

Научная статья
УДК 577.352.3
EDN: MAEZIW
DOI: 10.21285/achb.902



Изучение влияния ионов меди на состав фитостеринов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* L.

Е.В. Спиридонова, И.С. Капустина✉, В.В. Гурина,
Н.В. Семёнова, Н.В. Озолина

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Целью исследования являлось изучение влияния различных концентраций ионов меди на состав фитостеринов вакуолярной мембраны (тонопласта) корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Для характеристики стресса, вызванного действием ионов меди, проводилось кондуктометрическое изучение проницаемости клеточных мембран и определение уровня перекисного окисления липидов. В результате установлено, что в присутствии меди происходит увеличение этих показателей в тканях корнеплодов столовой свеклы. Среди фитостеринов тонопласта были изучены β -ситостерин, стигмастерин, кампестерин и холестерин. В составе клеточных мембран они выполняют структурную функцию, вносят вклад в образование липидных микродоменов, оказывают влияние на рост и развитие растений, а также участвуют в ответных реакциях растений на стресс. Изучение влияния ионов меди на фитостерины тонопласта показало, что большую часть из них занимает свободная форма. В присутствии 100 мкМ меди было выявлено существенное увеличение содержания кампестерина. Важным показателем состояния растительных мембран являются отношения стигмастерина/ β -ситостерина и 24-метил-/этилстеиринов, которые могут влиять на ответ растений на стресс. Выявленные увеличения в соотношениях стигмастерина/ β -ситостерина и 24-метил-/этилстеиринов, вероятно, выступают в роли одного из механизмов регулирования функционирования тонопласта в условиях стресса, вызванного ионами меди. Таким образом, полученные результаты могут говорить об участии клеточных мембран, в том числе тонопласта, в механизмах адаптации клеток тканей корнеплодов столовой свеклы к стрессу, вызванному ионами меди.

Ключевые слова: *Beta vulgaris* L., медь, стресс, вакуолярная мембрана (тонопласт), стерин

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-26-00208 (<https://rscf.ru/project/23-26-00208/>) на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск, Российская Федерация).

Для цитирования: Спиридонова Е.В., Капустина И.С., Гурина, В.В. Семёнова Н.В., Озолина Н.В. Изучение влияния ионов меди на состав фитостеринов вакуолярной мембраны *Beta vulgaris* L. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 1. С. 90–98. DOI: 10.21285/achb.902. EDN: MAEZIW.

PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of copper ions on the composition of phytosterols of the vacuolar membrane of *Beta vulgaris* L.

Ekaterina V. Spiridonova, Irina S. Kapustina✉, Veronica V. Gurina,
Natalia V. Semyonova, Natalia V. Ozolina

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The study set out to investigate the effect of different concentrations of copper ions on the composition of phytosterols of the vacuolar membrane (tonoplast) of beetroot (*Beta vulgaris* L.). To characterise the stress caused by the action of copper ions, a conductometric study of the permeability of cell membranes and the level of lipid peroxidation was carried out. The results demonstrate an increase in these indicators in beetroot tissues. Among tonoplast phytosterols, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, and cholesterol were studied. In cell membranes, these phytosterols perform a structural function, contributing to lipid microdomain formation, influencing plant

growth and development, and participating in plant responses to stress. The study of the effect of copper ions on tonoplast phytosterols showed most of them to be occupied by the free form. In the presence of 100 μM copper, a significant increase in campesterol content was detected. The ratio of stigmasterol/ β -sitosterol and 24-methyl-/ethylsterol, which may influence the stress response of plants, is an important indicator of plant membrane health. The observed increases in the ratios of stigmasterol/ β -sitosterol and 24-methyl-/ethylsterols can be explained in terms of mechanisms for regulating the functioning of the tonoplast under stress caused by copper ions. Thus, the obtained results may indicate the participation of cell membranes, including tonoplast, in the mechanisms of adaptation of beetroot tissue cells to stress caused by copper ions.

Keywords: *Beta vulgaris* L., copper, stress, vacuolar membrane (tonoplast), sterols

Funding. The study was funded by the grant of the Russian Science Foundation no. 23-26-00208, <https://rscf.ru/project/23-26-00208/>. The equipment of the Bioanalytica Center for Collective Use of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Irkutsk) was used.

For citation: Spiridonova E.V., Kapustina I.S., Gurina N.V., Semyonova N.V., Ozolina N.V. Effect of copper ions on the composition of phytosterols of the vacuolar membrane of *Beta vulgaris* L. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(1):90-98. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.902. EDN: MAEZIW.

ВВЕДЕНИЕ

В результате протекания ряда природных процессов и постоянной антропогенной нагрузки происходит увеличение содержания тяжелых металлов в почве, воде и в воздухе. Данное обстоятельство отражается как на росте и развитии растений и животных, так и на жизни и здоровье человека [1]. В связи с этим большое внимание во всем мире уделяется изучению последствий, вызванных действием тяжелых металлов. С целью решения проблем загрязнения почвы и воды активно применяется комплекс методов очистки с использованием зеленых растений – фиторемедиация. В числе прочих в данный комплекс входят методы, направленные на улучшение устойчивости растений, которая зависит от функционирования разнообразных молекулярных механизмов на разных уровнях организации.

