



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский национальный исследовательский технологический
университет»
(ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

Кафедра Пищевой биотехнологии
Направление 19.04.01 Биотехнология
Программа Бионанотехнология
Группа 626-М1

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Уровень образования магистр
Вид ВКР исследовательский
Тема «Липидный состав и мембранные характеристики клеток корней пшеницы при действии мембранотропных веществ»
Рецензент _____ (Н.С.Карамова)
Зав. кафедрой _____ (М.А. Сысоева)
Нормоконтролер _____ (В.Р. Хабибрахманова)
Руководитель _____ (В.Р. Хабибрахманова)
Руководитель _____ (Ю.Н. Валитова)
Студент _____ (А.В. Белкина)

2018 г

Кафедра Пищевой биотехнологии

«УТВЕРЖДАЮ»

Направление 19.04.01

Зав.кафедрой Сысоевой М.А.

Программа Бионанотехнология

«___» _____ 20__ г.

Группа 626-М1

З А Д А Н И Е

на выпускную квалификационную работу магистра Белкиной А.В.

Тема: Липидный состав и мембранные характеристики клеток корней пшеницы при действии мембранотропных веществ

Срок представления работы к защите «___» _____ 20__ г.

Цель, задачи и исходные данные работы: Цель – изучение взаимосвязи состава липидов в корнях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. с проницаемостью клеточных мембран и их фазового состояния при действии мембранотропных веществ. Материал, полученный в ходе выполнения научно-исследовательской работы и прохождения практик в процессе обучения по магистерской программе; Публикации в научных журналах, специализированная научная литература.

Задание по разделам работы: В литературном обзоре описать общую характеристику биологических мембран, проанализировать методы исследования физико-химического состояния биологических мембран. В экспериментальной части собрать, систематизировать и обработать весь объем полученных экспериментальных данных. В обсуждении результатов провести анализ полученных результатов, сделать обоснованные выводы.

Содержание графической части (иллюстративного материала): Результаты магистерской диссертации, выносимые на защиту, оформить в виде электронной презентации с использованием программы Microsoft Power Point.

Дата выдачи задания: «___» _____ 20__ г.

Руководитель _____ (В.Р. Хабибрахманова)

Руководитель _____ (Ю.Н. Валитова)

Задание принял к исполнению _____ (А.В. Белкина)

ЛИСТ НОРМОКОНТРОЛЯ

1. Лист является обязательным приложением к пояснительной записке дипломного (курсового) проекта.
2. Нормоконтролер имеет право возвращать документацию без рассмотрения в случаях:
 - нарушения установленной комплектности;
 - отсутствия обязательных подписей;
 - нечеткого выполнения текстового и графического материала.
3. Устранение ошибок, указанных нормоконтролером, обязательно.

ПЕРЕЧЕНЬ

замечаний и предложений нормоконтролера по дипломному (курсовому) проекту, студента

гр. 626 – М1 Белкиной А.В.

(группа, инициалы, фамилия)

Лист (страница)	Условное обозначение (код ошибок)	Содержание замечаний и предложений со ссылкой на нормативный документ, стандарт или типовую документацию

Дата « ____ » _____ Нормоконтролер _____ В.Р. Хабибрахманова
(подпись) (фамилия, инициалы)

Реферат

Выпускная квалификационная работа содержит:

страниц 90, таблиц 16, рисунков 21,
литературных источников 57, в том числе зарубежных 39

Ключевые слова: липиды, стерины, фосфолипиды, мембрана, мембранотропные вещества, проницаемость, текучесть, флуоресцентный зонд Лаурдан.

Цель работы – изучение взаимосвязи состава липидов в корнях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. с проницаемостью клеточных мембран и их фазового состояния при действии мембранотропных веществ.

Список сокращений и условных обозначений

- АНС – 1-анилинонафталин-8-сульфонат-анион
- ГлЦер 1– гликоцерамид, содержит в своем составе α -гидроксикислоту
- ГлЦер 2– гликоцерамид, содержит в своем составе не гидроксильные кислоты
- ГП – генерализованная поляризация
- ДАГ (DAG) – диацилглицерид
- ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерид
- ДФГ – дифосфатидилглицерин
- ЖК – жирная кислота
- МГДГ – моногалактозилдиацилглицерид
- Ст – стерин
- сыр.в. – сырой вес
- ТАГ – триацилглицерид
- Т – терпеноид
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- УвС – углеводороды, включая сквален
- ФГ – фосфатидилглицерин
- ФК – фосфатидная кислота
- ФЛ – фосфолипид
- ФИ – фосфотидилинозитол
- ФС – фосфотидилсерин
- ФХ – фосфотидихолин
- ФЭ – фосфотидилэтаноамин
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- ϕ – флуоресценция
- ADP – аденозиндифосфат
- ATP – аденозинтрифосфат
- GDP – гуанозиндифосфат

