров ЖК тонопласта проводили с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent technology 5973N/6890N MSD/DS (США). Для идентификации пиков метиловых эфиров жирных кислот использовали стандарты метиловых эфиров (Sigma, США) и данные библиотеки масс-спектров NIST 05 (Dobson, 1993; Wolff and Christie, 2002). Для оценки степени ненасыщенности жирных кислот рассчитывали индекс двойной связи (ИДС) (Lyons et al., 1964). Рассчитывали сумму ненасыщенных жирных кислот ($\Sigma_{\text{ннжк}}$), сумму насыщенных жирных кислот ($\Sigma_{\text{нжк}}$) и отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот ($\Sigma_{\text{ннжк}}/\Sigma_{\text{нжк}}$).

Фосфолипиды тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* количественно определяли аналитической тонкослойной хроматографией по неорганическому фосфору методом Васьковского (Vaskovsky and Latyshev, 1975). Гликоглицеролипиды тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* количественно определяли аналитической тонкослойной хроматографией по галактозе методом (Dubois et al., 1956) в модификации (Roughan and Batt, 1968).

Суммарные стеринны тонопласта корнеплодов *Beta vulgaris* силилировали (Дударева, 2020). Образовавшиеся триметилсилильные производные стериннов были проанализированы с помощью хромато-масс-спектрометра GC-MS 7000/7890A TripleQuad, Agilent Technologies (США). Идентификацию стериннов 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.

Эксперименты проводили не менее чем в пяти независимых повторностях. Полученные данные представляли в виде средней арифметической (M) или медианы (Me), а разброс значений – в виде стандартного отклонения (\pm S.D.) или интерквартильной широты [25%; 75% процентиль]. С помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk) проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479-2002). Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$ (Гланц, 1999).

При нормальном распределении для доказательства наличия значимых различий между средними применяли однофакторный дисперсионный анализ и последующее множественное сравнение средних проводили по методу Тьюки для осмотических стрессовых воздействий, так как сравнение было против одного контроля. Для доказательства наличия значимых различий между средними при окислительном стрессовом воздействии использовали парный двухвыборочный t-тест.

Если распределение отличалось от нормального, для доказательства наличия значимых различий между медианами использовали H-критерий Краскела-Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса или Данна для осмотических стрессовых воздействий. Для доказательства наличия значимых различий между медианами при окислительном стрессовом воздействии использовали тест Манна-Уитни.

Статистические расчеты осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 12.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния стрессовых воздействий

При осмотических стрессах происходили существенные изменения массы корнеплода *Beta vulgaris* и осмотической концентрации клеточного сока. При гиперосмотическом стрессе масса корнеплода снижалась на 20%, осмотическая концентрация клеточного сока увеличивалась на 13%, а при гипоосмотическом стрессе, наоборот, масса увеличивалась на 20%, а осмотическая концентрация снижалась на 12% (Ozolina et al., 2016).

О процессах перекисного окисления липидов можно судить по увеличению содержания диеновых конъюгатов в тканях корнеплодов (рис. 1). При окислительном стрессе выход диеновых конъюгатов увеличивался на 47%. В условиях осмотических стрессов количество диеновых конъюгатов было почти в два раза больше, чем в контроле.

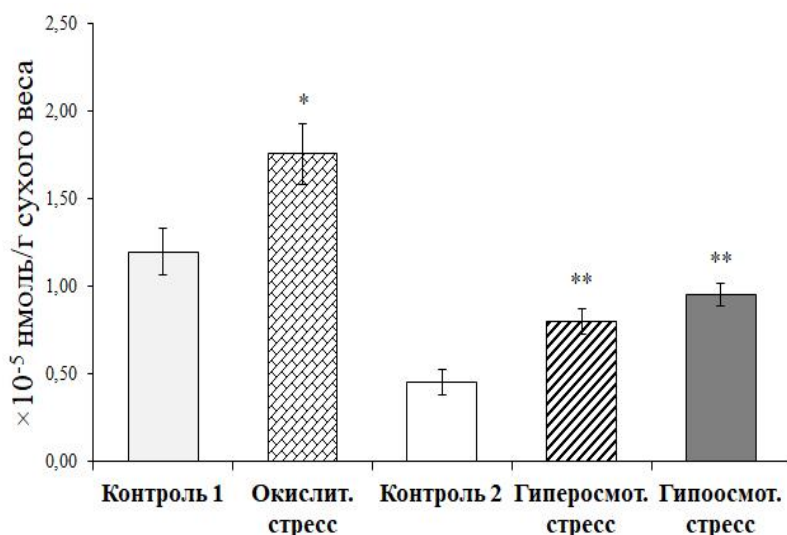


Рис. 1. Содержание диеновых конъюгатов при окислительном и осмотических стрессах в тканях корнеплодов *Beta vulgaris*

Примечание: M±S.D. * – наличие значимых различий в сравнении с контролем 1, значимость различий рассчитана с помощью t-теста, ** – наличие значимых различий в сравнении с контролем 2, значимость различий рассчитана с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Последующее множественное сравнение средних проводили по

методу Тьюки.

Состояние проницаемости мембран оценивали по выходу электролитов из тканей корнеплода в условиях стрессового воздействия (рис. 2).

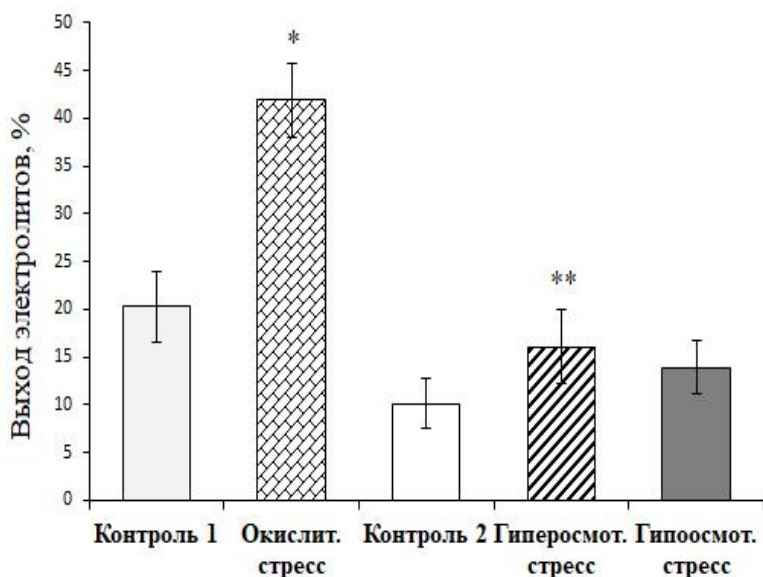


Рис. 2. Характеристика окислительного и осмотических стрессов кондуктометрическим методом по выходу электролитов из тканей корнеплодов *Beta vulgaris*

Примечание: M±S.D. * – наличие значимых различий в сравнении с контролем 1, значимость различий рассчитана с помощью t-теста, ** – наличие значимых различий в сравнении с контролем 2, значимость различий рассчитана с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Последующее множественное сравнение средних проводили по методу Тьюки.

В ответ на гиперосмотический стресс выход электролитов возрастал на 59%, а при окислительном стрессе на 106%.

При оценке стабильности изолированных вакуолей методом цейтраферной видеосъемки было установлено, что стабильность мембран изменялась при всех изучаемых стрессах (рис. 3). Самые интенсивные разрушения вакуолей было отмечены в условиях гипоосмотического стресса (разрушение в 4,5 раза больше, чем в контроле). При гиперосмотическом стрессе период полураспада уменьшался на 28%, при окислительном практически в два раза, на 54%.