Наряду с другими абиотическими стрессами, воздействие на растения высоких концентраций тяжелых металлов приводит к окислительному стрессу [2]. В результате этого происходят повреждения на клеточном и молекулярном уровнях. На уровне клетки самой уязвимой структурой, повреждаемой при стрессе, являются мембраны. Перекисное окисление липидов, вызванное действием тяжелых металлов, приводит к нарушению целостности клеточных мембран. В результате этих нарушений происходит выход из клетки различных веществ, а также изменения в составе липидов и белков [1]. Для того чтобы избежать токсического действия тяжелых металлов в растениях, существует ряд механизмов, один из которых связан с удалением тяжелых металлов в вакуоль, что способствует нормальному функционированию физиолого-биохимических процессов. Перенос ионов через вакуолярную мембрану (тонопласт) происходит благодаря определенным белкам, осуществляющим этот процесс за счет трансмембранного потенциала, генерируемого протонными помпами (V-H^+ -АТФазой и V-H^+ -пирофосфатазой) [3]. В настоящее время доказана существенная роль мембранных липидов, в том числе и стероидов, в регуляции активности протонных помп тонопласта [4]. По своей природе стероиды оказывают упорядочивающее действие на структуру мембран, способствуя повышению микровязкости мембраны и возможному уменьшению ее проницаемости [5]. Кроме

структурных функций стероиды обладают регуляторной ролью. В растениях стероиды являются предшественниками растительных гормонов брассиностероидов, влияющих на рост и развитие растений. Помимо этого, стероиды участвуют в формировании липидных микродоменов, выступающих в качестве платформ для сигнальных ферментных комплексов, которые играют важную роль в механизмах передачи сигналов в клетке и в регуляции различных белков [6]. Таким образом, изменения в составе мембранных стероидов могут выступать в роли механизма регуляции активности мембраносвязанных ферментов и ответных реакций растений на стрессовое воздействие.

Медь (Cu^{2+}) является одним из незаменимых микроэлементов. Она играет большую роль в жизнедеятельности человека, животных и растений. В растениях медь выступает в роли кофактора в ряде ферментов и выполняет важные функции в фотосинтезе, дыхании и цепи переноса электронов, а также является структурным компонентом защитных генов [7]. Тем не менее высокие концентрации этого элемента приводят к нарушению протекания нормальных физиологических процессов.

Данное исследование направлено на понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе устойчивости растений к воздействию ионов меди, необходимых для усовершенствования методов фиторемедиации. Целью настоящей работы является анализ изменений в содержании фитостероидов вакуолярной мембраны корнеплодов столовой свеклы, происходящих в ответ на действие ионов меди.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Изучение влияния меди проводилось в модельных экспериментах как на уровне тканей, так и на уровне изолированных вакуолярных мембран. Для определения уровня проницаемости клеточных мембран применяли кондуктометрический метод [8] с небольшими модификациями. Ткань корнеплодов столовой свеклы нарезают на диски одинаковой толщины (1 мм), затем промывали в дистиллированной воде, обсушивали и брали навески по 0,5 г. Сразу после этого приливали раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ как

источник ионов меди, в контрольном варианте использовали дистиллированную воду. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Для создания условий стресса медь применяли в различных концентрациях (1, 10, 100, 200, 300 и 500 мкМ). После инкубации сливали растворы и вновь ополаскивали диски дистиллированной водой, затем приливали в каждый вариант опыта по 80 мл дистиллированной воды. В течение суток происходил выход электролитов, после чего определяли уровень проницаемости клеточных мембран с использованием кондуктометра ОК-104 (Radelkis, Венгрия) с платиновым электродом [9]. Для определения полного выхода электролитов раствор с дисками ткани доводили до кипения и выдерживали в течение 2 мин. После этого давали пробам остыть до комнатной температуры, доводили объем до исходной величины дистиллированной водой и измеряли электропроводность. Уровень выхода электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода. Степень повреждения клеток тканей корнеплодов столовой свеклы после воздействия различных концентраций меди оценивали по величине коэффициента повреждаемости (КП) [8]. Величины КП отражают выход электролитов только в ответ на действие меди. Чем больше значение КП, тем меньше устойчивость растений к стрессовому воздействию.

Определение содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов – проводили по методике, описанной в источнике [10]. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-2000 («ОКБ Спектр», Россия) при 203 нм. Содержание диеновых конъюгатов в растительном материале выражали в нМ/г сухой массы.

Чтобы оценить влияние меди на фитостерины тонопласта, кусочки корнеплодов размером 1 см³ замачивали в растворе CuSO₄·5H₂O на 16 ч при комнатной температуре. Медь применяли в концентрациях 100 и 500 мкМ, поскольку при этих концентрациях наблюдалось выраженное увеличение содержания диеновых конъюгатов и электролитов. В контрольном варианте использовали дистиллированную воду.

Изолирование вакуолей и вакуолярных мембран проводили модифицированным макрообъемным методом, разработанным в лаборатории физиологии растительной клетки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск, Россия) [11].

