

УДК 581.1, 577.115

КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ФРАКЦИЙ СТЕРИНОВ ТОНОПЛАСТА В УСЛОВИЯХ СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ИОНАМИ МЕДИ

© 2024 г. И. С. Капустина^а, Е. В. Спиридонова^а, Н. В. Озолина^а,
А. В. Третьякова^б, В. В. Гурина^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

*e-mail: nichka.g@bk.ru

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 26.03.2024 г.

Исследовано влияние токсических концентраций ионов меди (Cu^{2+}) (100 и 500 мкМ) на состав стеринов вакуолярной мембраны корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). В результате проведенных исследований выявлено 12 соединений во фракции свободных стеринов (СС) и 11 соединений во фракции эфиров стеринов (ЭС). В составе ЭС присутствовали соединения, не обнаруженные в составе СС. Интересно, что при 500 мкМ Cu^{2+} суммарное содержание этих биологически активных соединений увеличивалось. Наблюдалось снижение таких три-терпенов как ланоста-7,9(11)-диен-3 β ,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)-(C₃₄H₅₄O₅) в СС и ЭС. Во фракции СС происходило повышение содержания соединения 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- при стрессе, в то время как в ЭС его количество снижалось. Установлено, что суммарное содержание Δ^5 -стеринов, в норме и при стрессе, составляло не более 33% во фракции свободных стеринов и 21% во фракции эфиров стеринов. Преобладающим стеринотерпеном был β -ситостерин. Его содержание снижалось в условиях изучаемого стресса в обеих фракциях стеринотерпенов. Полученные результаты показывают, что фракции стеринотерпенов тонопласта (СС и ЭС) представлены не только Δ^5 -стеринами, которые в основном изучаются в работах посвященным мембранологии и липидологии растений, а также соединениями тритерпенового ряда и другими веществами, обладающими биологической активностью. Обнаруженные вещества, возможно, могут влиять на биофизические показатели тонопласта и на метаболические процессы клетки, в которых задействована вакуолярная мембрана. Выявленные соединения активно реагировали на токсическое воздействие ионов Cu^{2+} , что можно рассматривать как один из механизмов защиты растительной клетки от стресса.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, вторичные метаболиты, ионы меди, стерины, тонопласт, эфиры стеринотерпенов

DOI: 10.31857/S0015330324040075, EDN: MNSAQX

ВВЕДЕНИЕ

Действие тяжелых металлов (ТМ), по-разному отражается на физиологии растений. Растения способны экстрагировать из почвы и воды медь, мышьяк, кадмий, ртуть, селен, свинец и другие элементы. Токсическая доза металлов зависит от типа иона, его концентрации, вида растения и стадии его роста. Важно отметить, что диапазон концентраций Cu^{2+} , не оказывающих выраженного токсического воздействия, весьма узок для разных растений. Медь (Cu^{2+}) — является одним из

незаменимых микроэлементов для жизнедеятельности растений. Известно, что Cu^{2+} входит в состав пластоцианина, осуществляющего перенос электронов между фотосистемами I и II в процессе фотосинтеза. Значительная роль Cu^{2+} и в азотном обмене растений. Также Cu^{2+} участвует в регулировании водного баланса. Почти вся доля Cu^{2+} в низких концентрациях прочно связана с различными белками. При переизбытке накопления Cu^{2+} в почвах из эссенциального микроэлемента она становится токсичным поллютантом второго класса опасности — тяжелым металлом, обладающим высокой реакционной способностью по отношению к произрастающим на данной территории

Сокращения: СС — свободные стерины, ТМ — тяжелые металлы, ЭС — эфиры стеринотерпенов.

растениям. Избыточная аккумуляция Cu^{2+} в растениях приводит к нарушению многих метаболических реакций, что отражается на снижении биомассы и качестве сельскохозяйственной продукции, либо приводит к полной гибели растения [1–3]. В связи с этим большой интерес вызывают различные биологические методы очистки окружающей среды от ТМ. Эти методы считаются разумными и безопасными, так как основаны на естественных механизмах, встречающихся в природе. Одним из таких методов является фиторемедиация — очищение окружающей среды от различных загрязнителей при помощи живых растений. В настоящее время наиболее распространенным методом фиторемедиации является фитоэкстракция, которая заключается в поглощении растениями загрязнителей из почвы и концентрировании их в различных органах с последующей уборкой загрязненной фитомассы [4]. Понимание механизмов того, как растения способны детоксифицировать металлы, имеет значение для расширения ряда растений, которые можно использовать для фиторемедиации [5]. Растения выработали механизмы, позволяющие справляться с токсичностью тяжелых металлов (связывание с клеточной стенкой, образование комплексов с органическими кислотами или пептидами), вакуолярная секвестрация (компартиментализация) является одним из них. Интересно, что форма и объем вакуоли реагируют на токсические концентрации ТМ, что дополнительно указывает на участие этой органеллы в ответах растений на стресс. Токсические ионы ТМ, вероятно, мешают клеточным и молекулярным механизмам, связанным с вакуолярным биогенезом [6]. Вакуолярная секвестрация может достигаться либо фитохелатин-зависимым, либо фитохелатин-независимым путями. Большинство описанных в литературе трансгенных растений, предназначенных для фиторемедиации, являются результатом манипуляции генами, участвующими в фитохелатин-зависимом пути. Однако недавно появились данные, подтверждающие важность фитохелатин-независимого пути секвестрации тяжелых металлов в вакуоли, при этом важную роль играют металл/ H^+ -антипортеры и протонные насосы [7]. Показано, что активность интегральных белков — ферментов (АТФазы, десатуразы) зависит от липидного окружения, а именно от количества стеринового компонента мембраны [8]. Известно, что стерин регулирует микровязкость, пластичность, ригидность, фазовый переход и характер липид-белкового взаимодействия в мембране [9]. Кроме того, стерин принимает непосредственное участие в трансмембранной трансдукции сигналов внутрь клетки