GTP – гуанозинтрифосфат

IP₃ – инозитрифосфат

PIP₂ – фосфатидинозит – 4,5 – дифосфат

Содержани

ВВЕДЕНИЕ 9

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 12

1.1 Биологическая мембрана: химический состав, функции и структурная организация.....12

1.2 Методы исследования физико-химического состояния биологических мембран.....16

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 29

2.1 Характеристика материалов и реактивов.....29

2.2 Выращивание проростков пшеницы.....29

2.3 Экстрагирование липидов из корней пшеницы.....30

2.4 Определение состава и содержания липидов в экстрактах из корней пшеницы с применением инструментальной тонкослойной хроматографии31

2.5 Определение проницаемости и фазового состояния мембран клеток корней пшеницы.....40

2.6 Общие методы исследования.....40

2.6.1 Инструментальная тонкослойная хроматография.....40

2.6.2 Определение выхода электролитов и индекса мембранной стабильности.....41

2.6.3 Определение величины генерализационной поляризации возбуждения флуоресценции липофильного зонда лаурдана в мембранах микросомальной фракции растительных клеток.....41

2.7 Статистическая обработка результатов.....42

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 43

3.1 Обоснование исследования.....43

3.2 Исследование влияния мембранотропных веществ на проницаемость мембран клеток корней пшеницы.....44

3.3 Исследование липидного профиля в экстрактах из клеток корней пшеницы, выращенных при действии мембранотропных веществ.....46

3.4 Исследование влияния мембранотропных веществ на характеристики мембран клеток корней пшеницы.....	56
ВЫВОДЫ	58
Список использованной литературы	59
Приложение	66

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Различные неблагоприятные факторы окружающей среды воздействуют на растения вызывают в них стресс, что приводит к нарушениям жизнедеятельности растений. Липиды – это один из важных классов биологических соединений, который претерпевает существенные изменения в ответе растения на стрессовые воздействия [1]. Известно, что результатом стрессового воздействия на растение являются изменения метаболических процессов, идущих в клетке: активация ферментной системы, изменение текучести мембран, фотосинтетической способности [2]. Изучение этих изменений имеет важное фундаментальное значение, в первую очередь для культур, имеющих важное сельскохозяйственное значение. К важнейшим сельскохозяйственным культурам относится пшеница. Несмотря на широкую изученность пшеницы как основной продовольственной культуры, данные о ее липидном профиле, в том числе изменении его состава, при воздействии различных стрессоров до сих пор ограничены.

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи состава липидов в корнях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. с проницаемостью клеточных мембран и их фазового состояния при действии мембранотропных веществ.

В соответствии с целью в работе были поставлены следующие задачи:

1) определить проницаемость мембран клеток корней проростков, выращенных на средах с добавлением мембранотропных веществ, для электролитов путем оценки их выхода методом кондуктометрии;

2) исследовать липидный профиль в корнях проростков, выращенных на средах с добавлением мембранотропных веществ, методом инструментальной тонкослойной хроматографии на лабораторном комплексе «САМАГ» (Швейцария);

3) оценить величину генерализованной поляризации возбуждения флуоресценции липофильного зонда лаурдана в мембранах микросомальной

фракции клеток корней проростков пшеницы, выращенных на средах с добавлением мембранотропных веществ.

Научная новизна.

Впервые исследован качественный состав липидных соединений и определено их количество в корнях проростков пшеницы, выращенных при воздействии CaCl_2 (10^{-3} М) и β -ситостерин ($5 \cdot 10^{-4}$ М), уплотняющих мембрану, а также нистатина (10^{-4} М) и детергента тритон Х-100 ($1,6 \cdot 10^{-5}$ М), которые увеличивают ее проницаемость.

Показано, что при выращивании пшеницы на среде с добавлением β -ситостерина происходит существенное изменение состава липидов в клетках корней. Происходит увеличением стеринов и моногалактозилдиацилглицерида (в 3,4 и 2 раза, соответственно) и снижение фосфатидилхолина и гликоцерамидов (1,4 и 2, соответственно) При этом обнаруженные изменения в липидном профиле влияют на мембранные характеристики клеток корней пшеницы – увеличение мембранной стабильности на 4,7 % и уплотнение мембран в 1,3 раза.

Установлено, что при выращивании растений в течение 4 суток на среде с добавлением нистатина в концентрации 10^{-4} М, происходит адаптация растений к данному мембранотропу, которая заключается в восстановлении мембранных характеристик – текучести и проницаемости. Одним из факторов в этом механизме адаптации является снижение (в 3,3 раза) количества в мембранах доли стеринов.

Практическая значимость.

Методические разработки и данные представленные в диссертации Белкиной А. В. имеют научно-прикладную значимость и могут быть использованы в исследовательских и образовательных учреждениях.

По результатам исследования опубликованы 1 статья и 3 тезиса доклада: в материалах: II международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Уфа, 2017), IV российского симпозиума с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная

сигнализация у растений» (Казань, 2016), годичного собрания общества физиологов растений России «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 2017).