Для определения стерина проводили экстракцию общих липидов из тонопласта модифицированным методом Фолча [12]. Стерины выделяли и идентифицировали с помощью одномерной тонкослойной хроматографии на пластинках ПТСХ-АФ-В (Sorbfil, Россия) [13]. Стерины и их эфиры проявлялись на пластинке розово-голубыми пятнами, затем для них рассчитывали значения коэффициента подвижности, удерживания R_f. Далее с необработанной пластины шпателем снимали сорбент (зоны стерина и их эфиров), переносили в центрифужные пробирки объемом 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 g на центрифуге ЦАК-1 (СССР). Экстракт переносили в стеклянные вials и удаляли хлороформ под током азота, чтобы избежать окисления. В дальнейшем

к стеринам и их эфирам добавляли 20 мкг эргостерина в качестве внутреннего стандарта, поскольку он не встречается в растениях. Для получения летучих производных, стерина и эфиров стерина их подвергали силилированию [14]. Полученные триметилсилильные производные стерина анализировали методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS (Agilent Technologies, США). Идентификацию свободных стерина и их эфиров осуществляли при помощи стандартов, сравнением времени удерживания и по библиотеке масс-спектров NIST08, Wiley7. В качестве стандартов использовали холестерин, стигмастерин, кампестерин (Sigma-Aldrich, США) и β-ситостерин (European Pharmacopoeia Reference Standard, Франция). Количественное определение стерина проводили методом внешней калибровки с учетом отклика внутреннего стандарта.

Выполненные эксперименты проводили в трех – пяти независимых биологических и трех аналитических повторностях с последующим расчетом средних значений и их стандартной ошибки. Статистическую обработку результатов проводили методом LSD Фишера. Расчеты выполняли с использованием программ SigmaPlot и Microsoft Excel.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Любое стрессовое воздействие оказывает влияние на проницаемость клеточных мембран, которую можно оценить по выходу электролитов в инкубационный раствор [15]. На начальном этапе исследования проводилась работа по изучению стрессового воздействия меди на ткани корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Для этого было изучено влияние различных концентраций ионов меди на проницаемость клеточных мембран вырезанных дисков тканей корнеплодов свеклы (рис. 1).

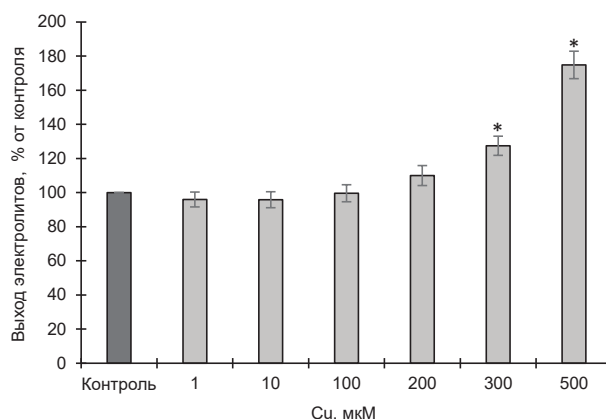


Рис. 1. Влияние различных концентраций ионов меди на выход электролитов из ткани корнеплодов столовой свеклы в инкубационный раствор. Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера. * – различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

Fig. 1. Effect of various concentrations of copper ions on the release of electrolytes from the tissue of table beet roots into the incubation solution. Statistical significance of differences was determined by Fisher's LSD method. * – differences with control are significant at $P < 0.05$

В результате проведенного исследования было отмечено, что применение концентраций до 100 мкМ включительно не оказывало существенного влияния на выход электролитов. Инкубация дисков свеклы при концентрации меди 200 мкМ приводила к повышению выхода электролитов, однако это увеличение по сравнению с контрольным вариантом было незначительным. Существенные различия по уровню электролитов в растворе были установлены для концентрации 300 и 500 мкМ меди, что говорит об увеличении проницаемости клеточных мембран. Похожие изменения в проницаемости клеточных мембран также в присутствии ионов меди были отмечены и на высечках из листьев кукурузы [8], однако они имели некоторые отличия. Это обстоятельство можно объяснить разным уровнем чувствительности изучаемых растительных объектов. При сравнении действия меди на проницаемость клеточных мембран с действием других тяжелых металлов выявляется неоднозначный характер [8, 16], связанный, по-видимому, с различным уровнем токсического действия каждого элемента.

Изучение степени повреждения тканей корнеплодов в присутствии меди оценивали по КП, величина которого отражает выход электролитов, вызванный только действием стрессового фактора на растительные клетки [8]. На рис. 2 представлены КП клеток тканей корнеплодов свеклы в присутствии различных концентраций ионов меди.

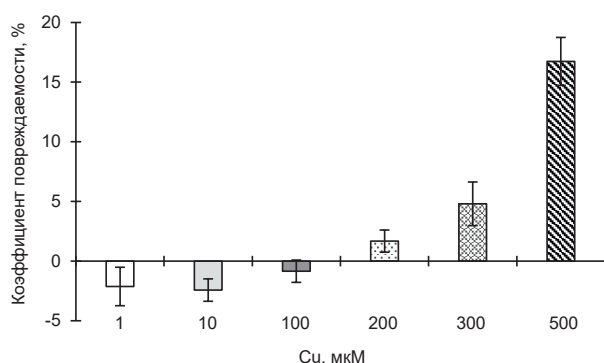


Рис. 2. Коэффициент повреждаемости клеток тканей корнеплодов столовой свеклы после воздействия различных концентраций меди

Fig. 2. Damage coefficient of tissue cells of root crops of table beet after exposure to various concentrations of copper

Оценивая полученные данные, можно увидеть, что значения КП зависят от концентрации применяемого тяжелого металла. Чем выше концентрация меди в инкубационном растворе, тем выше и КП клеток тканей свеклы. Высокое значение КП при 500 мкМ меди говорит о меньшей устойчивости клеток тканей корнеплодов свеклы к изучаемому стрессовому фактору. Таким образом, можно сказать, что медь в концентрации 300 и 500 мкМ оказывает токсическое действие на ткани корнеплодов свеклы, приводя к увеличению степени повреждения клеточных мембран, что оказывает влияние на снижение устойчивости клеток тканей к этому металлу.