посредством формирования в мембранах специфических липидных микродоменов [10]. Доказана роль стерина и в защите от стрессовых воздействий. Так, например, показано, что при окислительном и осмотическом видах стрессового воздействия изменения в содержании стерина, были значительно более выражены на вакуолярной мембране по сравнению с плазмалеммой [9]. Известно, что фитостерины — класс растительных веществ, относящихся к семейству тритерпеноидов, насчитывающих более двухсот собственно стерина и более 4000 других типов тритерпенов. Тритерпены в свою очередь входят в группу вторичных метаболитов изопреноидов, которые представляют собой группу структурно разнообразных фитохимических веществ, связанных с первичным, а также вторичным метаболизмом [8, 11]. Известно, что изопреноиды выполняют функцию фитогормонов (абсцизовая кислота, цитокинины, гиббереллины, брассиностероиды), являются компонентами переносчиков электронов (цитохром *a*, хиноны), необходимы для фотосинтеза (каротиноиды, фитильная цепь в хлорофиллах), играют важную роль в химической защите растений и взаимодействии с окружающей средой, участвуют в мембранной проницаемости и текучести (стерины). Таким образом, изопреноиды участвуют в регуляции процессов роста и развития, а также активно задействованы в формировании устойчивости растений к стрессовому воздействию. Интересно, что стерин и тритерпеноиды синтезируются из одного общего предшественника — 2,3-оксидосквалена. В связи с этим существует гипотеза о конкуренции биосинтеза стерина и тритерпенов в зависимости от экзо- и эндогенных процессов. Однако, учитывая решающую роль фитостеролов как компонентов мембран, было высказано предположение, что неограниченный биосинтез тритерпеноидов может происходить, когда образование стерина уже удовлетворено, и эти соединения больше не нужны для роста и деления клеток [12].

Таким образом, анализ литературы свидетельствует о том, что понимание механизмов того, как растения способны поглощать, накапливать, перемещать, изолировать металлы имеет решающее значение для увеличения количества растений, которые можно использовать для фиторемедиации участков, загрязненных тяжелыми металлами. Некоторые из перечисленных механизмов взаимосвязаны с вакуолярной мембраной, в функционировании которой активно задействованы изопреноиды. В связи с этим целью данного исследования состояла в анализе качественного и количественного состава компонентов фракций стерина тонопласта в ответ на стрессовое воздействие, вызванное ионами Cu^{2+} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.), выращенные на опытном участке СИФИБР СО РАН. Корнеплоды хранили в овощехранилище при +4°–5°C. Корнеплоды свеклы *Beta vulgaris* L. были выбраны в качестве объекта нашего исследования, потому что они являются запасующим органом, в вакуолях которого происходят интенсивные транспортные процессы, для выделения вакуолей из корнеплодов разработана методика получения чистой фракции вакуолей, к тому же корнеплоды хорошо хранятся, что дает возможность проводить эксперименты в течение длительного времени.

Условия стресса. Кусочки корнеплодов 1 см³ замачивали в растворе CuSO₄·5H₂O на 16 ч при комнатной температуре. Медь применяли в концентрациях 100 и 500 мкМ в пересчете на ионы, поскольку при этих концентрациях наблюдалось выраженное увеличение содержания диеновых конъюгатов и электролитов [13]. В контрольном варианте использовали дистиллированную воду.

Изолирование вакуолей. Выделение вакуолей из ткани корнеплодов проводили модифицированным макрообъемным методом, разработанным в лаборатории физиологии растительной клетки СИФИБР СО РАН [14]. Детали стандартных операций этого метода заключались в следующем: 600 г запасующей ткани корнеплодов *Beta vulgaris* L. нарезали специальным аппаратом в 800 мл среды изолирования (800 мМ KCl, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ NaH₂PO₄/KOH, pH 8.0). Раствор с нарезанной массой фильтровали (диаметр отверстия фильтра 400 мкм). Суспензию центрифугировали 15 мин при 250 g на центрифуге K-70 (“Janetzki”, ГДР). Затем осадок вакуолей ресуспендировали в 20 мл раствора, содержащего 1 М KCl, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl₂, 5 мМ трис – HCl, pH 7.4. Полученную суспензию центрифугировали 10 мин при 50 g на препаративной центрифуге K-23 (“Janetzki”, ГДР).

Получение вакуолярных мембран. Для получения вакуолярных мембран осадок вакуолей подвергали осмотическому шоку в гипотоническом растворе (1 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ трис-HCl, pH 7.4). Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 5000 g на препаративной центрифуге KR-22 (“JOUAN”, Франция). Надосадочную жидкость, содержащую везикулы тонопласта, центрифугировали 90 мин при 105000 g на препаративной центрифуге Sorvall Discovery 90SE (“Thermo”, Япония). Полученный осадок собирали и хранили во фризере при –80°C до начала проведения экспериментов.