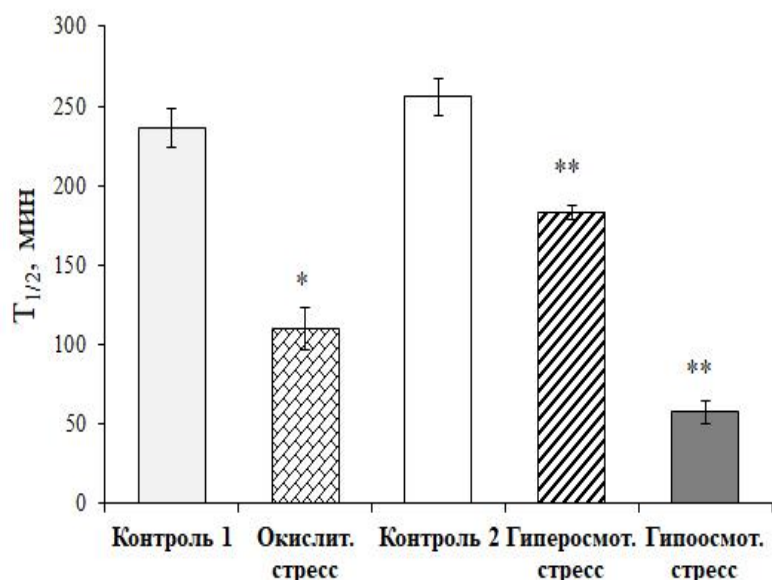


Рис. 3. Влияние окислительного и осмотических стрессов на период полураспада изолированных вакуолей корнеплодов *Beta vulgaris*

Примечание: $M \pm S.D.$
* – значимость различий в сравнении с контролем 1, рассчитана с помощью t-теста, ** – значимость различий в сравнении с контролем 2, рассчитаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Последующее множественное сравнение средних проводили по методу Тьюки.

Таким образом, данные оценки стрессового воздействия на ткани корнеплода показывают, что стрессовая нагрузка в условиях окислительного и осмотических воздействий на клетки *Beta vulgaris* была достаточно интенсивной.

Влияние окислительного стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта

Суммарное содержание липидов тонопласта уменьшалось почти в два раза после окислительного стрессового воздействия (рис. 4).

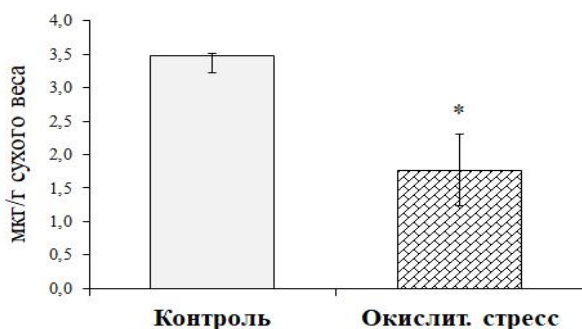


Рис. 4. Содержание суммарных липидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Изменения, которые произошли в жирнокислотном составе липидов вакуолярной мембраны при окислительном воздействии, представлены в таблице 1. Среди НЖК тонопласта в контрольном варианте и после окислительного воздействия преобладали пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты, а среди ННЖК – олеиновая (C18:1(n-9)) и линолевая (C18:2(n-6)).

При рассмотрении изменений минорных ЖК, можно отметить, что содержание лауриновой ЖК (C12:0) после стрессового воздействия увеличилось почти в два раза.

После окислительного стресса возрастало также количество пентадекановой кислоты (С15:0) (на 31%). Содержание пальмитиновой ЖК (С16:0) увеличилось на 12% от контроля после окислительного воздействия. Пальмитиновая ЖК в основном преобладает в составе высокополярных липидов, которые могут быть приравнены к аннулярным липидам (они более упорядочены, менее подвижны, имеют в составе более насыщенные жирные кислоты и выделяются из мембраны вместе с белком). Без них невозможно функционирование многих ферментных систем (Жуков, 2015).

При окислительном стрессовом воздействии содержание стеариновой кислоты (С18:0) снизилось. Среди ННЖК количественные изменения происходили в основном с пальмитолеиновой ЖК (С16:1) – содержание увеличивалось на 30% и линолевой ЖК (С18:2(н-6)) – содержание снижалось на 7,4%. Липидный анализ показал, что избыточное продуцирование пальмитолеиновой ЖК включается в большинство основных классов полярных липидов, включая цитоплазматическую «эукариотическую» фракцию хлоропластных гликоглицеролипидов. В наших экспериментах, при стрессовом воздействии на вакуолярную мембрану, суммарные количества НЖК и ННЖК статистически значимо не изменялись. Увеличение НЖК мембранных липидов влияет на такой показатель, как микровязкость, и делает мембрану менее эластичной. Известно, что НЖК менее чувствительны к окислительному повреждению, и защита от этого повреждения животных тканей связана с повышением насыщенности ЖК липидов (Portero-Otin et al., 2001).

Таблица 1

Влияние окислительного стресса на жирнокислотный состав липидов вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris*, (% от суммы ЖК)

| Жирные кислоты | Контроль | Окислит. стресс |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|
| С12:0 , лауриновая | 0,25 [0,24; 0,26] | 0,52 [0,45; 0,59] * |
| С14:0 , миристиновая | 0,92 [0,83; 0,98] | 0,97 [0,92; 1,02] |
| С15:0 , пентадекановая | 1,00 [0,96; 1,05] | 1,31 [1,3; 1,36] * |
| С16:0 , пальмитиновая | 31,04 [30,53; 31,69] | 34,89 [34,36; 35,61] * |
| С16:1 , пальмитолеиновая | 0,74 [0,74; 0,76] | 1,25 [1,22; 1,35] * |
| С18:0 , стеариновая | 5,45 [4,95; 5,71] | 3,9 [3,67; 4,1] * |
| С18:1(н-9) , олеиновая | 23,93 [23,25; 24,61] | 22,18 [21,96; 22,64] |
| С18:1(н-7) , цис-вакценовая | 1 [0,96; 1,03] | 1,05 [1,02; 1,07] |
| С18:2(н-6) , линолевая | 33,04 [32,72; 33,26] | 30,6 [29,88; 31,51] * |
| С18:3(н-3) , линоленовая | 1,88 [1,68; 2,12] | 2,2 [1,98; 2,44] |
| С20:0 , арахиновая | 0,41 [0,32; 0,51] | - |
| С22:0 , бегеновая | 0,5 [0,48; 0,54] | 0,43 [0,39; 0,47] |
| ИДС | 0,97 [0,96; 0,98] | 0,93 [0,92; 0,94] |
| ΣНЖК | 39,78 [38,81; 40,45] | 42,03 [41,77; 42,48] |
| ΣННЖК | 60,22 [59,55; 61,19] | 57,97 [57,52; 58,23] |
| ΣННЖК/ΣНЖК | 1,51 [1,47; 1,58] | 1,38 [1,35; 1,39] * |

Примечание: Ме [25%; 75%]. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни.

При изучении фосфолипидов, основного класса мембранных липидов, было установлено, что преобладающими липидами в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* были фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины (рис. 5).

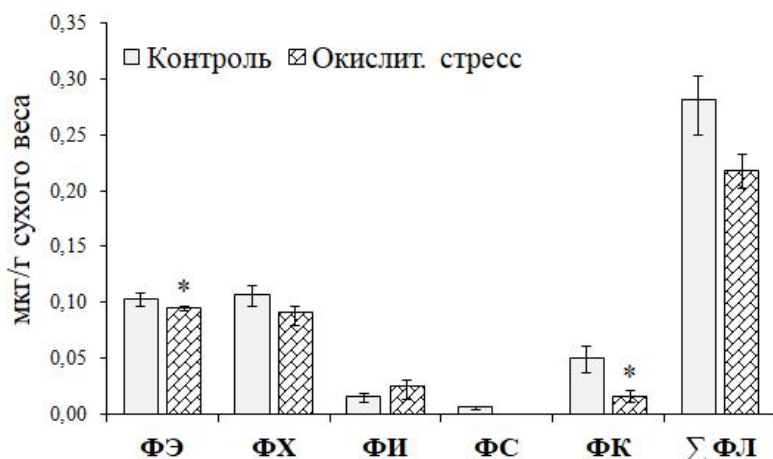


Рис. 5. Содержание фосфолипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни.

После окислительного воздействия количество ФЭ и ФК снижалось. Вероятно, снижение содержания этих липидов связано со стабилизацией мембранного бислоя, так как они имеют малую головную группу и по строению похожи на усеченный конус, вызывая деформацию отрицательной кривизны. Согласно имеющимся данным, этот переход влияет на такие характеристики мембраны, как проницаемость и микровязкость. Количественные изменения ФК при стрессах чаще всего связаны с увеличением ее содержания в связи с участием в клеточном сигналинге. Так, например, после низкотемпературной обработки содержание ФК в листьях *Arabidopsis thaliana* увеличилось в десять раз, но в этих экспериментах содержание ФК в контрольных растениях было всего 0,7% от суммы всех ФЛ в отличие от наших результатов (17,8%) (Welti et al., 2002).