К одному из факторов, влияющих на повреждение клеточных мембран, относится перекисное окисление

липидов, которое может приводить к обратимым или необратимым модификациям белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов. Повреждая клеточные мембраны, перекисное окисление липидов оказывает влияние на их структуру и барьерную функцию [17]. Как и при других видах абиотического стресса, в ответ на действие тяжелых металлов в растениях развивается окислительный стресс [1, 18]. Одним из показателей влияния окислительного стресса на клеточные мембраны является образование диеновых конъюгатов, которые представляют собой первичные продукты перекисного окисления липидов. Для определения содержания диеновых конъюгатов после воздействия ионов меди применяли концентрации 100 и 500 мкМ. Изучение образования диеновых конъюгатов в ответ на обработку тканей корнеплодов различными концентрациями меди показало, что в обеих применяемых концентрациях происходило повышение величины этого показателя по сравнению с контролем (рис. 3).

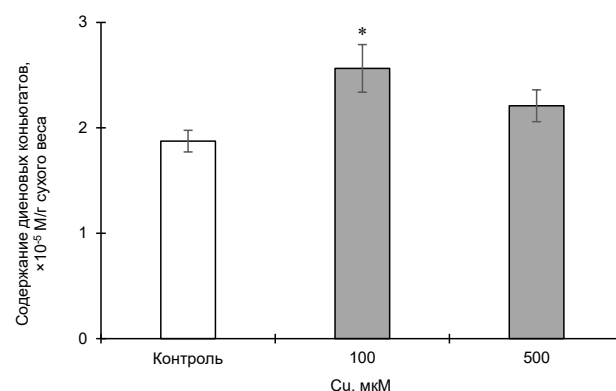


Рис. 3. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях корнеплодов столовой свеклы в норме (контроль) и в присутствии ионов меди. Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера. * – различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

Fig. 3. Content of lipid peroxidation products in the tissues of table beet roots in norm (control) and in the presence of copper ions. Statistical significance of differences was determined by Fisher's LSD method. * – differences with control are significant at $P < 0.05$

Наиболее значимые отличия были отмечены, когда кусочки тканей выдерживали в растворе, содержащем 100 мкМ меди. Увеличение количества диеновых конъюгатов может быть связано с негативным действием ионов меди на липиды мембран за счет их окисления, что приводит к нарушению проницаемости клеточных мембран.

В работе по изучению влияния меди на растения огурца и редиса, как и в наших исследованиях, было показано увеличение продуктов перекисного окисления липидов, только по содержанию малонового диальдегида [19]. Авторами отмечалось повышение величины перекисного окисления липидов в присутствии 100 мкМ ионов меди, и, как в нашем случае, при увеличении концентрации тяжелого металла происходило снижение уровня перекисного окисления липидов. Такая же тенденция была отмечена и в работе с растениями *Elodea densa* Planch., что, по-видимому, может быть связано с токсическим действием высоких концентраций металла,

влияющих на SH-содержащие белки, связывающие медь [20]. Кроме того, увеличение продуктов перекисного окисления липидов в присутствии меди отмечалось и в растениях пшеницы, шпината, галофитов и др. [21–23]. Полученные результаты указывают на негативное действие используемых концентраций меди на липидную составляющую тканей корнеплодов столовой свеклы, которое может приводить к изменению функциональных свойств клеточных мембран, в том числе тонопласта.

На сегодняшний день установлено, что немаловажную роль в ответных реакциях растительных клеток на окислительный стресс играют фитостерины [24]. Нами было изучено влияние различных концентраций ионов меди (100 и 500 мкМ) на стерин тонопласта корнеплодов столовой свеклы. Поскольку инкубация тканей в растворе меди сопровождалась условиями гипосмотического стресса, был использован соответствующий контроль с дистиллированной водой. Среди фитостеринов тонопласта были изучены β -ситостерин, стигмастерин, кампестерин и холестерин. В составе клеточных мембран они выполняют структурную функцию, играют важную роль в образовании липидных микродоменов, оказывают влияние на рост и развитие растений, а также участвуют в ответных реакциях растений на стресс [5].

В настоящем исследовании были проанализированы изменения, происходящие в составе свободных стерин и их эфиров (таблица).

Согласно полученным результатам, большую часть исследованных стерин тонопласта занимает свободная форма как в контроле, так и в условиях стресса, вызванного медью. Анализ содержания фитостеринов показал, что в присутствии 100 мкМ меди происходило существенное увеличение содержания кампестерина в обеих формах. Подобное повышение содержания кампестерина отмечалось и другими исследователями в стрессовых условиях [5, 25]. В растениях кампестерин является предшественником фитогормонов brassinosteroidов, которые оказывают влияние на регулирование роста и развитие растений. Статистически значимых

изменений в содержании остальных фитостеринов не отмечалось.