Экстракция липидов. Общие липиды из тонопласта экстрагировали модифицированным методом Фолча [15]. Для экстракции липидов

из вакуолярных мембран использовали систему хлороформ – метанол (2:1 по объему). К выделенному тонопласту добавляли 5 мл экстрагирующей смеси и ионол в качестве антиоксиданта (из расчета 1.25 мг на 100 мл указанной смеси растворителей). Полученную суспензию гомогенизировали в течение 30 мин. Всего повторяли процедуру три раза. В делительную воронку с объединенным раствором добавляли воду и оставляли до расслаивания водной и органической фаз. Отбирали нижнюю фракцию, содержащую сумму липидных компонентов. Хлороформ из липидного экстракта удаляли под вакуумом с помощью роторного испарителя RV 8 V-C (“IKA”, Германия) или в токе аргона, а затем взвешивали на аналитических весах GH202 (“AND”, Япония) с точностью до 0.000001 г (гравиметрический метод).

Обнаружение и выделение компонентов стеринных фракций. Компоненты стеринных фракций (свободные стерины и эфиры стеринных) определяли с помощью одномерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-В (“ИМИД”, Россия). Для этого полученные липиды растворяли в хлороформе и наносили на пластинку. Пластины помещали в хроматографическую камеру с элюентом гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (80:20:1 об/об/об) [16]. Для обнаружения стеринных компонентов край пластины (0.5 см) обрабатывали 10% раствором серной кислоты в этаноле, а затем нагревали до 110°C. Стерины и их эфиры проявлялись на пластинке розово-голубыми пятнами, затем для них рассчитывали значения R_f [17]. Далее с необработанной пластины шпателем снимали сорбент (зоны стеринных и их эфиров), переносили в центрифужные пробирки (10 мл) и приливали по 1 мл хлороформа. После этого образцы интенсивно перемешивали на шейкере Works Minishaker Vortex Mixer MS1 S1 (“IKA”, Германия) и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин на центрифуге ЦЛК-1 (СССР). Экстракт переносили в стеклянные вials и удаляли хлороформ под током азота, чтобы избежать окисления. Для полноты выделения стеринных и их эфиров, к сорбенту, оставшемуся в пробирке, добавляли 1 мл этилацетата и повторяли экстракцию дважды. Для получения летучих производных, стеринных и эфиров стеринных, их подвергали силилированию [18]. К полученным стеринным фракциям тонопласта добавляли 150 мкл N,Обис(триметилсилил)ацетамида, 50 мкл гексаметилдисилазана (“Sigma-Aldrich”, США), 300 мкл этилацетата и 200 мкг эргостерина (“Sigma”, США) в качестве внутреннего стандарта, поскольку он не встречается в растениях. Смесь нагревали в течение 30 мин при 70°C в сушильном шкафу ШС-40-02 СПУ (“Смоленское СКТБ СПУ”, Россия).

Идентификация и количественный анализ компонентов стериновых фракций. Полученные триметилсилильные производные стеринов анализировали методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS Agilent Technologies (“Agilent”, США). Колонка HP-5MS, 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм со стационарной фазой метилполисилаксан. Температурная программа хроматографирования: при 70°C (1 мин), изотерма; далее программируемый нагрев до 280°C со скоростью 5°C/мин; при 280°C (5 мин), изотерма; далее программируемый нагрев до 300°C со скоростью 20°C/мин; при 300°C (3 мин), изотерма. Инжектор с делением потока 1:5. Температура инжектора 250°C, температура детектора 150°C, температура интерфейса 280°C. Газ-носитель – гелий, скорость потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы 1 мкл. Хроматограмма образцов – по полному ионному току (SCAN). Условия масс-спектрометрического детектирования: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров положительных ионов в диапазоне (m/z) от 50 до 600 а.е.м. со скоростью 1.9 скан/сек.

Идентификацию компонентов свободных стеринов и их эфиров осуществляли при помощи стандартов, сравнением времени удерживания, и по библиотеке масс-спектров NIST08, Wiley7, с учетом фрагментных диагностических пиков, а также в соответствии со значениями хроматографического времени удерживания (Retention Time, RT) стандартных образцов. В качестве стандартных образцов использовали холестерин, стигмастерин, кампестерин (“Sigma”, США) и β -ситостерин (European pharmacopoeia reference standard, Франция). Относительное содержание (%) компонентов смеси (количественный анализ) вычислено из соотношения площадей хроматографических пиков (методом простого нормирования).

Статистический анализ данных. Для статистической обработки данных использовали программные пакеты Microsoft Excel и SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили в 3–5 независимых повторностях. Полученные данные представляли в виде медианы (Me), а разброс значений – в виде интерквартильной широты [25%; 75% процентиль]. С помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk) проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479-2002). Распределение отличалось от нормального, в связи с чем для доказательства наличия значимых различий между медианами использовали Н-критерий Краскела–Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента–Ньюмена–Кеулса. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P < 0.05$ [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ стериновых фракций (СС и ЭФ) показал, что в исследуемом тонопласте в контроле и в условиях стресса (100 и 500 мкМ Cu^{2+}) присутствуют группы соединений относящихся к изопреноидам с циклопентанопергидрофенантеном в качестве остова. Известно, что по химической структуре стерина относятся к данной группе соединений [10]. В СС и ЭС были обнаружены соединения без двойной связи в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена и соединения с различными двойными связями в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена, а также группа стеринов с двойными связями в положении $\Delta 5$. В СС выявлена группа $\Delta 7$ -стеринов (6%), которая отсутствует в ЭС (табл. 1). В СС во всех исследуемых вариантах равный вклад в общее количество вносят соединения без двойной связи (33–35%) и группа $\Delta 5$ -стеринов (31–33%). Отмечено, что в ЭС как в контроле, так и при стрессе преобладают соединения без двойной связи (39–43%) и соединения с различными двойными связями (36–38%). Интересно, что содержание $\Delta 5$ -стеринов в ЭС всех вариантов ниже, чем в СС. Наблюдается снижение содержания соединений без двойной связи при 100 мкМ Cu^{2+} в СС и ЭС и увеличение при 500 мкМ Cu^{2+} . В таблице 2 представлены компоненты, обнаруженные во фракции свободных стеринов. Среди соединений без двойной связи достоверные изменения по сравнению с контролем были отмечены в содержании 7,8-эпоксила-ностан-11-ол. При 100 мкМ Cu^{2+} происходило увеличение с 5.8% до 7.1% в контроле, в то время как при 500 мкМ Cu^{2+} количество снижалось до 6.9%. Также отмечено увеличение при 100 и 500 мкМ Cu^{2+} метил ((24-оксо-3,7,12-трис[(триметилсилил)окси]холан-24-ил)амино)ацетата (табл. 2). Группа $\Delta 5$ -стеринов, которая составляет треть от всей суммы СС представлена холестерином, кампестерином, стигмастеином, β -ситостерином. Следует отметить, что β -ситостерин вносит весомый вклад в суммарное содержание СС, его количество составляло более 20% (% от суммы свободных стеринов). При 500 мкМ Cu^{2+} содержание β -ситостерина статистически значимо снижалось с 22.7% до 21.1% в контроле. Содержание кампестерина было достоверно выше при 100 мкМ Cu^{2+} по сравнению с контролем (табл. 2).