Согласно литературным данным, отношение ФХ к ФЭ оценивает текучесть, целостность мембраны и может изменяться при стрессах (de Vries et al., 2004; Wu et al., 2020). Соотношение ФХ/ФЭ в тонопласте после окислительного стресса уменьшалось на 6,8% (табл. 2). Стоит также отметить отсутствие ФС после окислительного стресса.

Таблица 2

Отношение ФХ/ФЭ среди ФЛ, отношение ДГДГ/МГДГ среди ГЛ и отношение стигмастерин/β-ситостерин в стеринах вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах

| Отношение | Контроль 1 | Окислит. стресс | Контроль 2 | Гиперосмот. стресс | Гипоосмот. стресс |
|-------------------------------|------------|-----------------|------------|--------------------|-------------------|
| ФХ/ФЭ | 1,03 | 0,96 | 1,02 | 0,65 | 1,07 |
| ДГДГ/МГДГ | 0,25 | 0,67 | 0,62 | 0,46 | 0,83 |
| Стигмастерин/ β-ситостерин | 0,14 | 0,16 | 0,1 | 0,15 | 0,13 |

Результаты наших опытов показали, что при окислительном воздействии суммарное содержание гликоглицеролипидов в вакуолярной мембране *Beta vulgaris* увеличилось почти на 75% (рис. 6). При окислительном стрессе отмечалось резкое повышение количества ДГДГ (на 246,7% от контрольного варианта). Согласно исследованиям, посвященным динамике ДГДГ, повышение содержания этого ГЛ связано со стабилизацией липидного бислоя (Narayanan et al., 2015).

Как и отношение ФХ к ФЭ показатель ДГДГ/МГДГ часто используется для оценки стрессового воздействия и адаптационных возможностей мембраны. При окислительном воздействии ДГДГ/МГДГ в два с половиной раза возрастало (табл. 2). Данный показатель

увеличивался и при высокотемпературном стрессе, что, по мнению автора, способствовало увеличению текучести мембран (Pham-Thi et al., 1987).

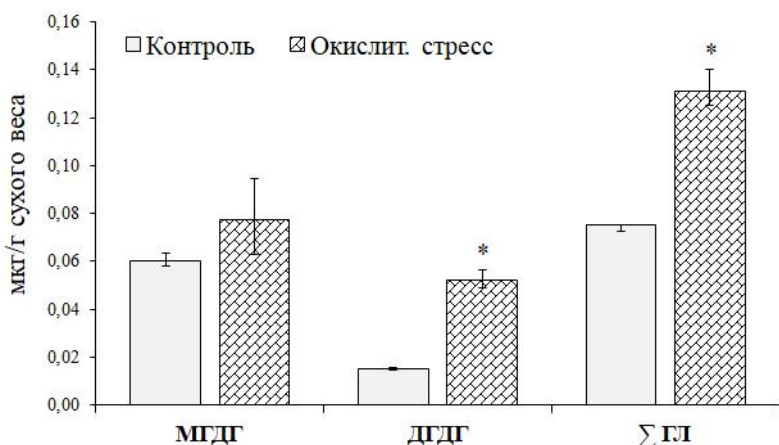


Рис. 6. Содержание гликоглицеролипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни.

На рисунке 7 представлены изменения стерина, которые произошли после окислительного стресса. Количество каждого изучаемого стерина увеличивалось, как и отношение стигмастерина к β -ситостерину (табл. 2). Стерины влияют не только на текучесть и проницаемость мембраны (Mongrand et al., 2004), но и на плотность упаковки других липидов. Так, стерины могут взаимодействовать с насыщенными алкильными цепями ФЛ и сфинголипидов, ограничивая их подвижность (Schuler et al., 1991). Суммарное содержание стерина в наших экспериментах существенно повышалось при окислительном стрессе. Согласно литературным данным, увеличение содержания стерина может приводить к снижению текучести мембраны (Kumar et al., 2015). При окислительном стрессе снижение текучести мембран может быть связано с запуском защитных механизмов и являться важным фактором формирования стрессового ответа. Увеличение в мембране содержания стерина (особенно холестерина) способствует увеличению ее жесткости (Van Blitterswijk et al., 1981), что помогает ограничивать фазовый переход в небислое состояние при высокой температуре (Muramatsu et al., 2000).

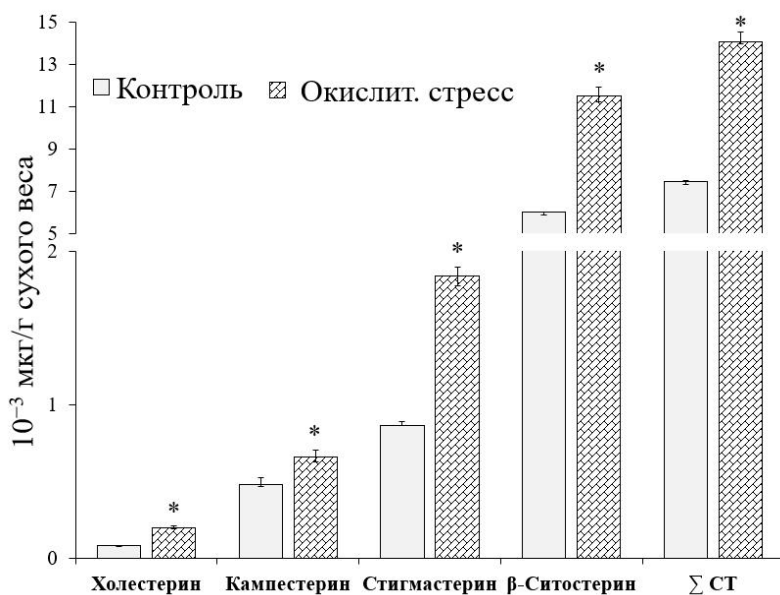


Рис. 7. Содержание стерина в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Интенсивно увеличивалось и содержание β -ситостерина и стигмастерина, на 92% и на 113% соответственно. Известно, что β -ситостерин обладает высокой антиоксидантной активностью (Hidayathulla et al., 2018), а количество стигмастерина

увеличивается при всех стрессовых воздействиях (Валитова и др., 2016). И не случайно при окислительном стрессе мы видим увеличение именно этих стеринов, поскольку они могут принимать участие в защите мембраны от окислительного стресса.

Повышение содержания всех стеринов при окислительном стрессе может также способствовать образованию рафтовых структур, которые были обнаружены и в вакуолярной мембране (Ozolina et al., 2013). Известно, что рафты представляют собой платформы, содержащие рецепторы, участвующие в путях передачи сигналов и регулирующие активность многих мембранных белков, например, аквапоринов, то есть белков, обеспечивающих водную проницаемость мембран (Koffman et al., 2015). Рафтовые структуры, кроме того, представляют собой основу мембранных контактов (Fujimoto et al., 2012). По нашему мнению, мембранные контакты между тонопластом и мембранами поврежденных органелл могут формироваться дополнительно из-за повышенной аутофагии, вызванной окислительным стрессом.

Таким образом, при окислительном стрессовом воздействии общее количество липидов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* снижалось в два раза. Существенные изменения в жирнокислотном составе липидов были отмечены для короткоцепочечных НЖК. Количество лауриновой, пальмитиновой, и пентадекановой ЖК значительно увеличивалось, а содержание стеариновой ЖК уменьшалось. Среди полярных липидов количество ФЭ и ФК снижалось, а содержание ДГДГ увеличивалось в три с половиной раза. Наиболее интенсивные изменения происходили в составе стеринов тонопласта – все классы стеринов резко возрастали.

Влияние гиперосмотического стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта

Общее количество липидов вакуолярной мембраны уменьшилось на 41,8% от контроля после гиперосмотического стрессового воздействия (рис. 8).

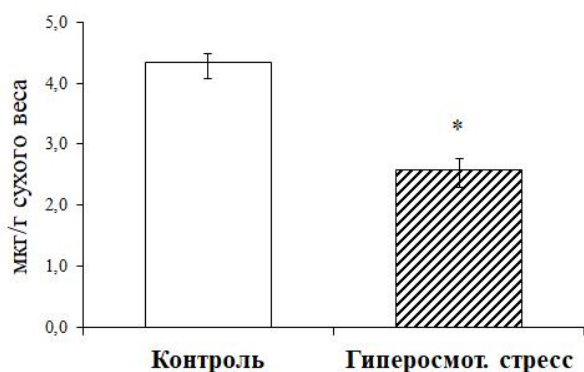


Рис. 8. Содержание суммарных липидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гиперосмотического стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Данна.