Часть результатов работы получена в лаборатории Окислительно – восстановительного метаболизма КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Автор выражает благодарность соавторам за помощь в проведении экспериментов и обсуждении полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 16 – 04 – 00676 А).

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологическая мембрана: химический состав, функции и структурная организация

Мембраны – это барьер, отделяющий цитоплазму всех клеток от окружающей среды. Некоторые внутриклеточные органеллы окружены мембранами — митохондрии, хлоропласты, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы и ядро. Эти барьеры отделяют функциональные единицы органелл от других клеточных компонентов [3].

Проницаемость мембран имеет большое значение для осморегуляции и поддержания ионного гомеостаза клетки, играет важную роль в энергообеспечении клетки, сенсорных механизмах и других процессах жизнедеятельности. Изменение текучести мембран оказывает влияние на активность мембранных ферментных комплексов, регулирует в клетках концентрацию ионов, сахаров, аминокислот и других продуктов обмена веществ. Известно [4], что проницаемость мембран для ионов может изменяться при действии многих факторов, например, антибиотиков.

Мембраны представляют собой сложные структуры толщиной 6-10 нм [3]. Двойной липидный слой составляет основу мембраны, в формировании которого участвуют фосфолипиды и гликолипиды. К фосфолипидам можно отнести – глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды. Глицерофосфолипиды относятся к производным фосфатидной кислоты. Находящийся в составе фосфатидной кислоты остаток фосфорной кислоты может образовывать сложноэфирную связь с различными полярными группировками. Наличие в молекуле глицерофосфолипидов остатков жирных кислот и полярной ионизированной головы придает им свойства амфифилов [5]. К основным фосфолипидам растений относятся фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол

(ФИ), фосфатидилглицерин (ФГ). Структурные формулы этих липидов представлены в приложении 1.

Сфинголипиды – структурно разнообразные молекулы с неполярной церамидной основой. Церамиды содержат жирную кислоту, связанную с амидом через длинноцепочечное основание, которое является уникальным компонентом сфинголипидов. У комплекса сфинголипидов есть полярная группа, которая прикрепляется к гидроксильному остатку С1 церамида. Главными сфинголипидами растений являются гликоцерамиды (ГлЦер), которые имеют в своем составе глюкозосодержащую группу [6].

Стерины важны для всех эукариотов. В отличие от животных и грибных клеток, которые содержат только один главный стерин, растительные клетки обладают сложным стериновым составом. Преобладающими стеринами растений являются β -ситостерин, стигмастерин и кампестерин (приложение 1). β -ситостерин и кампестерин регулируют мембранную текучесть. Стерины растений также могут модулировать деятельность мембранных ферментов. Стигмастерин требуется для быстрого увеличения клеток. Уменьшая пространство между молекулами липидов, холестерин способствует более плотной упаковке жидкостно-организованных областей искусственных мембран [3].

Липидный бислой образован двумя рядами липидов, гидрофобные радикалы которых спрятаны внутрь, а гидрофильные группы обращены наружу и контактируют с водной средой [7] (рисунок 1.1).

Согласно [8] определенные участки бислоя мембраны обогащены сфинголипидами и стеринами, которые организованы в особые липидные домены – рафты. Липидные рафты представляют собой гетерогенные и нестабильные структуры размером от 50 до 200 нм [9, 10] (рисунок 1.2). Они [11, 12] регулируют передачу различных сигналов внутри клетки, включая те, которые инициируют деление клеток, дифференцировку и различные реакции стресса. Физические и химические свойства липидных рафтов определяются качественным составом содержащихся в них стеринов, истощение которых

может привести к разрушению этих доменов и высвобождению их содержимого из мембран [13]. Добавление стерина в модельные мембраны, состоящие из смеси фосфо- и сфинголипидов, приводит к упорядочению их насыщенных ацильных цепей, но сохраняет боковую подвижность липидов [14].

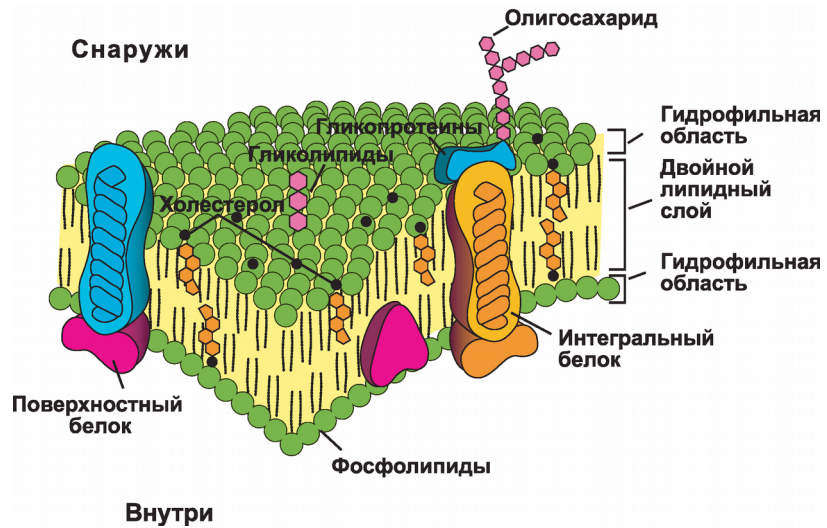


Рисунок 1.1 – Поперечный срез плазматической мембраны [7]