Компонентный состав фракции ЭС стеринов отличается от состава фракции СС (табл. 3). Так, в группе соединений без двойной связи идентифицированы прегнан-3,17,20,21-тетрол, (3 β ,5 α ,20R)-; холестано[7,8-а]циклобутан, 3-метокси-6-оксо-2'-метил-ен-. Не обнаружены такие соединения, как ланостан-3 β -ол, 11 β , 18-эпокси, ацетат; метил ((24-оксо-3,7,12-трис[(триметилсилил)окси]холан-24-ил)амино)ацетат, которые были выявлены в составе СС (табл. 2). В группе соединений с различными

Таблица 1. Содержание компонентов фракции свободных стероидов и фракции эфиров стероидов в тонопласте в условиях стресса, вызванного ионами меди

Сумма соединений	Контроль		100 мкМ Cu ²⁺		500 мкМ Cu ²⁺	
	% от ΣСС	% от ΣЭС	% от ΣСС	% от ΣЭС	% от ΣСС	% от ΣЭС
Без двойной связи	35.3[34.6; 35.5] ^{а,б,д}	43.2 [42.7; 43.4] ^{в,г,д}	33.2 [32.9; 34.2] ^{а,е}	39.9 [39.7; 40.6] ^{в,е}	36.7 [36.4; 36.8] ^{б,ж}	41.6 [41.2; 41.9] ^{г,ж}
С различными двойными связями	26.6 [25.2; 27.7] ^д	36.3 [35.9; 36.7] ^{в,д}	27.8 [26.2; 29.6] ^е	38.9 [38.3; 39.3] ^{в,е}	25.4 [25.3; 26.4] ^ж	36.9 [36.6; 37.7] ^ж
Δ5-стерины	33.5 [32.2; 34.1] ^д	20.5 [19.9; 21.4] ^д	32.5 [31.4; 33.5] ^е	21.1 [20.7; 21.3] ^е	31.3 [30.8; 31.8] ^ж	21.4 [20.7; 21.8] ^ж
Δ7-стерины	6 [5.9; 6.1]		5.9 [5.8; 6.2]		5.7 [5.6; 6.4]	

Примечание: СС – свободные стерины, ЭС – эфиры стероидов. *n* = 3–5. Отличия значимы (*P* < 0.05): а – между контролем и воздействием 100 мкМ Cu²⁺ во фракции СС; б – между контролем и воздействием 500 мкМ Cu²⁺ во фракции СС; в – между контролем и воздействием 100 мкМ Cu²⁺ во фракции ЭС; г – между контролем и воздействием 500 мкМ Cu²⁺ во фракции ЭС; д – между СС и ЭС в контроле; е – между СС и ЭС при 100 мкМ Cu²⁺; ж – между СС и ЭС при 500 мкМ Cu²⁺. Для доказательства наличия значимых различий между медианами Ме [25%; 75%], использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента – Ньюмена – Кеулса.

Таблица 2. Содержание компонентов фракции свободных стероидов в тонопласте в условиях стресса, вызванного ионами меди, (%)

	Соединения		Контроль	100 мкМ Cu ²⁺	500 мкМ Cu ²⁺
	Без двойных связей в структуре колец циклопентаноперигидрофенантрена	Этилизо-аллохолат Ланостан-3β-ол, 11β, 18-эпокси, ацетат 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- 17-(1,5-Диметилгексил)-10,13-диметил-3- стирилгексадекагидроциклопента[а]фенантрин-2-он Метил ((24-оксо-3,7,12-трис[(триметилсилил)окси]холан- 24-ил)амино)ацетат Ланоста-7,9(11)-диен-18-овая кислота, 3,20,25-тригидрокси-, γ-лактон Ланоста-7,9(11)-диен-3β,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)- Эргоста-7-ен-3-β-ол Холестерин Кампестерин Стигмастерин β-ситостерин			
Без двойных связей в структуре колец циклопентаноперигидрофенантрена			1.9 [1.8; 1.9] 17.1 [16.6; 17.2] 5.8 [5.5; 5.9] ^{а,б} 9.2 [9.2; 9.5] 1.3 [1.1; 1.6] ^б	1.9 [1.9; 1.9] ^в 13.3[12.0; 14.7] ^в 7.1 [6.7; 7.3] ^а 8.8 [8.3; 9.4] 2.9 [2.3; 3,0]	1.7 [1.5; 1.7] ^в 16.9 [16.9; 17.4] ^в 6.9 [6.8; 7.3] ^б 8.1 [7.8; 8.9] 2.0 [1.9; 2.3] ^б
Различные двойные связи в структуре колец циклопентаноперигидрофенантрена			6.7 [6.7; 7.9] 19.9 [17.3; 20.5]	10.3[9.4; 10.6] 17.5 [16.8; 18.9]	9.9 [9.4; 10.1] 16.6 [15.8; 17.1]
Δ7-стерины			6 [5.9; 6.1]	5.9 [5.8; 6.2]	5.7 [5.6; 6.4]
Δ5-стерины			1.8 [1.7; 2.4] 2.7 [2.6; 2.8] ^а 5.9 [4.8; 6.2] 22.7 [22.3; 23.5] ^б	2.3 [2.1; 2.7] 3.0 [3.0; 3.6] ^{а,в} 6.2 [6.1; 6.5] 21.4 [19.2; 21.8]	2.4 [2.1; 2.7] 2.7 [2.5; 2.8] ^в 5.0 [4.5; 5.7] 21.1 [21.0; 21.2] ^б