Данные по содержанию жирных кислот липидов тонопласта обнаруженных после гиперосмотического воздействия приведены в таблице 3. Содержание доминирующих ЖК, таких как линолевая (C18:2(n-6)) и пальмитиновая (C16:0), не изменялось при стрессе.

Интересные изменения произошли с лауриновой ЖК (C12:0), которая полностью отсутствовала в тонопласте нестрессированных корнеплодов *Beta vulgaris*. Она появилась только после стрессового воздействия. Следует также отметить, что в два раза увеличивалось количество миристиновой (C14:0). Миристиновая ЖК имеет сродство к субъединицам некоторых белков, участвующих в сигналинге. N-миристоилирование может влиять на конформационную стабильность белков (Qi et al., 2000; Qureshi et al., 2013). Кроме того, высокое содержание миристиновой ЖК было обнаружено в фосфатидилинозитах, которые также участвуют в сигнальных каскадах (Leondaritis and Galanopoulou, 2000). Почти в три раза повысилось содержание стеариновой ЖК (C18:0) в

тонопласте после стресса и на восемь процентов понизилось количество олеиновой ЖК (C18:1(n-9)). Десатурация стеариновой ЖК до олеиновой ЖК, катализируемая стеароил-АПБ-десатуразой, является одной из ключевых реакций в пути биосинтеза ЖК, которая определяет соотношение НЖК и ННЖК (Zhao et al., 2015).

Таблица 3

Влияние гиперосмотического стресса на жирнокислотный состав липидов вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris*, (% от суммы ЖК)

| Жирные кислоты | Контроль | Гиперосмот. стресс |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|
| C12:0 , лауриновая | - | 0,17 [0,16; 0,18] |
| C14:0 , миристиновая | 0,32 [0,3; 0,34] | 0,68 [0,59; 1,21] * |
| C15:0 , пентадекановая | 1,04 [0,97; 1,06] | 1,11 [1,05; 1,16] |
| C16:0 , пальмитиновая | 29,53 [29,39; 31,54] | 31,58 [31,32; 34,08] |
| C16:1 , пальмитолеиновая | 0,8 [0,72; 0,81] | 0,93 [0,84; 1,05] |
| C17:0 , маргаринавая | 0,24 [0,24; 0,25] | 0,87 [0,6; 1,81] |
| C18:0 , стеариновая | 0,92 [0,9; 0,95] | 2,63 [2,19; 9,43] * |
| C18:1(n-9) , олеиновая | 23,01 [22,9; 23,21] | 21,18 [18,85; 21,38] * |
| C18:1(n-7) , цис-вакценовая | 0,93 [0,87; 1,02] | 0,98 [0,96; 1,09] |
| C18:2(n-6) , линолевая | 39,97 [37,95; 40,08] | 36,27 [29,33; 36,61] |
| C18:3(n-3) , линоленовая | 2,77 [2,52; 2,9] | 1,97 [1,92; 2,42] |
| C20:1(n-11) , гадоленовая | 0,39 [0,36; 0,39] | 0,33 [0,30; 0,42] |
| C22:0 , бегеновая | 0,21 [0,19; 0,24] | 0,33 [0,30; 0,35] |
| ИДС | 1,14 [1,089; 1,14] | 1,03 [0,94; 1,07] |
| ΣНЖК | 32,16 [31,99; 34,32] | 37,58 [36,19; 42,45] |
| ΣННЖК | 67,84 [65,68; 68,01] | 62,42 [57,55; 63,81] |
| ΣННЖК/ΣНЖК | 2,11 [1,93; 2,13] | 1,66 [1,43; 1,76] |

Примечание: Ме [25%;75%]. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

Общее содержание ФЛ существенно снижалось (на 45%) после гиперосмотического стрессового воздействия (рис. 9). Статистически значимые различия были выявлены и в содержании ФЭ и ФХ, их количество существенно снижалось (на 41,3 и на 63%, соответственно). Изменения в содержании ФХ могут быть связаны с увеличением фосфолипазной активности, ранее выявленной на вакуолярной мембране (Tavernier and Pugin, 1995). На мембранах, выделенных из дикого типа *Arabidopsis thaliana* после низкотемпературного стресса, изменения в содержании мембранных липидов также были связаны с повышением липолитической активности и с гидролизом ФЛ (Welti et al., 2002).

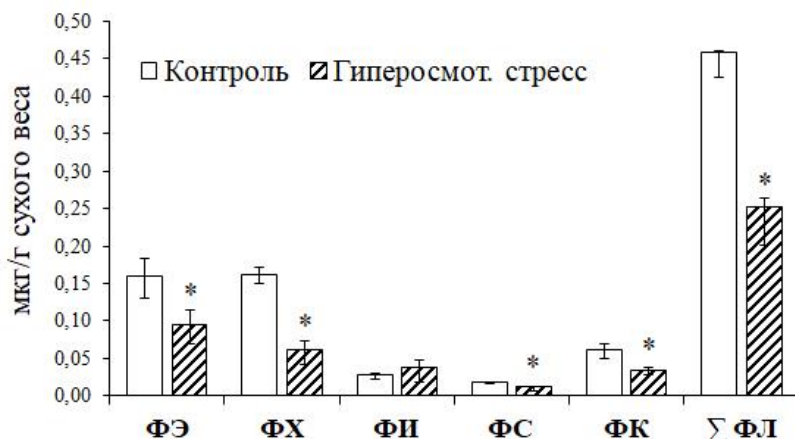


Рис. 9. Содержание фосфолипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гиперосмотического стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентилями. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

Соотношение ФХ/ФЭ при гиперосмотическом стрессе существенно снижалось – на 36% (табл. 2). По данным, полученным на плазматических мембранах при солевом стрессе, снижение соотношения ФХ/ФЭ способствовало процессу дегидратации, увеличению проницаемости мембран и могло приводить к стрессовому повреждению мембран, нарушению их целостности, вызывало образование каналов, через которые осуществлялся пассивный транспорт воды (Wu et al., 2005).

Количество ФС снижалось на 33% после стресса. Такое снижение ФС может быть связано с уменьшением дестабилизации бислоя мембраны. ФС, ФЭ и ФК определяют электроотрицательные свойства мембраны, которые, в свою очередь, регулирует клеточную активность путем направления белков в определенную область мембраны (Platre et al., 2018). ФС необходим в качестве кофактора для нескольких важных ферментов, таких как протеинкиназа С и Raf-1 киназа, которые участвуют в сигнальных путях (Vance and Steenbergen, 2005). Содержание ФК в тонопласте статистически значимо уменьшалось после гиперосмотического воздействия (рис. 9), как и после окислительного стресса (рис. 5). Следует отметить, что ФК является не только продуктом гидролиза, но и материалом для синтеза других ФЛ.

Результаты исследований динамики изменения содержания ГЛ в тонопласте после гиперосмотического воздействия (рис. 10) показали, что количество МГДГ и ДГДГ существенно снижались, на 50% и на 62% соответственно.