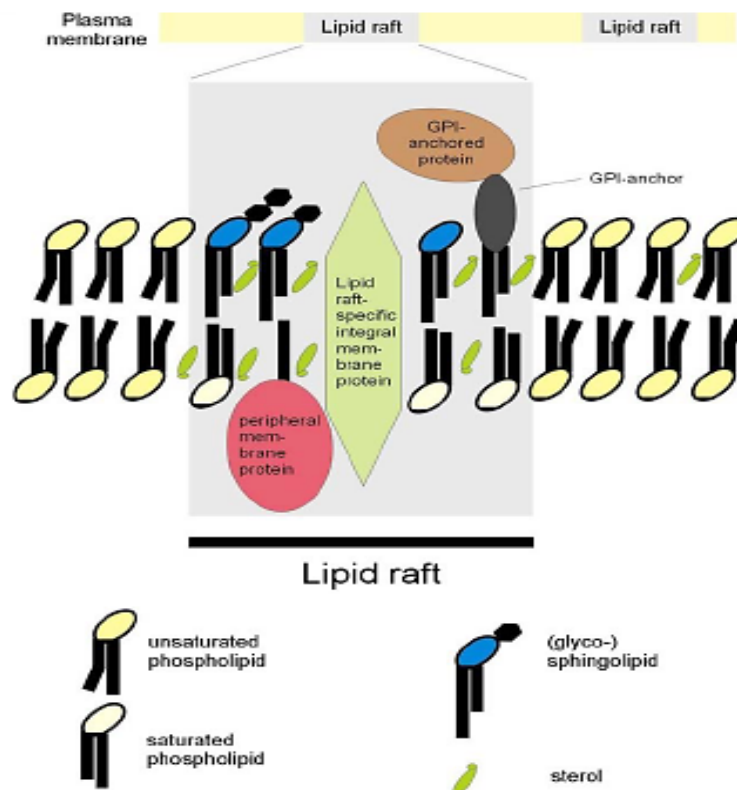


Рисунок 1.2 – Схема организации липидного микродомена (рафта) [9]

На сегодняшний день исследования химического состава и структурой организации мембран различных природных объектов посвящено значительное количество работ [15, 16, 17, 18]. Наиболее актуальным является исследования влияния на состав и свойства мембраны при воздействии различных физических и химических факторов. В качестве тест объектов используются – *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Zea mays*, а также *Triticum aestivum* и ряд других растительных объектов.

Пшеница – является основной сельскохозяйственной культурой, и поэтому изучение изменений состава и структурой организации мембран клеток ее тканей (зеленная масса, корни, зерно) при воздействии различных неблагоприятных факторов имеет важное фундаментальное значение.

В исследованиях, проводимых Валитовой Ю.Н. с коллегами [19, 20, 21], было установлено, что в зависимости от различного стрессового воздействия на пшеницу происходит существенные изменения липидного состава мембран. Например, под действием стерин-связывающего агента нистатина наблюдается значительное снижение содержания стерина в клетках корней пшеницы, что сопровождается двукратным увеличением общего содержания ГлЦер [19; 20]. Кроме того, связывание стерина с нистатином в корнях пшеницы приводит к уменьшению концентрации молекулярных видов ГлЦер, содержащих длинноцепочечные жирные кислоты (ЖК), например, d18:1Δ8/h22:0 [20] , Авторы предположили, что изменение стеринового компонента может влиять на функционирование мембран, изменяя сфинголипидную композицию липидных плотов [21].

В работе [22] показано, что в условиях кратковременного (1 ч) холодного (+4°C) стресса в корнях проростков пшеницы значительно возрастает общее содержание стерина по сравнению с контролем. Увеличение стерина в корнях проростков пшеницы, происходило в основном за счет увеличения содержания β-ситостерина и капместерина.

В таблице 1.1 приведено содержание основных липидов в корнях пшеницы при раневом стрессе [19, 20, 21].

Таблица 1.1 – Содержание основных липидов в корнях пшеницы при раневом стрессе [19, 20, 21]

Объект исследования	Содержание липидов, мкг/г					
	ФХ	ФЭ	ФИ	ФС	стерины	ГлЦер
Отсеченные корни пшеницы	140-3200	110-2500	25-900	10-100	11-1200	55-1500

Как видно, из данных таблицы 1.1, содержание различных липидов в отсеченных корнях пшеницы сильно варьируется. Предположительно, это может быть обусловлено, тем, что для анализа были использованы различные партии зерна пшеницы и эксперименты проводились в разные время года.