Примечание: *n* = 3–5. Отличия значимы (*P* < 0.05): а – между контролем и воздействием 100 мкМ Cu²⁺; б – между контролем и воздействием 500 мкМ Cu²⁺; в – между вариантами воздействием 100 мкМ Cu²⁺ на ткани и воздействием 500 мкМ Cu²⁺. Для доказательства наличия значимых различий между медианами Ме [25%; 75%], использовали Н-критерий Краскела – Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента – Ньюмена – Кеулса.

Таблица 3. Содержание компонентов фракции эфиров стерина в липидах тонопласта в условиях стресса, вызванного ионами меди, (%)

Соединения	Контроль	100 мкМ Cu ²⁺	500 мкМ Cu ²⁺
Без двойных связей в структуре колец цикlopentanопергидрофенантрена			
Этилизо-аллохолат	7.0 [6.8; 7.6] ^а	6.3 [5.5; 6.3] ^{а, в}	7.4 [7.1; 7.5] ^в
7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси-	14.0 [13.6; 14.4] ^б	13.9 [13.6; 13.9] ^в	12.9 [12.1; 13.0] ^{б, в}
17-(1,5-Диметилгексил)-10,13-диметил-3-стирилгексадекагидроциклопента[а]фенантрен-2-он	4.9 [4.7; 5.1]	5.1 [4.7; 5.7]	5.0 [4.7; 5.3]
Прегнан-3,17,20,21-тетрол, (3β,5α,20R)-	2.4 [2.0; 2.6]	2.9 [2.3; 3.0]	1.9 [1.8; 2.3]
Холестано[7,8-а]циклобутан, 3-метокси-6-оксо-2'-метилен-	13.9 [13.8; 15.2]	12.0 [11.9; 13.6]	14.7 [14.1; 15.6]
Различные двойные связи в структуре колец цикlopentanопергидрофенантрена			
Пропановая кислота, 2-(3-ацетокси-4,4,14-триметиландрост-8-ен-17-ил)-	21.2 [20.5; 21.9]	23.1 [22.5; 23.3]	22.9 [22.6; 24.2]
Ланоста-7,9(11)-диен-3β,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)-	14.4 [14.4; 15.5]	15.4 [15.0; 16.5]	13.4 [13.1; 14.0]
Δ5-стерины			
Холестерин	3.5 [3.3; 3.7]	3.0 [2.8; 3.1]	3.4 [3.2; 3.5]
Кампестерин	3.3 [2.9; 3.7]	3.8 [3.6; 3.9]	3.2 [3.2; 3.5]
Стигмастерин	5.1 [4.9; 6.6]	6.9 [6.1; 7.0]	7.0 [7.0; 7.1]
β-ситостерин	8.3 [7.7; 8.4]	7.6 [7.5; 8.2]	6.9 [6.6; 8.0]

Примечание: $n = 3-5$. Отличия значимы ($P < 0.05$): а – между контролем и воздействием 100 мкМ Cu²⁺; б – между контролем и воздействием 500 мкМ Cu²⁺; в – между вариантами воздействием 100 мкМ Cu²⁺ на ткани и воздействием 500 мкМ Cu²⁺. Для доказательства наличия значимых различий между медианами Ме [25%; 75%], использовали Н-критерий Краскелла – Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента – Ньюмена – Кеулса.

двойными связями в ЭС присутствует пропановая кислота, 2-(3-ацетокси-4,4,14-триметиландрост-8-ен-17-ил)-, которая вносит наибольший вклад (21–23%) в суммарное содержание ЭС. В то время как в составе СС присутствует ланоста-7,9(11)-диен-18-овая кислота, 3,20,25-тригидрокси-, γ-лактон. Общее соединение в ЭС и СС ланоста-7,9(11)-диен-3β,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)-. Следует отметить, что содержание соединения этилизо-аллохолат было достоверно ниже при 100 мкМ Cu²⁺ (6.3 %) по сравнению с контролем (7%). Кроме этого, значимо снижались содержание соединения 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- с 14% в контроле до 12.9% при 500 мкМ Cu²⁺.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что фитостерины участвуют в защитных реакциях на такие стрессы как действие ТМ, засуха, УФ-излучение и температурные воздействия. Изменения в составе стерина влияют на функционирование мембран, метаболизм клетки и организм в целом. В связи с этим, значительная роль в процессах адаптации