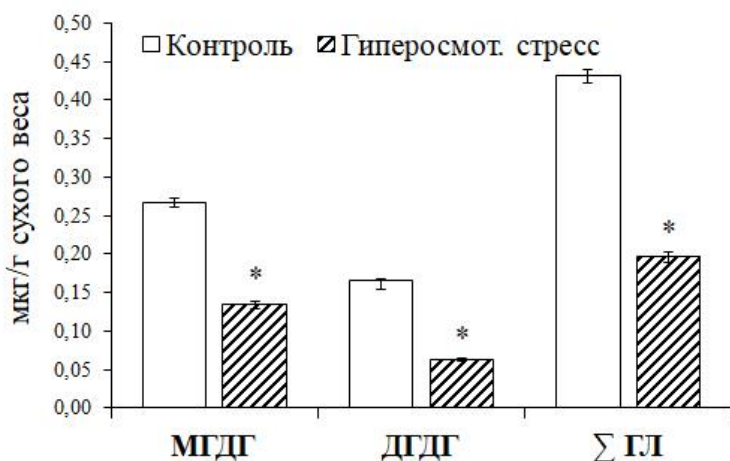


Рис. 10. Содержание гликоглицеролипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гиперосмотического стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

Исследователи пришли к заключению, что более интенсивное снижение содержания МГДГ происходит у устойчивых растений, что объясняется их толерантностью к высокой температуре. Это связано с тем, что увеличение содержания МГДГ может нарушать целостность липидного бислоя, вызывая переход в гексагональную липидную фазу (Su et al., 2009). В результате нашего исследования в тонопласте при гиперосмотическом стрессе не только резко снижалось содержание ДГДГ, а также отношение ДГДГ к МГДГ (табл. 2). По данным других исследователей снижение соотношения ДГДГ/МГДГ встречается редко, но в таких случаях одновременно происходит увеличение МГДГ, что также может быть связано с образованием небислойной гексагональной липидной фазы в мембране. Результаты, полученные в наших экспериментах, свидетельствуют о некотором снижении всех вышеперечисленных показателей при гиперосмотическом стрессе. Такой защитный механизм не был обнаружен на других мембранах, и может быть связан с особенностями строения вакуолярной мембраны, которая, по липидному составу во многом аналогична другим внутриклеточным мембранам, обладает рядом отличий, например, более высоким липид/белковым соотношением (Салаяев и др., 1981).

На рисунке 11 показаны изменения содержания стеринов вакуолярных мембран после гиперосмотического воздействия. При гиперосмотическом стрессе, несмотря на то

что содержание общих стероидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* статистически значимо не изменилось, отмечены изменения среди следующих классов стероидов: уменьшение содержания β -ситостерина и увеличение содержания кампестерина (рис. 22). Кампестерин, как и стигмастерин исследователи считают «стрессовыми» стероидами (Kumar et al., 2015; Валитова и др., 2016). Кроме того, кампестерин используется в синтезе брассиностероидов, которые влияют на мембранный потенциал и состав жирных кислот (Vajguz et al., 2020).

При всех изучаемых нами стрессовых воздействиях увеличивалось соотношение стигмастерин/ β -ситостерин, которое, по мнению ряда исследователей, вызывает активизацию защитных механизмов растительной клетки (Han et al., 2009; Griebel and Zeier, 2010). Однако больше всего это соотношение увеличивалось при гиперосмотическом стрессовом воздействии – на 50% (табл. 2).

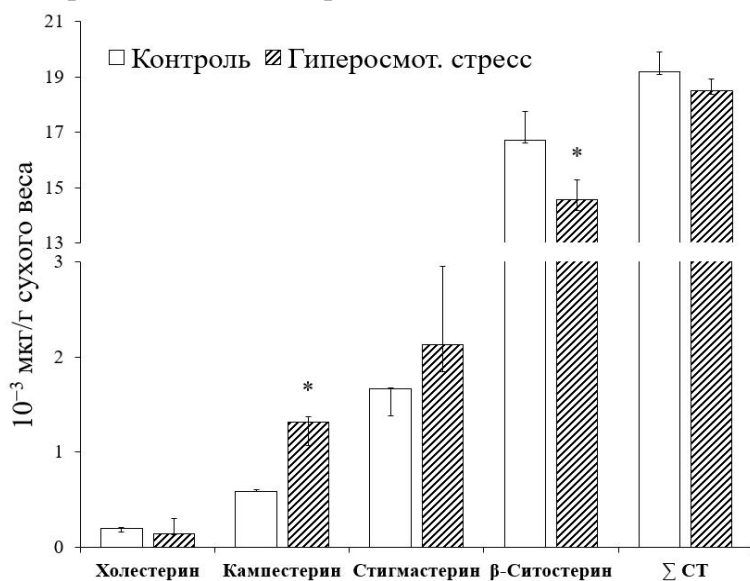


Рис. 11. Содержание стероидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гиперосмотического стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

Таким образом, при гиперосмотическом стрессовом воздействии суммарное количество липидов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* уменьшалось на 41,8% от контроля. Значительные изменения отмечены в жирнокислотном составе липидов для минорных ЖК. Количество лауриновой, миристиновой и стеариновой ЖК увеличивалось, а содержание линолевой ЖК снижалось. Количество почти всех классов полярных липидов уменьшалось, за исключением ФИ. Установлено, что в условиях стрессового воздействия содержание кампестерина резко возрастало (в два раза), а количество β -ситостерина немного снижалось.

Влияние гипоосмотического стрессового воздействия на липидный профиль тонопласта

При воздействии гипоосмотического стрессового воздействия статистически значимых различий в содержании суммарных липидов не было обнаружено (рис. 12).

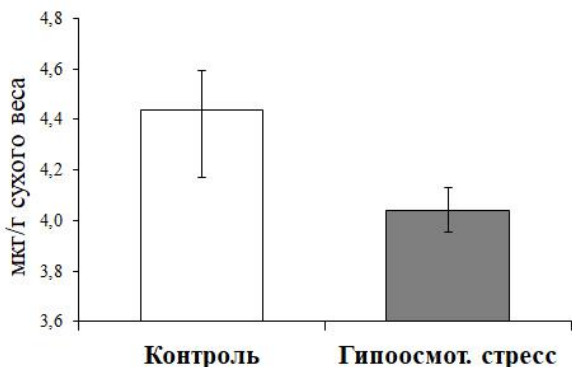


Рис. 12. Содержание суммарных липидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гипоосмотического стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

В нашем исследовании при гипоосмотическом воздействии на тонопласт статистически значимые различия были обнаружены в изменении содержания только минорных ЖК, миристиновой (C14:0), пальмитолеиновой (C16:1(n-9) и C16:1(n-7)) и стеариновой (C18:0), а также появилась лауриновая ЖК (C12:0) (табл. 7). Причем увеличение уровня стеариновой ЖК наблюдалось только при осмотических стрессах. В настоящее время доказана важная роль короткоцепочечных ЖК как сигнальных молекул, принимающих участие в регуляции экспрессии целого ряда генов, регулирующих клеточные функции и поддерживающие гомеостаз (Tan et al., 2014). Кроме того, в исследованиях (Zemanova et al., 2015) по изучению влияния стресса, вызванного ионами кадмия на жирнокислотный состав липидов *Noccaea caerulea*, было высказано предположение об эффективной стратегии ослабления повреждений, вызванных окислительным стрессом, насыщенными короткоцепочечными ЖК (12:0, 14:0), которые являются предшественниками различных НЖК (в основном пальмитиновой).

Таблица 4

Влияние гипоосмотического стресса на жирнокислотный состав липидов вакуолярных мембран корнеплодов *Beta vulgaris*, (% от суммы ЖК)

| Жирные кислоты | Контроль | Гипоосмот. стресс |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| C12:0, лауриновая | - | 0,12 [0,12; 0,13] |
| C14:0, миристиновая | 0,32 [0,3; 0,34] | 0,46 [0,42; 0,46] * |
| C15:0, пентадекановая | 1,04 [0,97; 1,06] | 1,13 [1,08; 1,18] |
| C16:0, пальмитиновая | 29,53 [29,39; 31,54] | 29,3 [29,11; 30,16] |
| C16:1, пальмитолеиновая | 0,8 [0,72; 0,81] | 1,06 [0,99; 1,12] * |
| C17:0, маргариновая | 0,24 [0,24; 0,25] | 0,25 [0,24; 0,25] |
| C18:0, стеариновая | 0,92 [0,9; 0,95] | 1,38 [1,28; 1,67] * |
| C18:1(n-9), олеиновая | 23,01 [22,9; 23,21] | 22,54 [22,33; 23,04] |
| C18:1(n-7), цис-вакценовая | 0,93 [0,87; 1,02] | 1,05 [1,02; 1,06] |
| C18:2(n-6), линолевая | 39,97 [37,95; 40,08] | 38,45 [37,91; 38,74] |
| C18:3(n-3), линоленовая | 2,77 [2,52; 2,9] | 2,5 [2,31; 2,58] |
| C20:0, арахидиновая | - | 0,4 [0,28; 0,41] |
| C20:1(n-11), гадоленовая | 0,39 [0,36; 0,39] | 0,45 [0,3; 0,46] |
| C20:2(n-9) | - | 0,11 [0,1; 0,22] |
| C22:0, бегеновая | 0,21 [0,19; 0,24] | 0,31 [0,27; 0,31] |
| C22:1(n-11) | - | 0,19 [0,16; 0,21] |
| ИДС | 1,14 [1,089; 1,14] | 1,1 [1,09; 1,11] |
| ΣНЖК | 32,16 [31,99; 34,32] | 33,55 [33,02; 34,37] |
| ΣННЖК | 67,84 [65,68; 68,01] | 66,45 [65,63; 66,98] |
| ΣННЖК/ΣНЖК | 2,11 [1,93; 2,13] | 1,98 [1,91; 2,03] |

Примечание: Ме [25%;75%]. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее множественное сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

По сравнению с окислительным и гиперосмотическим воздействиями, после гипоосмотического стресса статистически значимые изменения произошли только с ФИ и ФК (рис. 13). В наших экспериментах только при гипоосмотическом воздействии произошло увеличение ФИ (почти в 2 раза).