Таким образом, проведенный обзор литературы показал, что данные о составе липидов в пшенице ограничены, в частности отсутствуют сведения о липидном профиле в интактных растениях пшеницы.

1.2 Методы исследования физико-химического состояния биологических мембран

Методы исследования физико-химического состояния биологических мембран включают: фазово-контрастную микроскопию; электронную микроскопию; лазерную микроскопию; рентгеноструктурный анализ; ядерно-магнитный резонанс (ЯМР); электронно-парамагнитный резонанс (ЭПР) и использование спиновых меток; флуоресцентную спектроскопию (и использование флуоресцентных зондов).

Фазово-контрастная микроскопия основана на том факте, что структурные элементы с различными показателями преломления имеют разную яркость. Таким образом, можно различать различные элементы клеток, но мембраны не видны, поскольку световой микроскоп позволяет видеть объекты по меньшей мере 20 нм, а толщина биомембран, как уже упоминалось, не превышает 10 нм.

Разрешение электронных микроскопов значительно выше. На длине волны, используемой в электронной микроскопии, можно различать объекты

0,5-1,0 нм, т. е. даже большие молекулы. Электронная микроскопия позволяет связать данные о структуре объекта с результатами химического анализа [23]. В работе [24] представлены исследования растительных мембран с использованием электронного микроскопа (рисунок 1.3).

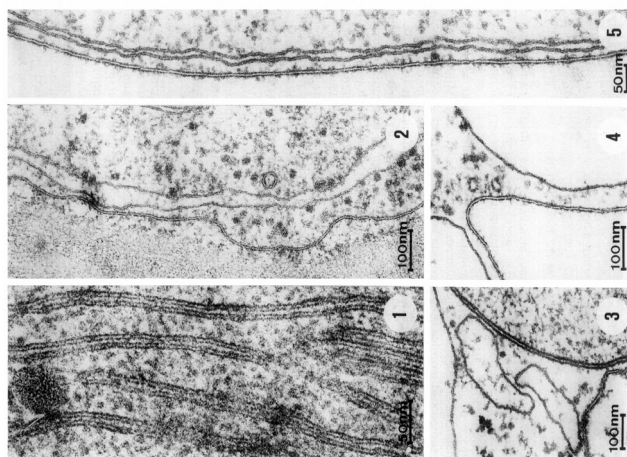


Рисунок 1.3 – Мембранные структуры растительных клеток [24]

Однако этот метод имеет ряд существенных недостатков, которые необходимо учитывать при работе с биологическим материалом. Изучаемый объект обезвоживается, фиксируется, а затем контрастируется с солями тяжелых металлов, что может привести к его искажению.

Недавно в биофизике была введена динамическая лазерная микроскопия, которая используется для изучения изменений формы живых объектов в трехмерных изображениях [23]. В своих исследованиях [25] изучил эндоплазматический ретикулум *Arabidopsis thaliana* при низких температурах с использованием конфокальной микроскопии (рисунок 1.4).

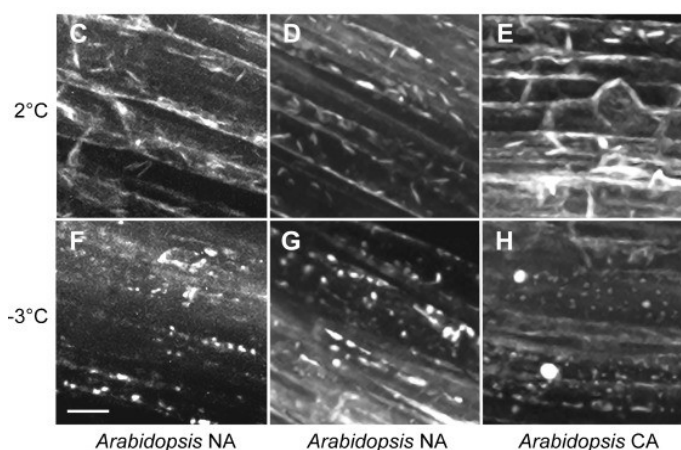


Рисунок 1.4 – Конфокальное микроскопическое изображение эндоплазматического ретикулума мембран в живых клетках во время замораживания [25]

Одним из наиболее точных методов изучения структуры молекул, составляющих клеточную мембрану, является метод рентгеноструктурного анализа на основе рентгеновских лучей. Как правило, это явление наблюдается в тех случаях, когда на пути лучей существуют препятствия, сравнимые по размеру с длиной волны пучка. Если параллельный луч рентгеновских лучей направлен на исследуемый объект, а за объектом помещается фотопленка, то на нем фиксируется дифракционная картина. В результате интерференции лучей на рентгеновском изображении наблюдается образование многих пятен. Рентгенологический анализ предоставляет информацию о структуре объекта на молекулярном уровне. Значение метода заключается в том, что становится возможным, во-первых, точно измерить расстояние между молекулами, изучить их пространственное местоположение, оценить их внутримолекулярную структуру, а во-вторых, определить структуру молекулярных компонентов мембраны в нефиксированных клеточных препаратах [23]. В работе [26] метод рентгеноструктурного анализа использовался для изучения мембранной структуры (рисунок 1.5).