принадлежит биосинтезу структурных липидов и изменению текучести мембран, которые, в свою очередь, связаны с содержанием стерина [10, 20]. Недавно была показана роль стерина тонопласта в ответ на окислительный стресс. Авторы работы отметили, что при окислительном стрессе происходило существенное увеличение содержания не только суммы стерина тонопласта, но и всех отдельных классов стерина [9]. Известно, что окислительный стресс возникает в результате действия практически всех неблагоприятных факторов внешней среды, включая засуху, почвенное засоление, загрязнение воздуха токсическими соединениями, такими как озон, оксиды серы, тяжелые металлы, неблагоприятные температуры и т.д. [10]. Ранее нами было доказано, что используемые в данном исследовании концентрации ионов меди (100 и 500 мкМ) вызывают развитие окислительного стресса. В этой работе также было показано, что происходило увеличение абсолютного суммарного содержания Δ5-стерина при 100 мкМ Cu²⁺. Одновременно при 100 мкМ Cu²⁺ происходило увеличение отношения стигмастерина к β-ситостерину [13]. Согласно

литературным данным, соотношение стигмастерина к β -ситостерину в мембране может влиять на ответ растительных клеток на стрессовое воздействие [10]. В настоящем исследовании обнаружено, что $\Delta 5$ -стерины занимают не более 30% от общей суммы выявленных стериновых компонентов в СС и не более 20% в ЭС (табл. 1). Известно, что в растениях стерины присутствуют не только в виде свободных стеринов, но и в конъюгированной форме: стерилгликозиды, ацилстерилгликозиды и эфиры стеринов. В ЭС гидроксильная группа в положении C_3 этерифицирована жирной кислотой. Содержание ЭС меняется в ответ на факторы окружающей среды. Считается, что эфиры стеринов, выполняют важную роль в поддержании физиологического пула и гомеостаза свободных форм стеринов в мембранах. Кроме этого, в некоторых тканях растений ЭС представляют собой хранилище стеринов необходимых для роста и развития растений [20–22]. Жирные кислоты, обнаруженные в ЭС, охватывают широкий диапазон длины цепи (от C_{12} до C_{22}). Стериновая часть в ЭС обычно соответствует тем же стеринам, которые присутствуют во фракции СС, но в некоторых тканях они могут содержать и другие стерины, а также промежуточные продукты биосинтеза стеринов [20]. Качественный состав группы $\Delta 5$ -стерины в СС и ЭС представлен холестерином, кампестерином, стигмастерином, β -ситостерином. Кампестерин и стигмастерин находились примерно на одном уровне, как в СС, так и в ЭС. В условиях стресса (100 и 500 мкМ Cu^{2+}) содержание эфиров стигмастерина в тонопласте увеличивалось (табл. 3). Известно, что стигмастерин участвует в стрессовых ответах растений [23]. Следует отметить, что в тонопласте при действии токсических концентраций ионов меди среди $\Delta 5$ -стеринов доминирующим был β -ситостерин. Согласно литературным данным, β -ситостерин участвует в синтезе стигмастерина, обладает высокой антиоксидантной активностью, является компонентом рафтовых структур, которые задействованы в сигналинге [10, 23]. Известно, что $\Delta 7$ -стерины являются предшественниками $\Delta 5$ -стеринов [24, 25]. В настоящее время показано, что $\Delta 7$ -стерины составляют более 10% от общего числа СС у растений, у отдельных видов растений $\Delta 7$ -стерины были основными молекулярными типами стеринов и составляли 50–90% от общего числа компонентов стеринов [24]. В вакуолярной мембране при действии ионов меди (100 и 500 мкМ) $\Delta 7$ -стерины были обнаружены только в СС (табл. 1). Отмечено, что количество $\Delta 7$ -стеринов было небольшим и не менялось в условиях стресса.

Тритерпеновые и стероидные гликозиды наряду со стероидными гликоалкалоидами образуют многочисленную и структурно разнообразную группу вторичных метаболитов растений, назы-

ваемых сапонинами. Сапонины в зависимости от вида сапогенина делят на две группы: тритерпеновые и стероидные гликозиды, которые отличаются друг от друга по свойствам. Тритерпеновые сапонины содержат 30 атомов углерода и в зависимости от числа карбоциклов подразделяются на тетрациклические и пентациклические. Тетрациклические тритерпеновые сапонины условно делят на группы: производные даммарана, циклоартана, кукурбитана, ланостана и др. [26, 27]. Ланоста-7,9(11)-диен-3 β ,18,20-триол, 3,18-диацетат, (20R)- ($C_{34}H_{54}O_5$) был обнаружен в СС и ЭС, и его содержание в ответ на стресс снижалось в обеих стериновых фракциях. Тритерпен ланостан-3 β -ол, 11 β , 18-эпокси, ацетат является доминирующим представителем группы соединений без двойных связей в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена во фракции СС, содержание которого снижается при стрессе. Отмечено, что во фракции ЭС он отсутствует. Однако в СС в группе соединений с различными двойными связями в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена присутствует также соединение ланоста-7,9(11)-диен-18-овая кислота, 3,20,25-тригидрокси-, γ -лактон в небольшом количестве, которое повышалось в тонопласте при воздействии ионов меди. Происходило повышение содержания соединения 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- во фракции СС при стрессе, в то время как в ЭС содержание этого соединения снижалось. Интересно, что 7,8-эпоксиланостан-11-ол, 3-ацетокси- вносит большой вклад в содержание соединений без двойных связей в структуре колец циклопентанопергидрофенантрена в ЭС (табл. 3). Известно, что производные тритерпенов — сапонины влияют на проницаемость липидного бислоя. Их взаимодействие с молекулами холестерина приводит к образованию нерастворимых комплексов, образующих особые мембранные поры, что в свою очередь приводит к увеличению проницаемости бислоя [28].