Важным показателем состояния растительных мембран является отношение стигмастерина к β -ситостерину. Согласно литературным данным, соотношение стигмастерина к β -ситостерину в мембране может влиять на ответ растительных клеток на различные виды стресса [26, 27]. При обработке тканей корнеплодов это соотношение увеличивалось, особенно в ответ на действие 100 мкМ меди. Данное изменение в соотношении связано с увеличением доли стигмастерина, которое могло произойти за счет снижения уровня его предшественника – β -ситостерина. Аналогичное повышение соотношения стигмастерин/ β -ситостерин в тонопласте отмечалось и при других видах стрессового воздействия [9, 28]. Стигмастерин является «стрессовым» стерин [5]. На плазмалемме было показано, что повышение содержания стигмастерина может изменять ее текучесть и проницаемость, ограничивая тем самым выход веществ в апопласт [26]. По-видимому, в ответ на действие 100 мкМ меди на ткани корнеплодов свеклы происходит похожее изменение текучести мембран, которое предотвращает увеличение выхода электролитов (см. рис. 1). Кроме этого, стигмастерин принимает участие в образовании липидных рафтов [6], которые могут участвовать в защитных механизмах растительных клеток. На вакуолярной мембране было обнаружено наличие таких липидных рафтов [29], содержание которых увеличивалось при стрессовом воздействии [30]. Можно предположить, что и в условиях стресса, вызванного медью, происходит подобное увеличение количества липидных рафтов, являющееся одним из защитных механизмов вакуолярной мембраны при стрессе.

В отличие от холестерина кампестерин, β -ситостерин и стигмастерин содержат метильные и этильные группы при 24-м атоме углерода боковой цепи. По этой особенности их делят на 24-метил- и этилстерин. Кампестерин содержит одну метильную группу, а β -ситостерин

Содержание свободных фитостеринов и их эфиров в тонопласте, выделенном из тканей корнеплодов столовой свеклы, после воздействия различных концентраций ионов меди, мкМ/1 мг общих липидов

Content of free phytosterols and their esters in the tonoplast isolated from the tissues of table beet roots after exposure to various concentrations of copper ions, $\mu\text{M}/1 \text{ mg}$ of total lipids

Стерины	Контроль	100 мкМ Cu^{2+}	500 мкМ Cu^{2+}
Свободные стерины			
Холестерин	0,13±0,00	0,20±0,02	0,19±0,03
Кампестерин	0,23±0,02	0,28±0,02*	0,21±0,01
Стигмастерин	0,45±0,08	0,53±0,04	0,42±0,05
β -ситостерин	1,93±0,06	1,70±0,20	1,71±0,05
Эфиры стерин			
Холестерин	0,19±0,02	0,18±0,02	0,17±0,00
Кампестерин	0,18±0,02	0,23±0,01*	0,17±0,00
Стигмастерин	0,32±0,06	0,40±0,05	0,37±0,01
β -ситостерин	0,46±0,03	0,49±0,02	0,39±0,06
Стигмастерин/ β -ситостерин	0,33±0,01	0,43±0,04*	0,37±0,03
24-метил-/этилстерины	0,13±0,01	0,17±0,02*	0,13±0,01
Сумма общих стерин	3,90±0,15	4,02±0,22	3,63±0,15

Примечание. Отношения стигмастерин/ β -ситостерин и 24-метил-/этилстерины рассчитывали по сумме свободных стерин и эфиров стерин. Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера. * – различия с контролем достоверны при $P < 0,05$.

и стигмастерин – одну этильную группу при C24. Как было показано, соотношение количества 24-метил-/этилстеринов является важным показателем, регуляция которого влияет на процессы роста и развития растений, а также на ответы растений на стресс [31].

Анализ изменений в соотношении 24-метил-/этилстеринов тонопласта, выделенного из тканей корнеплодов и обработанного различными концентрациями меди, показал значимые различия при 100 мкМ меди (табл. 1). По сравнению с контролем происходило повышение количества 24-метил-/этилстеринов, главным образом за счет увеличения содержания обеих форм кампестерина. Интересно отметить, что при увеличении концентрации меди (500 мкМ) существенных изменений в содержании 24-метил-/этилстеринов не происходило.

Как уже было показано ранее, соотношение между 24-метил-/этилстеринами специфично для каждого вида растения, органа или ткани и любое изменение в составе или соотношении различных типов стероидов является важным критерием в регуляции клеточных