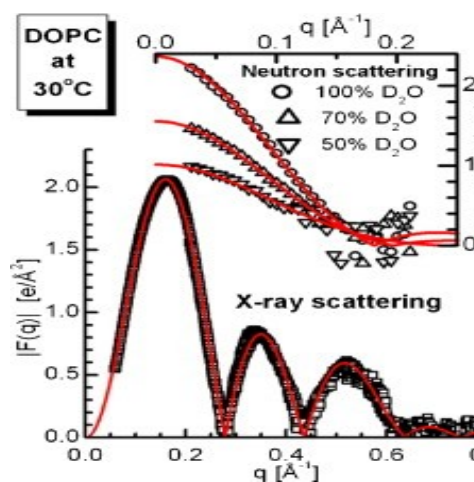


Рисунок 1.5 – Изображение липидного бислоя мембраны путем одновременного анализа рентгеновского и нейтронового рассеивания [26]

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) является следующим традиционным методом изучения состояния мембран. ЯМР-спектроскопия основана на физическом явлении поглощения электромагнитных волн атомными ядрами с магнитным моментом. В биологических исследованиях часто используют ^{13}C , ^1H , ^{31}P . Структура спектров ЯМР зависит от величины диполь-дипольных взаимодействий между ядром и соседними ядрами, неоднородностью магнитного поля и т. д. Процессы релаксации, связанные с диполь-дипольными взаимодействиями, и служат мерой, характеризующей подвижность отдельных атомов и молекул. Метод ЯМР позволяет с высокой точностью получать информацию о селективном поведении отдельных частей белковых молекул и липидов, которые составляют биологическую мембрану.

В настоящее время существуют спектры ЯМР многих белков, что позволяет изучать состояние воды в биологических мембранах, а также наблюдать структурные изменения, сопровождающие их функционирование. ЯМР на ядрах ^{31}C используется для изучения структуры и поведения фосфолипидов в модели и природных мембранах. Преимущество метода заключается в том, что в этом случае информация получается непосредственно от молекулы конкретного фосфолипида, а не от посредника,

как, например, при работе со спиновыми зондами. Недостатки метода включают в себя тот факт, что он имеет относительно низкую чувствительность, кроме того, спектры ЯМР сложны и часто плохо разрешимы.

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) широко используется для исследований в области молекулярной и клеточной биофизики. ЭПР успешно используется при изучении структуры молекул, содержащих парамагнитные частицы, а также кинетики изменений положения частицы при изменении конформации молекулы или ее соседей. В биологических объектах наиболее распространенными парамагнитными частицами являются ионы и свободные радикалы. Парамагнитными ионами являются переходные металлы – Fe, Co, Ni, Cu, Mg. Метод ЭПР позволяет судить об изменении конформации входящих в них комплексов и наблюдать их окислительно-восстановительные превращения. С помощью ЭПР исследуются также триплетные состояния, возникающие, например, во время фотобиологических реакций. Очень важным для мембранологии является использование спиновых меток и зондов, когда в исследуемую систему вводятся стабильные свободные радикалы, изменение характеристик спектров ЭПР оценивается по структурному и динамическому состоянию мембранных молекул.

Результаты, полученные методом ЭПР и ЯМР, позволяют выяснить структурную организацию мембран и их изменения в функционировании. Кроме того, они дополняют электронные микроскопические данные об ультраструктурной организации мембран.

Методы колебательной спектроскопии, такие как рассеянная спектроскопия и инфракрасная спектроскопия, представляют большой интерес для изучения отдельных компонентов мембраны [21].

Флуоресцентную спектроскопию можно использовать при изучении структурной организации мембран. Известно, что флуоресценция в клетках сопровождается появлением электронно-возбужденных состояний, когда

электрон переходит из основного состояния в возбужденное. Энергия, полученная молекулой, может потребляться в виде тепла или излучаться как свет. Светоизлучение проводится в течение более длительного времени, чем поглощение. При работе с биологическими объектами, в частности с клеточными мембранами, регистрируется либо собственная флуоресценция отдельных молекул плазматической мембраны, либо флуоресценция зондов или меток, специально связанных с макромолекулой и вводимых в клетку. Существуют флуоресцентные метки, образующие химическую связь с молекулами мембраны и флуоресцентные зонды, которые нековалентно связываются с молекулами мембраны. Когда зонд или метка включены в мембрану, их флуоресцентные свойства изменяются, что дает информацию о структурных особенностях исследуемой системы. Например, для измерения текучести мембраны наблюдается перемещение спиновых или флуоресцентных зондов, включенных в мембрану.