Обычно в клеточных мембранах ФИ содержится немного – от 2 до 8% от всех ФЛ, но их функциональная роль велика, особенно в процессах сигналинга (Xue et al., 2009). ФИ участвуют в регуляции содержания внутриклеточного кальция, и повышение количества ФИ может быть связано с процессами адаптации (Berridge and Irvine, 1984). Известно, что ФИ выполняют также «якорную» функцию. ФИ с присоединенным к

одной из гидроксильных групп инозита олигосахаридом называют гликозилфосфатидинозитами (ГФИ). С ГФИ некоторые белки образуют ковалентную связь через ФЭ. ГФИ могут направлять белки в микродомены, а также гидролиз ГФИ может регулировать функции белков, позволяя заякоренным белкам диффундировать вне мембраны и участвовать в других клеточных процессах (Yeats et al., 2018).

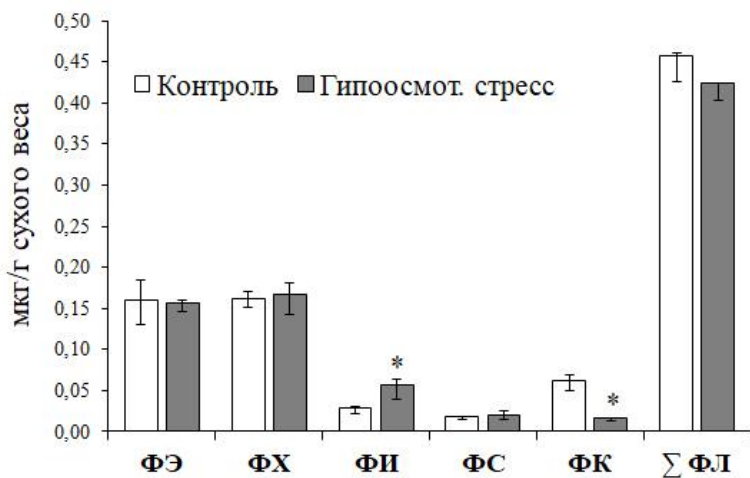


Рис. 13. Содержание фосфолипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гипоосмотического стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

Количество ФК в тонопласте снизилось на 74% после гипоосмотического стресса, такое снижение наблюдалось и при других стрессах, изучаемых нами (рис. 5, 9, 13). В работах других исследователей количество ФК увеличивалось, но в исследовании воздействия высокой температуры (34 °C) на *Kalanchoe daigremontiana* ФК в тонопласте уменьшалась в два раза (Behzadipour et al., 1998). Некоторое снижение ФК может стабилизировать ламеллярную структуру мембраны (Welti et al., 2002).

Несмотря на то, что статистически значимых различий в содержании ФЭ и ФХ не было обнаружено, но отношение ФХ к ФЭ все-таки немного изменялось в сторону увеличения (на 4,9%) (табл. 2). Отношение ФХ к ФЭ показывает устойчивость мембран, поэтому повышение ФХ/ФЭ снижает образование небислойных фаз в мембране.

В условиях гипоосмотического воздействия при анализе содержания ГЛ вакуолярной мембраны обнаружено, что количество МГДГ, а также сумма ГЛ снизились (рис. 14), но такое снижение было не так сильно выражено по сравнению с гиперосмотическим стрессом.

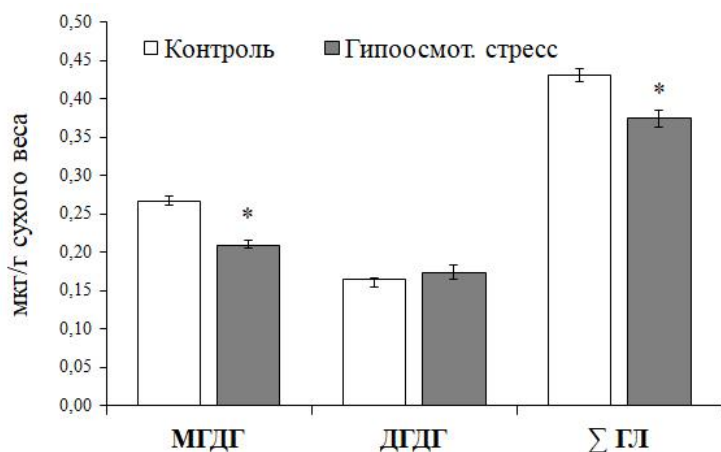


Рис. 14. Содержание гликоглицеролипидов в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гипоосмотического стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

Детальное сравнение растений с различной восприимчивостью к стрессу, вызванному обезвоживанием, показало, что снижение уровня МГДГ сопровождалось увеличением олигогалактолипидов, ФИ и ФК (Okazaki and Saito, 2014). Исследователи предположили, что механизм снижения содержания МГДГ в листьях *Arabidopsis thaliana*

может быть вызван усилением деградации и снижением биосинтеза этого ГЛ (Chen et al., 2006). Возможно также, что МГДГ используется для синтеза ДГДГ путем галактозилирования МГДГ с УДФ-галактозой в качестве донора сахара с помощью ДГДГ-синтаз (Kelly et al., 2003). ДГДГ благодаря своей структуре образуют стабильные ламеллярные (двуслойные) структуры.

Суммарное содержание стерина в наших экспериментах снижалось при гипоосмотическом стрессе (рис. 15). Уменьшение содержания общих стерина при гипоосмотическом стрессе в вакуолярной мембране связано со снижением количества β -ситостерина, преобладающего среди стерина. Увеличение содержания стигмастерина и снижение содержания β -ситостерина, вероятно, связано с тем, что β -ситостерин является предшественником стигмастерина. Они оба относятся к 24-этилстеринам, тогда как кампестерин относится к 24-метилстеринам. Его молекула имеет меньшую свободу вращения С-17 углеводородной цепи благодаря более короткому размеру цепи, что позволяет плотнее упаковывать липидный бислой, и это приводит к снижению проницаемости мембраны для заряженных ионов (Edwards and Green, 1972). Отношение стигмастерина к β -ситостерину возрастало (табл. 2).

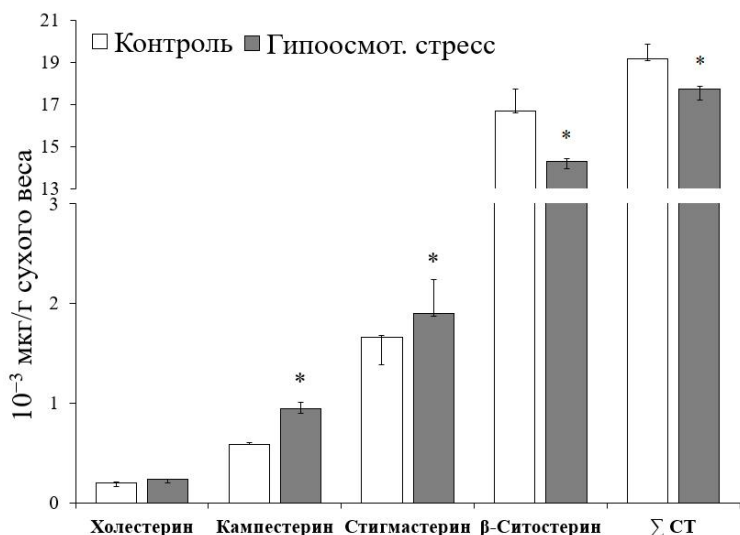


Рис. 15. Содержание стерина в тонопласте корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях гипоосмотического стресса

Примечание: Ме, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентиля. * – наличие значимых различий, значимость различий рассчитана с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса. Последующее сравнение проводили по методу Стьюдента-Ньюмена-Кеулса.