процессов [5]. Выявленные изменения в соотношении 24-метил-/этилстеринов могут выступать как один из механизмов регулирования функционирования тонопласта в условиях стресса, вызванного ионами меди.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования были выявлены изменения в проницаемости клеточных мембран, перекисном окислении липидов и составе фитостероидов тонопласта при стрессовом воздействии ионов меди на ткани корнеплодов столовой свеклы. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что клеточные мембраны, в том числе тонопласт, принимают участие в структурных и защитных механизмах в тканях корнеплодов в ответ на действие меди. На уровне вакуолярной мембраны в присутствии 100 мкМ меди происходит перераспределение фитостероидов за счет увеличения содержания кампестерина и изменения соотношений стигмастерин/β-ситостерин и 24-метил-/этилстерины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Rahman Z., Singh V.P. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr) (VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview // *Environmental Monitoring and Assessment*. 2019. Vol. 191. P. 419. DOI: 10.1007/s10661-019-7528-7.
2. Feki K., Tounsi S., Mrabet M., Mhadhbi H., Brini F. Recent advances in physiological and molecular mechanisms of heavy metal accumulation in plants // *Environmental Science and Pollution Research*. 2021. Vol. 28. P. 64967–64986. DOI: 10.1007/s11356-021-16805-y.
3. Jiang Y.-T., Tang R.-J., Zhang Y.-J., Xue H.-W., Ferjani A., Luan S., et al. Two tonoplast proton pumps function in Arabidopsis embryo development // *New Phytologist*. 2020. Vol. 225, no. 4. P. 1606–1617. DOI: 10.1111/nph.16231.
4. Лось Д.А. Восприятие стрессовых сигналов биологическими мембранами. В кн.: Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты / под ред. А.Б. Рубина М. – Ижевск: Изд-во НИЦ «Регуляторная и хаотичная динамика», Институт компьютерных исследований, 2007. С. 329–360.
5. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. Растительные стероиды: многообразие, биосинтез, физиологические функции (обзор) // *Биохимия*. 2016. Т. 81. N 8. С. 1050–1068. EDN: WJXJID.
6. Ozolina N.V., Kapustina I.S., Gurina V.V., Bobkova V.A., Nurminsky V.N. Role of plasmalemma microdomains (Rafts) in protection of the plant cell under osmotic stress // *Journal of Membrane Biology*. 2021. Vol. 254. P. 429–439. DOI: 10.1007/s00232-021-00194-x.
7. Mir A.R., Pichtel J., Hayat S. Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil // *BioMetals*. 2021. Vol. 34. P. 737–759. DOI: 10.1007/s10534-021-00306-z.
8. Грищенко Н.Н., Лукаткин А.С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // *Поволжский экологический журнал*. 2005. N 1. С. 3–11. EDN: HSPMUH.
9. Ozolina N.V., Gurina V.V., Nesterkina I.S., Nurminsky V.N. Variations in the content of tonoplast lipids under abiotic stress // *Planta*. 2020. Vol. 251. P. 107. DOI: 10.1007/s00425-020-03399-x.
10. Владимир Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
11. Саяев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // *Физиология растений*. 1981. Т. 28. N 6. С. 1295–1305. EDN: WCTLVJ.
12. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // *Journal of Biological Chemistry*. 1957. Vol. 226, no. 1. P. 497–509. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5.
13. Malins D.C., Mangold H.K. Analysis of complex lipid mixtures by thin-layer chromatography and complementary methods // *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1960. Vol. 37. P. 576–578. DOI: 10.1007/BF02631604.
14. Дударева Л.В., Семенова Н.В., Нохсоров В.В., Рудикова Е.Г., Петров К.А. Компонентный состав фитостероидов надземной части хвоща *Equisetum variegatum* Schleich. ex. Web., произрастающего в северо-восточной Якутии // *Химия растительного сырья*. 2020. Т. 2. С. 133–139. DOI: 10.14258/jcprm.2020025555. EDN: HHWJMX.
15. Зауралов О.А., Лукаткин А.С. Кинетика экзоосмоса электролитов у теплолюбивых растений при действии пониженных температур // *Физиология растений*. 1985. Т. 48. N 3. С. 349–355.
16. Spiridonova E.V., Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N., Donskaya L.I., et al. Effect of cadmium on the roots of beetroot (*Beta vulgaris* L.) // *International Journal of Phytoremediation*. 2019. Vol. 21, no. 10. P. 980–984. DOI: 10.1080/15226514.2019.1583722.
17. Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants // *Annual Review of Plant Biology*. 2007. Vol. 58. P. 459–481. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946.
18. Thounaojam T.C., Panda P., Mazumdar P., Kumar D., Sharma G.D., Sahoo L., et al. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012. Vol. 53. P. 33–39. DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.01.006.

19. Михайлова И.Д., Лукаткин А.С. Перекисное окисление липидов в растениях огурца и редиса при действии тяжелых металлов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16. N 2. С. 206–210. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-206-210. EDN: WJKXVJ.

20. Некрасова Г.Ф., Ушакова О.С., Ермаков А.Е., Уймин М.А., Бызов И.В. Действие ионов меди (II) и наночастиц оксидов меди на *Elodea densa* Planch. // Экология. 2011. N 6. С. 422–428. EDN: ONFZJX.

21. Лукаткин А.С., Грузнова К.А., Башмаков Д.И., Лукаткин А.А. Влияние регулятора роста эпин-экстра на растения пшеницы при действии тяжелых металлов // Агрохимия. 2019. N 2. С. 81–88. DOI: 10.1134/S0002188119020108. EDN: YWYDML.

22. Gong Q., Wang L., Dai T., Zhou J., Kang Q., Chen H., et al. Effects of copper on the growth, antioxidant enzymes and photosynthesis of spinach seedlings // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2019. Vol. 171. P. 771–780. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.016.

23. Nesterov V., Bogdanova E., Makurina O., Rozina S., Rozentsvet O. Effect of NaCl, copper and cadmium ions on halophytes with different types of salt resistance: accumulation, physiological and biochemical reactions // Functional Plant Biology. 2021. Vol. 48, no. 10. P. 1053–1061. DOI: 10.1071/FP21083.