Мембранная текучесть является одним из основных макроскопических биофизических свойств, характеризующих клеточные мембраны. Если в месте связывания флуорохрома изменяется заряд, микровязкость, состояние гидрофильности – гидрофобности или другие условия, то он меняет характер излучения. Поэтому его поведение может служить хорошим тестом при исследовании полярных (неполярных) участков белка, трансмембранных потенциалов, изучение структурных и функциональных изменений в мембранах, состояния воды в биологических мембранах. В нескольких исследованиях указывалось, что текучесть важна во время клеточных событий, таких как эндоцитоз, слияние мембран и, что важно, во время развития [27]. Эффекты, которые уменьшают площадь одной липидной молекулы, такие как повышенное гидростатическое давление, более низкая температура или добавление холестерина к фосфолипидам в жидкокристаллическом состоянии, вызывают снижение текучести. Это согласуется с теорией свободного объема, согласно которой плотность и текучесть обратно пропорциональны. Чем более плотная упаковка характерна

для мембраны, тем более ограниченным будет движение зонда. Результаты исследований зависят от текучести мембраны как индекса или маркера, который отражает потенциал клеточной пластичности [28].

Следует отметить, что существует разница между двумя типами таких флуоресцентных веществ - флуоресцентными зондами и флуоресцентными метками. Флуоресцентная метка, связанная с субстратом химической связью, тогда как флуоресцентные зонды ассоциированы нековалентно.

Применимость метода ограничивается несколькими требованиями к флуоресцирующему хромофору. Он должен достаточно прочно связываться с определенными участками макромолекул, мембран и т.д. Зонд должен быть чувствителен к условиям окружения и не должен сам оказывать влияния на свойства мембран, макромолекул и пр. к таким зондам относятся 1,8-АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат-анион), поглощение 360 нм, флуоресценция 530 нм; дансихлорид, поглощение 310 нм, флуоресценция 470 нм; лаурдан поглощение 360 нм; флуоресценция 490 нм.

Так, для АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат-анион) характерно, что в водных растворах их флуоресценция слаба, но в неполярном окружении квантовый выход флуоресценции (ϕ) резко возрастает (в десятки раз). Возможно, определить зависимость ϕ от степени полярности (неполярности) окружения зонда. Так, имея максимум флуоресценции в воде при 515 нм, АНС в суспензии митохондрий флуоресцирует при 480 нм, а с белками при 460 нм. Отмечено также, что выход флуоресценции АНС в гидрофобном окружении возрастает в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} . Эти катионы, по-видимому, меняют сродство АНС к мембранам и т.п.

При связывании зонда с мембраной заметно изменяется поляризация флуоресценции и ее анизотропия. Возможно также изменение спектра поглощения зонда и его спектра флуоресценции, что следует учитывать для флуоресценции зонда и корректировки возбуждения с целью повышения чувствительности метода.

Зависимость между равновесным количеством свободного и связанного зонда и концентрацией мест связывания зонда на мембране описывается уравнением:

$$k_c = r/C(N-r),$$

где k_c – константа связывания;

r – концентрация связанного зонда;

C – концентрация свободного зонда;

N – концентрация мест связывания зонда на мембране.

При этом предполагается, что все центры связывания одинаковы и не влияют друг на друга. Тогда в соответствующих координатах можно получить прямую зависимость. Для определения k_c и N необходимо знать концентрацию связанного зонда r , которую в известных случаях можно увязать со всей измеряемой флуоресценцией $I_{\text{фл}}$. Модифицируя уравнения для конкретных ситуаций – титрование зондами определенной концентрации зонда – можно найти величины $I_{\text{фл}}^{\text{моль}}$ – величину «молярной флуоресценции», зависящую от зонда, параметров установки и квантового выхода флуоресценции и величину $n_{\text{уд}}$ – число молей центров связывания на единицу мембранного материала.

При наличии в зондах заряженных групп изменения поверхностного заряда мембраны должны влиять на связывание зондов, при чем связывание выше у противоположного заряженных участников. Установлена определенная зависимость между поверхностным зарядом мембраны и интенсивностью флуоресценции зонда [29].

Лаурдан (рисунок 1.6) представляет собой флуоресцентный мембранный маркер, используемый для исследования мембранной текучести [30]. Отличительной особенностью лаурдана является его способность ощущать полярность его окружения. В случае липидных бислоев, лаурдан обнаруживает присутствие воды в мембране, что дает нам информацию о проникновении воды, свойство имеющее отношение к мембранной текучести (рисунок 1.7). Лаурдан представляет собой молекулу, чьи спектроскопические

свойства влияют на состав и динамику его локального изменения. Другими словами, флуоресценция лаурдана зависит от двух основных факторов: полярность среды (основное состояние флуорофора) и скорости дипольной релаксации молекул или молекулярных остатков, которые могут переориентироваться вокруг фрагмента флуоресцентного лаурдана в возбужденном состоянии [31].