Таким образом, при гипоосмотическом стрессовом воздействии среди жирнокислотного состава липидов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* возрастало количество минорных ЖК (лауриновой, миристиновой, стеариновой, пальмитолеиновой). При изучении изменений полярных липидов отмечено значительное увеличение количества ФИ и снижение МГДГ и ФК. Среди стерина возрастало содержание кампестерина и стигмастерина и снижалось количество β -ситостерина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Роль липидов тонопласта в защите растительной клетки от стресса в настоящее время мало исследована. Изучение состава липидов вакуолярной мембраны ранее проводились только при температурных стрессах. В наших экспериментах были обнаружены изменения жирнокислотного состава, фосфолипидов, гликоглицеролипидов и стерина вакуолярной мембраны корнеплодов *Beta vulgaris* при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах.

Оценка изменения содержания различных классов липидов в условиях окислительного и осмотических стрессовых воздействий позволяет выделить ряд стратегий защиты растительных клеток от стресса, связанных с липидами вакуолярной мембраны. Можно выделить специфические и неспецифические стратегии. Неспецифические стратегии (табл. 5) характерны для всех изученных видов стресса.

Таблица 5

Неспецифические стратегии защитного действия липидов тонопласта при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах

| Липиды | Окислит. стресс | Гиперосмот. стресс | Гипоосмот. стресс |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| НЖК | Повышение (на 5,7%) | Повышение (на 16,85%) | Повышение (на 4,3%) |
| ФК | Снижение (на 68%) | Снижение (на 45%) | Снижение (на 74%) |
| ФЭ | Снижение (на 8,7%) | Снижение (на 41,25%) | Снижение (на 2,5%) |
| Стигмастерин | Повышение (на 113%) | Повышение (на 27,9%) | Повышение (на 14%) |
| Кампестерин | Повышение (на 38,7%) | Повышение (на 122,7%) | Повышение (на 60,8%) |
| Стигмастерин/ β-ситостерин | Повышение (на 14%) | Повышение (на 50%) | Повышение (на 30%) |

К неспецифическим стратегиям относятся: увеличение количества НЖК, главным образом минорных ЖК – лауриновой (C12:0), миристиновой (C14:0) и стеариновой (C18:0) кислоты. Можно также отнести в данную категорию снижение содержания ФК, ФЭ и изменения в содержании стигмастерина, кампестерина и соотношения стигмастерин/ситостерин, которое увеличивалось при всех стрессах.

Специфические стратегии связаны с изменениями содержания липидов, которые различались при разных стрессах (табл. 6). К ним относятся изменения содержания общих и отдельных ГЛ (МГДГ, ДГДГ), изменение содержания суммы стеринов и соотношения ФХ/ФЭ. Из литературных данных известно, что такие изменения часто приводят к активации защитных реакций и стабилизации липидного бислоя. Снижение соотношения ФХ/ФЭ среди мембранных липидов приводит к увеличению проницаемости мембраны, образованию водных каналов. Мы наблюдаем результаты реализации этой стратегии при гиперосмотическом стрессе. Тогда как при гипоосмотическом стрессе для защиты клетки нужно снизить проницаемость тонопласта и соотношение ФХ/ФЭ изменяется в сторону увеличения.

Таблица 6

Специфические стратегии защитного действия липидов тонопласта при окислительном, гипер- и гипоосмотическом стрессах

| Липиды | Окислит. стресс | Гиперосмот. стресс | Гипоосмот. стресс |
|-----------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| ФХ/ФЭ | Снижение (на 6,8%) | Снижение (на 37,2%) | Повышение (на 4,9%) |
| Σ ГЛ | Повышение (на 74,7%) | Снижение (на 45,5%) | Снижение (на 13%) |
| МГДГ | Повышение (на 28,3%) | Снижение (на 49,8%) | Снижение (на 21,7%) |
| ДГДГ | Повышение (на 246,7%) | Снижение (на 62,4%) | Повышение (на 4,8%) |
| ДГДГ/МГДГ | Повышение (на 168%) | Снижение (на 25,8%) | Повышение (на 33,9%) |
| Σ СТ | Повышение (на 89,2%) | Снижение (на 3,6%) | Снижение (на 7,4%) |

Особенно заметную роль в специфических стратегиях тонопласта играют ГЛ, что, вероятно, связано с их влиянием на переход мембраны из ламеллярного состояния в гексагональное. Это состояние может присутствовать в мембране при гиперосмотическом стрессе, и оно может приводить к активизации определенных ферментов. Из всех изучаемых классов липидов наиболее существенные изменения происходили в содержании стерина, что связано с их ролью в регуляции таких характеристик мембраны как проницаемость, микровязкость и жесткость. По нашему мнению, именно стерин является основным компонентом адаптационных механизмов тонопласта.

Изучаемые стрессовые воздействия вызвали изменения в содержании мембранных липидов, что можно рассматривать как элемент фенотипической адаптации (рис. 16).

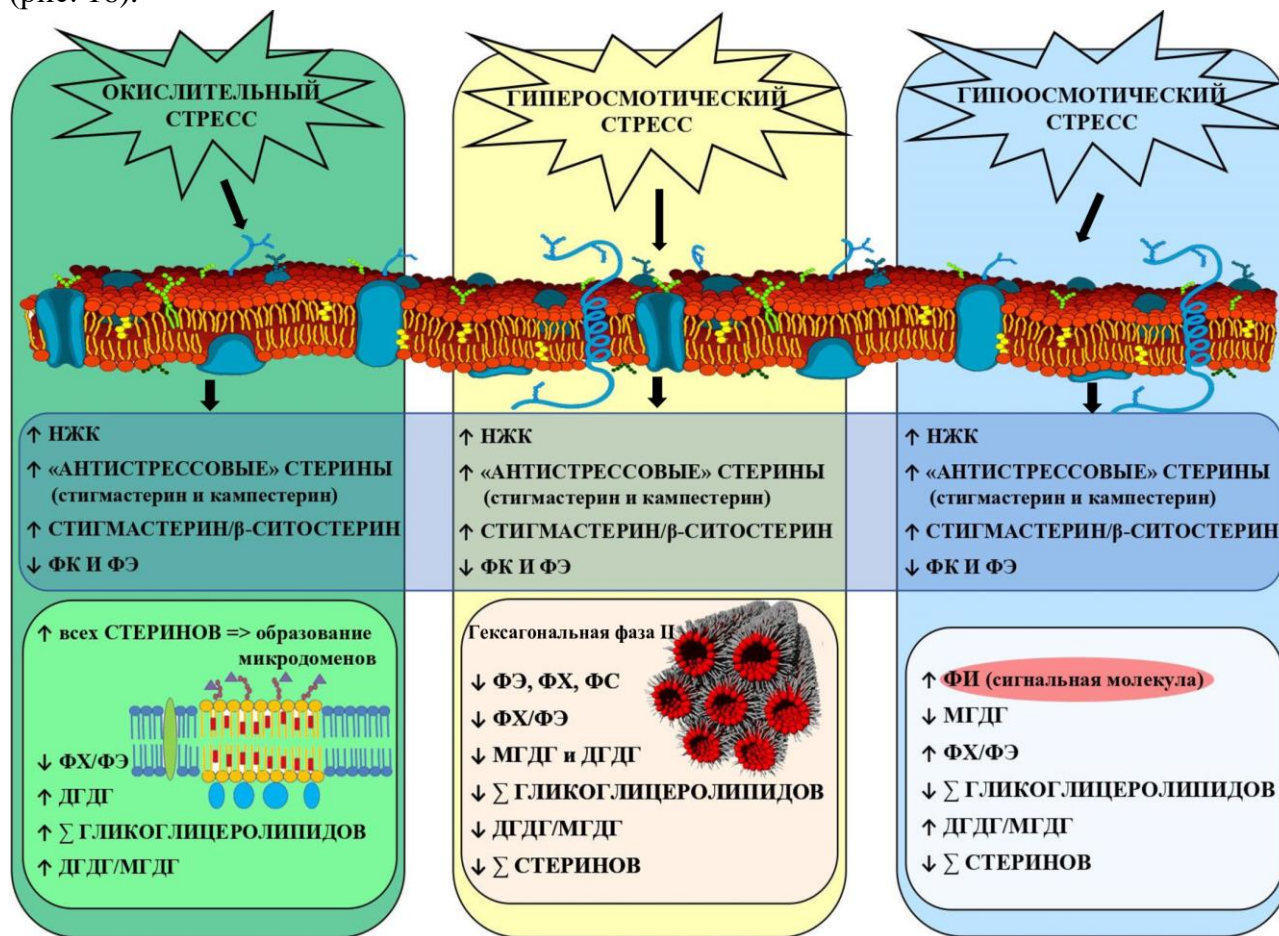


Рис. 16. Схема изменений липидного состава вакуолярной мембраны корнеплодов *Beta vulgaris* в условиях окислительного и осмотических стрессовых воздействий
 Обозначения: ↑ – повышение количества липидов, ↓ – снижение количества липидов.