24. Wang T., Hicks K.B., Moreau R. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates // Journal of the American Oil Chemists – Society. 2002. Vol. 79, no. 12. P. 1201–1206. DOI: 10.1007/s11746-002-0628-x.

25. Kumar M.S.S., Ali K., Dahuia A., Tyagi A. Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice // Plant

Physiology and Biochemistry. 2015. Vol. 96. P. 83–89. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.07.014.

26. Wang K., Senthil-Kumar M., Ryu C.-M., Kang L., Mysore K.S. Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast // Plant Physiology. 2012. Vol. 158, no. 4. P. 1789–1802. DOI: 10.1104/pp.111.189217.

27. Senthil-Kumar M., Wang K., Mysore K.S. AtCYP710A1 gene-mediated stigmasterol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Plant Signaling & Behavior. 2013. Vol. 8, no. 2. P. e23142. DOI: 10.4161/psb.23142.

28. Нестеркина И.С., Гурина В.В., Озолина Н.В., Нурминский В.Н. Изменение содержания стеринов тонопласта при осмотическом стрессе // Биологические мембраны. 2019. Т. 36. N 4. С. 301–304. DOI: 10.1134/S0233475519040108. EDN: BEKYKW.

29. Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V. Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., et al. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains // Planta. 2013. Vol. 237. P. 859–871. DOI: 10.1007/s00425-012-1800-1.

30. Ozolina N.V., Kapustina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N. Role of tonoplast microdomains in plant cell protection against osmotic stress // Planta. 2022. Vol. 255. P. 65. DOI: 10.1007/s00425-021-03800-3.

31. Ренкова А.Г., Хабибрахманова В.Р., Валитова Ю.Н., Мухитова Ф.К., Минибаева Ф.К. Действие стрессовых фитогормонов на метаболизм стеринов *Triticum aestivum* L. // Физиология растений. 2021. Т. 68. N 3. С. 279–288. DOI: 10.31857/S0015330321020159. EDN: WECLSO.

REFERENCES

1. Rahman Z., Singh V.P. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr) (VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2019;191:419. DOI: 10.1007/s10661-019-7528-7.

2. Feki K., Tounsi S., Mrabet M., Mhadhbi H., Brini F. Recent advances in physiological and molecular mechanisms of heavy metal accumulation in plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28:64967-64986. DOI: 10.1007/s11356-021-16805-y.

3. Jiang Y.-T., Tang R.-J., Zhang Y.-J., Xue H.-W., Ferjani A., Luan S., et al. Two tonoplast proton pumps function in *Arabidopsis* embryo development. *New Phytologist*. 2020;225(4):1606-1617. DOI: 10.1111/nph.16231.

4. Los' D.A. Perception of stress signals by biological membranes. In: Rubin A.B. (ed.). *Problemy regulatsii v biologicheskikh sistemakh. Biofizicheskie aspekty = Problems of regulation in biological systems. Biophysical aspects*. Moscow – Izhevsk: Scientific Center “Regulatory and chaotic dynamics”, Institute for Computer Research; 2007, p. 329-360. (In Russian).

5. Valitova J.N., Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biokhimiya*. 2016;81(8):1050-1068. (In Russian). EDN: WJXJID.

6. Ozolina N.V., Kapustina I.S., Gurina V.V., Bobkova V.A., Nurminsky V.N. Role of plasmalemma microdomains (Rafts) in protection of the plant cell under osmotic stress. *Journal of Membrane Biology*. 2021;254:429-439. DOI: 10.1007/s00232-021-00194-x.

7. Mir A.R., Pichtel J., Hayat S. Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *BioMetals*. 2021;34:737-759. DOI: 10.1007/s10534-021-00306-z.

8. Grishenkova N.N., Lukatkin A.S. A conductometric technique to estimate the plant tissue stability to abiotic stresses. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal = Povolzhskiy Journal of Ecology*. 2005;1:3-11. (In Russian). EDN: HSPMUH.

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

10. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. *Lipid peroxidation in biological membranes*. Moscow: Nauka; 1972, 252 p. (In Russian).

11. Salyaev R.K., Kuzevanov V.Ya., Khaptagaev S.B., Kopytchuk V.N. Isolation and purification of vacuoles and vacuolar membranes from plant cells. *Fiziologiya rastenii*. 1981;28(6):1295-1305. (In Russian). EDN: WCTLVJ.

12. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957;226(1):497-509. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5.

13. Malins D.C., Mangold H.K. Analysis of complex lipid mixtures by thin-layer chromatography and complementary methods. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1960;37:576-578. DOI: 10.1007/BF02631604.

14. Dudareva L.V., Semenova N.V., Nachsorov V.V., Rudikovskaya E.G., Petrov K.A. The component composition of

the phytosterols of the aerial part of the horsetail variegated *Equisetum variegatum* Schleich. ex. Web. growing in north-east Yakutia. *Khimija rastitel'nogo syr'ja* = *Chemistry of plant raw material*. 2020;2:133-139. (In Russian). DOI: 10.14258/jcprm.2020025555. EDN: HHWJMX.

15. Zauralov O.A., Lukatkin A.S. Kinetics of electrolyte exoosmosis in heat-loving plants exposed to low temperatures. *Fiziologiya rastenii*. 1985;48(3):349-355. (In Russian).