В другой работе показано, что тритерпены женьшеня в модельных мембранах связываются с обоими монослоями. Отмечено, что их количество больше в неупорядоченной фазе бислоя, чем в упорядоченной фазе [29]. В ЭС одним из доминирующих соединений являлась пропановая кислота, 2-(3-ацетокси-4,4,14-триметиландрост-8-ен-17-ил). Данное соединение относится к летучим органическим соединениям и является активным вторичным метаболитом [30]. Кроме пропановой кислоты, в ЭС обнаружен этилизо-аллохолат, причем его содержание было больше, чем в СС. При этом в условиях 100 мкМ Cu^{2+} оно снижалось, а при 500 мкМ Cu^{2+} увеличивалось (табл. 3). Во фракции СС наблюдалась обратная ситуация. Возможно, в данном случае СЭ этилизо-аллохолата являются путем для этилизо-аллохолата в СС. Известно, что этилизо-аллохолат — стероидное производное,

которое обладает антиоксидантными, противоопухолевыми, антибактериальными и противомикробными свойствами [31]. Интересно также, что содержание соединения 17-(1,5-диметилгексил)-10,13-диметил-3-стирилгексадекагидроциклопента[а]фенантрен-2-он в СС в условиях стресса снижалось, а в ЭС повышалось. По литературным данным информации об этом соединении практически нет. Следует отметить, что в ЭС обнаружено соединение холестано[7,8-а]циклобутан, 3-метокси-6-оксо-2'-метиле-, которого нет в СС. По литературным данным, циклобутаны все чаще применяются в медицинской химии. Циклобутаны использовались для улучшения множества факторов, таких как предотвращение *цис/транс*-изомеризации путем замены алкенов и более крупных циклических систем, повышения метаболической стабильности, направления ключевых фармакофорных групп, индукции конформационных ограничений и заполнения гидрофобных карманов [32].

Анализ полученных данных показывает, что содержание Δ^5 -стеринов в вакуолярной мембране занимает не более 33% и в условиях стресса (100 и 500 мкМ Cu^{2+}) их содержание снижается. Однако во многих исследованиях внимание уделяется именно этой группе стерин, так как они в основном играют в мембране структурную роль [10, 25]. Интересно, что в СС преобладали соединения тритерпенового ряда и в общей сумме составляют более 47% причем при 500 мкМ Cu^{2+} их суммарное содержание увеличивалось до 50% (табл. 2). По литературным данным тритерпеновые сапонины влияют на проницаемость мембраны. Ранее нами было показано, что действие 100 и 500 мкМ Cu^{2+} увеличивало выход электролитов, что говорит об увеличении проницаемости мембран [13]. Следует упомянуть, что вторичные метаболиты играют важную роль в физиологии стресса растений. При этом увеличивается их количество. Показано, что Cu^{2+} стимулировал продукцию вторичных метаболитов у *Beta vulgaris* L. [33]. Выше упоминалось, что в ЭС могут присутствовать промежуточные продукты биосинтеза стерин, имеющие биологическую активность. В настоящем исследовании в ЭС обнаружены соединения с высокой биологической активностью, суммарное содержание которых увеличивалось в условиях стресса, особенно при 500 мкМ Cu^{2+} (табл. 3).

Таким образом, в результате исследования выявлено многообразие компонентов в составе стеринных фракций вакуолярной мембраны, которые определяют биофизические характеристики мембраны и обладают биологической активностью. Полученные результаты могут быть связаны со способностью вакуолярной мембраны принимать участие в адаптационных механизмах растительной клетки. Выявленные соединения реа-

гировали на токсическое воздействие ионов Cu^{2+} , что можно рассматривать как один из механизмов защиты растительной клетки от стресса.

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Н.В. Семеновой (СИФИБР СО РАН, г. Иркутск) за помощь в идентификации компонентов стеринных фракций.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-26-00208, <https://rscf.ru/project/23-26-00208/> на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mir A.R., Pichtel J., Hayat S. Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil // *Biometals*. 2021. V. 34. P. 737. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00306-z>
2. Румянцев В.А., Пухальский Я.В., Лоскутов С.И., Митюков А.С., Хомяков Ю.В., Панова Г.Г. Влияние ультрадисперсной гуминовой суспензии сапропеля на рост, фотосинтетическую активность и накопление меди горохом (*Pisum sativum* L.) // Доклады РАН. Науки о земле. 2021. Т. 501. № 1. С. 86. <https://doi.org/10.31857/S268673972111013X>
3. Adrees M., Shafaqat A., Rizwan M., Ibrahim M., Abbas F., Farid M., Zia-ur-Rehman M., Irshad M.K., Bharwana S.A. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review // *Environ Sci. Pollut Res*. 2015. V. 22. P. 8148. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>
4. Купейчева Л.В., Ильинский А.В., Яшин В.М. К вопросу фиторемедиации почв, загрязненных комплексом тяжелых металлов // Мелиорация и водное хозяйство. 2016. № 4. С. 8.
5. Sharma J.K., Kumar N., Singh N.P., Santal A.R. Phytoremediation technologies and their mechanism for removal of heavy metal from contaminated soil: An approach for a sustainable environment // *Front. Plant Sci*. 2023. V. 14. P. 1076876. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1076876>
6. Sharma S.S., Dietz K.J., Mimura T. Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants // *Plant Cell Environ*. 2016. V. 39. P. 1112. <https://doi.org/10.1111/pce.12706>
7. Khoudi H. Significance of vacuolar proton pumps and metal/ H^+ antiporters in plant heavy metal tolerance // *Physiol. Plant*. 2021. V. 173. P. 384. <https://doi.org/10.1111/ppl.13447>