Различные классы липидов вакуолярной мембраны могут принимать участие в защите растительной клетки от абиотических стрессов, с использованием специфических и неспецифических стратегий. Главные из них направлены на стабилизацию липидного бислоя, увеличение содержания липидов, ответственных за активизацию защитных сил (стигмастерин, кампестерин), изменение таких свойств мембраны как проницаемость и микровязкость.

ВЫВОДЫ

1. При изучаемых стрессовых воздействиях отмечены изменения в составе всех классов липидов, что говорит об их участии в защитных механизмах растительной клетки.

2. Наиболее существенные изменения отмечены среди мембранных стеринов, особенно после окислительного стресса.

3. Одна часть выявленных изменений в содержании и составе липидов была присуща всем изучаемым стрессовым воздействиям, другая была характерна только определенному стрессу.

4. При окислительном стрессовом воздействии существенные изменения были отмечены для короткоцепочечных НЖК (лауриновой, пентадекановой, пальмитиновой), ФЭ, ФК и ДГДГ, но наиболее интенсивные изменения происходили в составе стеринов тонопласта – существенно возрастали все классы стеринов.

5. Исследования липидного профиля тонопласта при гиперосмотическом воздействии показали увеличение количества минорных ЖК (лауриновой, миристиновой и стеариновой). Кроме того, снижалось содержание всех полярных липидов и β -ситостерина. Однако количество кампестерина повышалось в два раза.

6. При изучении гипоосмотического воздействия на липидный состав вакуолярной мембраны установлено, что возрастает содержание минорных ЖК (лауриновой, миристиновой, стеариновой, пальмитолеиновой). Отличительной особенностью этого стресса было двукратное увеличение количество ФИ. Отмечен также рост содержания кампестерина и стигмастерина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. **Гурина В. В.** Влияние окислительного стресса на состав жирных кислот липидов вакуолярной мембраны корнеплодов столовой свеклы / **В. В. Гурина**, Н. В. Озолина, И. С. Нестеркина, Н. В. Семенова, В. Н. Нурминский // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6, № 2. – С. 57-64. doi: 10.21285/2227-2925-2016-6-2-57-64.

2. Озолина Н. В. Жирнокислотный состав общих липидов вакуолярной мембраны при абиотическом стрессе / Н. В. Озолина, **В. В. Гурина**, И. С. Нестеркина, Л. В. Дударева, А. И. Катышев, В. Н. Нурминский // Биологические мембраны. – 2017. – Т. 34, № 1. – С. 63-69. doi: 10.7868/S0233475517010078.

3. Озолина Н. В. Динамика содержания фосфолипидов вакуолярной мембраны корнеплодов столовой свеклы при абиотических стрессах / Н. В. Озолина, **В. В. Гурина**, И. С. Нестеркина, В. Н. Нурминский // Физиология растений. – 2018. – Т. 65, № 5. – С. 358-365. doi: 10.1134/S0015330318050238.

4. Нестеркина И. С. Изменение содержания стеринов тонопласта при осмотическом стрессе / И. С. Нестеркина, **В. В. Гурина**, Н. В. Озолина, В. Н. Нурминский // Биологические мембраны. – 2019. – Т. 36, № 4. – С. 301–304. doi: 10.1134/S0233475519040108.

5. **Gurina V. V.** Effects of abiotic stresses on the content of glycolipids in the vacuolar membrane of red beetroot / **V. V. Gurina**, N. V. Ozolina, I. S. Nesterkina, V. N. Nurminsky // Biochem. Moscow Suppl. Ser. A. – 2019. – V. 13. – P. 92–95. doi: 10.1134/S1990747818040062.

Статьи, опубликованные в иностранных журналах

6. Ozolina N. V. Variations in the content of tonoplast lipids under abiotic stress / N. V. Ozolina, **V. V. Gurina**, I. S. Nesterkina, V. N. Nurminsky // Planta. – 2020. – V. 251, N 6. – Art. 107. doi: 10.1007/s00425-020-03399-x.

Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

7. **Гурина В. В.** Влияние окислительного стресса на содержание диеновых конъюгатов в корнеплодах столовой свеклы / **В. В. Гурина**, И. С. Нестеркина //

БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА : Сборник тезисов 20-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых (Пушино, 18 - 22 апреля 2016 г.). Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова. – 2016. – С. 349.

8. **Гурина В. В.** Влияние окислительного стресса на проницаемость клеточных мембран корнеплодов столовой свеклы / **В. В. Гурина**, И. С. Нестеркина, Н. В. Озолина // Симбиоз-Россия 2016 : Сборник материалов IX Всерос. Конгр. молодых ученых-биологов (Пермь, 4-6 июля 2016 г.). Изд-во Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – 2016. – С. 11-12.

9. **Гурина В. В.** Влияния разных видов абиотического стресса на жирнокислотный состав вакуолярной мембраны / **В. В. Гурина**, Н. В. Озолина, И. С. Нестеркина, В. Н. Нурминский // Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде : Сборник материалов всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 12-15 сентября 2016 г.). Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2016. – С. 77-78.

10. **Гурина В. В.** Жирнокислотный состав липидов тонопласта при окислительном стрессе / **В. В. Гурина**, И. С. Нестеркина, Н. В. Озолина // Россия – Монголия : Сборник материалов Международной молодежной научно-практической конференции (Иркутск, Россия, 16-21 мая 2016 г.; Улан-Батор, Монголия, 5-10 сентября 2016 г.). Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2016. – С. 15-17.

11. **Гурина В. В.** Влияние абиотических стрессов на фосфолипидный состав вакуолярной мембраны / **В. В. Гурина**, Н. В. Озолина, И. С. Нестеркина, Е. В. Спиридонова // Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки : Сборник материалов докладов II Всероссийской научной конференции с международным участием (Иркутск, 22–24 мая 2018 г.). Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – С. 33-34. doi: 10.31255/978-5-94797-318-1-33-34.

12. **Гурина В. В.** Гликоглицеролипиды тонопласта под влиянием абиотических стрессов / **В. В. Гурина**, Н. В. Озолина, И. С. Нестеркина, Е. В. Спиридонова // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды : Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (в 2-х частях) (Иркутск, 10–15 июля 2018 г.). Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН. – 2018. – Ч. I. – С. 249-251. doi: 10.31255/978-5-94797-319-8-249-251.

13. Широкова Л. В. Роль мембранных липидов в защите клетки от стресса / Л. В. Широкова, **В. В. Гурина** // Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий : Сборник материалов Международной научно-практической конференции (Иркутск, 23 апреля 2018 г.). Изд-во ИГУ. – 2018. – С. 200-201.

14. Озолина Н. В. Влияние разных видов абиотического стресса на динамику содержания общих стеринов тонопласта столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) / Н. В. Озолина, **В. В. Гурина**, И. С. Нестеркина // Физиология растений – основа создания растений будущего : Сборник тезисов докладов IX Съезда общества физиологов растений России (Казань, 18-24 сентября 2019 г.). Изд-во Казан. ун-та – 2019. – С. 324. doi: 10.26907/978-5-00130-204-9-2019-324.

15. **Гурина В. В.** Липиды вакуолярной мембраны в защите растительной клетки от стресса // **В. В. Гурина**, Н. В. Озолина // Липиды 2021 : Сборник материалов докладов Всероссийской научной конференции с международным участием (Москва, 11-13 октября 2021 г.). Изд-во ИБХ РАН. 2021. – С. 21.