16. Spiridonova E.V., Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N., Donskaya L.I., et al. Effect of cadmium on the roots of beetroot (*Beta vulgaris* L.). *International Journal of Phytoremediation*. 2019;21(10):980-984. DOI: 10.1080/15226514.2019.1583722.

17. Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2007;58:459-481. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946.

18. Thounaojam T.C., Panda P., Mazumdar P., Kumar D., Sharma G.D., Sahoo L., et al. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012;53:33-39. DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.01.006.

19. Michailova I.D., Lukatkin A.S. Lipid peroxidation in cucumber and radish seedlings affected by heavy metals. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya* = *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*. 2016;16(2):206-210. (In Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-206-210. EDN: WJKXVJ.

20. Nekrasova G.F., Ushakova O.S., Ermakov A.E., Uimin M.A., Byzov I.V. Effects of copper (II) ions and copper oxide nanoparticles on *Elodea Densa* Planch. *Ekologiya*. 2011;6:422-428. (In Russian). EDN: ONFZJX.

21. Lukatkin A.S., Gruznova K.A., Bashmakov D.I., Lukatkin A.A. Impact of growth regulator epin-extra on wheat plants affected by heavy metals. *Agrokimiya*. 2019;2:81-88. (In Russian). DOI: 10.1134/S0002188119020108. EDN: WYDML.

22. Gong Q., Wang L., Dai T., Zhou J., Kang Q., Chen H., et al. Effects of copper on the growth, antioxidant enzymes and photosynthesis of spinach seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;171:771-780. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.016.

23. Nesterov V., Bogdanova E., Makurina O., Rozina S., Rozentsvet O. Effect of NaCl, copper and cadmium ions on halophytes with different types of salt resistance: accumulation, physiological and biochemical reactions. *Functional Plant Biology*. 2021;48(10):1053-1061. DOI: 10.1071/FP21083.

24. Wang T., Hicks K.B., Moreau R. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates. *Journal of the American Oil Chemists – Society*. 2002;79(12):1201-1206. DOI: 10.1007/s11746-002-0628-x.

25. Kumar M.S.S., Ali K., Dahuia A., Tyagi A. Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2015;96:83-89. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.07.014.

26. Wang K., Senthil-Kumar M., Ryu C.-M., Kang L., Mysore K.S. Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiology*. 2012;158(4):1789-1802. DOI: 10.1104/pp.111.189217.

27. Senthil-Kumar M., Wang K., Mysore K.S. AtCYP710A1 gene-mediated stigmasterol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*. 2013;8(2):e23142. DOI: 10.4161/psb.23142.

28. Nesterkina I.S., Gurina V.V., Ozolina N.V., Nurminsky V.N. Changes in tonoplast sterol contents under osmotic stress. *Biologicheskie membrany*. 2019;36(4):301-304. (In Russian). DOI: 10.1134/S0233475519040108. EDN: BEKYKW.

29. Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., et al. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains. *Planta*. 2013;237:859-871. DOI: 10.1007/s00425-012-1800-1.

30. Ozolina N.V., Kapustina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N. Role of tonoplast microdomains in plant cell protection against osmotic stress. *Planta*. 2022;255:65. DOI: 10.1007/s00425-021-03800-3.

31. Renkova A.G., Valitova J.N., Mukhitova F.K., Minibayeva F.V., Khabibrakhmanova V.R. Effects of stress phytohormones on sterol metabolism of *Triticum aestivum* L. *Fiziologiya rastenii*. 2021;68(3):279-288. (In Russian). DOI: 10.31857/S0015330321020159. EDN: WECLSO.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Спиридонова Екатерина Владимировна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
yatakol@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7440-5658>

Капустина Ирина Сергеевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ nirinka24@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5159-9816>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina V. Spiridonova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
yatakol@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7440-5658>

Irina S. Kapustina,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ nirinka24@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5159-9816>

Гурина Вероника Валериевна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
nichka.g@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7552-0818>

Семёнова Наталья Викторовна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
tashasemyonova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1076-3944>

Озолина Наталья Владимировна,
д.б.н., заведующий лабораторией,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
ozol@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0436-8166>

Вклад авторов

Е.В. Спиридонова – разработка концепции исследования, постановка задач и цели исследования, проведение экспериментов, обработка и обсуждение полученных результатов, написание текста статьи.
И.С. Капустина, В.В. Гурина – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов.
Н.В. Семёнова – обработка полученных данных.
Н.В. Озолина – разработка концепции исследования, обсуждение результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 19.06.2023.
Одобрена после рецензирования 23.11.2023.
Принята к публикации 29.02.2024.

Veronica V. Gurina,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
nichka.g@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7552-0818>

Natalia V. Semyonova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
tashasemyonova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1076-3944>

Natalia V. Ozolina,
Dr. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
ozol@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0436-8166>

Contribution of the authors

Ekaterina V. Spiridonova – research concept development, statement of the problem and objectives of the study, conducting experiments, processing and discussion of the results obtained, writing the text of the manuscript.
Irina S. Kapustina, Veronica V. Gurina – conducting experiments, processing the data obtained, discussing the results.
Natalia V. Semyonova – processing the data obtained.
Natalia V. Ozolina – research concept development, discussing the results obtained.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 19.06.2023.
Approved after reviewing 23.11.2023.
Accepted for publication 29.02.2024.