8. Дадали В.А., Тутельян В.А. Фитостерины-биологическая активность и перспективы практического применения // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. № 5. С. 458.
9. Озолина Н.В., Гурина В.В., Капустина И.С., Спиридонова Е.В., Нурминский В.Н. Сравнение изменений в содержании стеринах плазмалеммы и тонопласта при окислительном и осмотических стрессах // Биологические мембраны. 2023. Т. 40. № 2. С. 147. <https://doi.org/10.31857/S0233475523020056>
10. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минабаева Ф.В. Растительные стеринны: многообразие, биосинтез, физиологические функции // Биохимия. 2016. Т. 81. № 8. С. 1050. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
11. Ренкова А.Г., Хабибрахманова В.Р., Валитова Ю.Н., Мухитова Ф.К., Минабаева Ф.В. Действие стрессовых фитогормонов на метаболизм стеринах *Triticum aestivum* L. // Физиология растений. 2021. Т. 68. С. 279. <https://doi.org/10.31857/S0015330321020159>
12. Rogowska A., Szakiel A. Enhancement of phytosterol and triterpenoid production in plant hairy root cultures-simultaneous stimulation or competition? // Plants. 2021. V. 10. P. 2028. <https://doi.org/10.3390/plants10102028>
13. Спиридонова Е.В., Капустина И.С., Гурина В.В., Семёнова Н.В., Озолина Н.В. Изучение влияния ионов меди на состав фитостеринах вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* L. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. № 1. С. 76. <https://doi.org/110.21285/achb.902 EDN: MAEZIW>
14. Саяев 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.
15. 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. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
16. Malins D.C., Mangold H.K. Analysis of complex lipid mixtures by thin layer chromatography and complementary methods // J. Americ. Oil Chem. Soc. 1960. V. 37. P. 576.
17. Кеймс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. Москва. Мир, 1975. 324 с.
18. Дударева Л.В., Семенова Н.В., Нохсоров В.В., Рудиковская Е.Г., Петров К.А. Компонентный состав фитостеринах надземной части хвоща пестрого *Equisetum variegatum* Schleich. ex. Web., произрастающего в северо-восточной Якутии // Химия растительного сырья. 2020. Т. 2. С. 133. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020025555>
19. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика, 1999. 459 с.
20. Du Y., Fu X., Chu Y., Wu P., Liu Y., Ma L., Tian H., Zhu B. Biosynthesis and the roles of plant sterols in development and stress responses // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 2332. <https://doi.org/10.3390/ijms23042332>
21. Ferrer A., Altabella T., Arró M., Boronat A. Emerging roles for conjugated sterols in plants // Progress in lipid research. 2017. V. 67. P. 27. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.06.002>
22. Silvestro L.D., Andersen T.G., Schaller H., Jensen P.E. Plant sterol metabolism. D7-sterol-C5-desaturase (STE1/DWARF7), D 5,7-sterol-D7-reductase (DWARF5) and D24-sterol-D24-reductase (DIMINUTO/DWARF1) show multiple subcellular localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. // PLoS One. 2013. V. 8. P. 56429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056429>
23. Валитова Ю.Н., Ренкова А.Г., Минабаева Ф.В. β-ситостерин — природный антиоксидант // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 2. С. 150. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-150-156>
24. Rozentsvet O.A., Kotlova E.R., Bogdanova E.S., Nesterov V.N., Senik S.V., Shavarda A.L. Balance of Δ5- and Δ7-sterols and stanols in halophytes in connection with salinity tolerance // Phytochem. 2022. V. 198. P. 113156. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113156>
25. Семёнова Н.В., Шмаков В.Н., Константинов Ю.М., Дударева Л.В. Сравнительный анализ состава стеринах эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий *Larix sibirica* ledeb // Физиология растений. 2023. Т. 70. P. 181. <https://doi.org/10.31857/S0015330322600516>
26. Фаттахова Г.А., Канарский А.В. Сапонины как биологически активные вещества растительного происхождения // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 3. С. 196.
27. Давидянц Э.С. Тритерпеновые гликозиды как регуляторы роста растений: потенциал и перспективы использования // Химия растительного сырья. 2023. № 1. С. 5. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20230111368>
28. Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins // Phytochem. 2011. V. 72. P. 435. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
29. Garza D.L., Hanashima S., Umegawa Y., Murata M., Kinoshita M., Matsumori N., Greimel P. Behavior of triterpenoid saponin ginsenoside Rh2 in ordered and disordered phases in model membranes consisting of sphingomyelin, phosphatidylcholine, and cholesterol // Langmuir. 2022. V. 38. P. 10478. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c01261>
30. Saranya R., Aarathi R., Sankaran K. Simple and specific colorimetric detection of *Staphylococcus* using its volatile 2-[3-acetoxy-4,4,14-trimethylandroster-8-en-17-yl] propanoic acid in the liquid phase and head space of cultures // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 4423. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6573-6>
31. Thakur R.S., Ahirwar B. A steroidal derivative from *Trigonella foenum graecum* L. that induces apoptosis in vitro and in vivo // J. Food Drug. Anal. 2019. V. 27. P. 231. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.05.001>
32. van der Kolk M.R., Janssen M.A.C.H., Rutjes F.P.J.T., Blanco-Ania D. Cyclobutanes in small-molecule drug candidates // Chem. Med. Chem. 2022. V. 17. e202200020. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200020>
33. Ramakrishna A., Ravishankar G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // Plant Signal. Behav. 2011. V. 6. P. 1720. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>