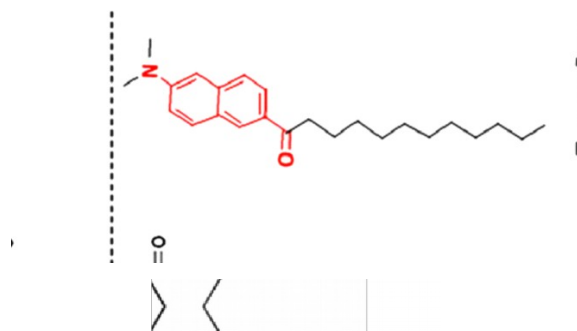


Рисунок 1.6 – Химическая структура лаурдана [32]

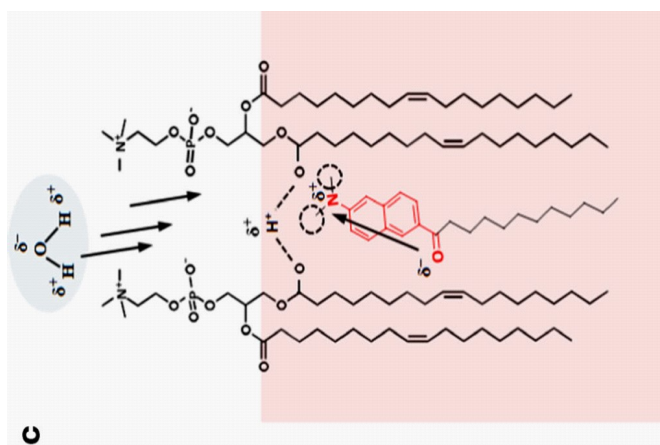


Рисунок 1.7 – Схематическое изображение взаимодействия фосфолипидов и лаурдана [31]

Благодаря своей молекулярной структуре, флуоресцентный нафталиновый фрагмент лаурдана представляет собой дипольный момент между 2-диметиламино- и 6-карбонильными остатками. При возбуждении дипольный момент возрастает; считается, что это увеличение вызывает переориентацию окружающих диполей растворителя. Энергия, необходимая

для переориентации окружающих растворителей, уменьшает выходящую энергию лаурдана, а спектр излучения зонда непрерывно смещается в красную область света, тогда соседние молекулы воды вокруг реорганизуются [33]. Соответственно, смещения в красную область спектра излучения наблюдаются в полярных растворителях, тогда как в неполярных растворителях, например, в плотно упакованных Lo-фазах с уменьшенным содержанием воды, эмиссия смещается в более синюю область света. Для количественной оценки конкретных сдвигов в спектральном поведении лаурдана были рассчитаны значения обобщенной поляризации (ГП).

$$ГП = (I_{430} - I_{490}) / (I_{430} + I_{490}),$$

где I_{430} и I_{490} являются интенсивностью излучения при 430 и 490 нм.

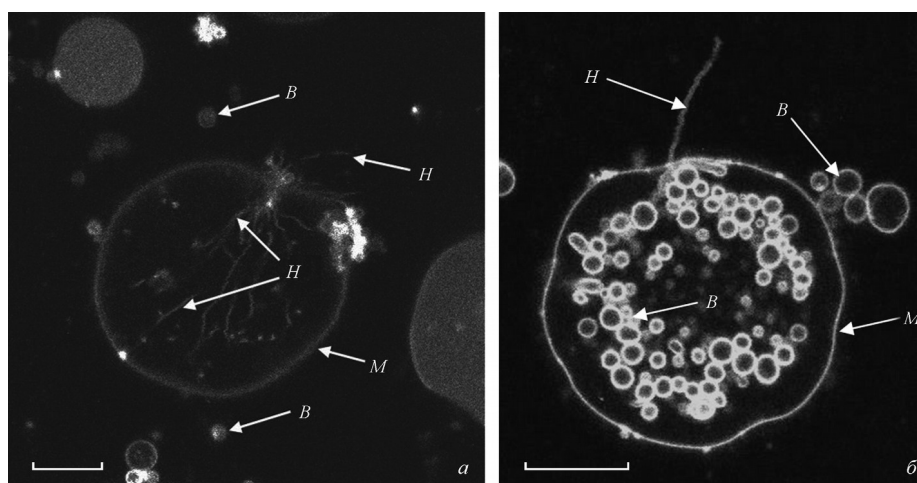
Значение ГП безразмерное и отражает преобладающее состояние липидов в липидных бислоях. В искусственно созданных тройных липидных смесях жидкие упорядоченные домены характеризовались высокими значениями ГП [34].

Значение ГП можно использовать в качестве индикатора для содержания воды в липидных фазах и, соответственно, в качестве степени для преобладающего состояния липидного порядка. Значение ГП «-1» означает водную фазу, тогда как значение ГП «+1» означает полностью упорядоченную фазу. Экспериментально эти значения зависят от состава липидов и от температуры. В жидкой неупорядоченной фазе модельных мембран ГП -значения варьировались от «-0,3» до «+0,3», а в жидких упорядоченных фазах эти значения обычно находятся в диапазоне от «+0,5» до «+0,6» [33].

Нестеркина с соавт. [35] в своих экспериментах с помощью многофотонного конфокального люминесцентного сканирующего лазерного микроскопа MicroTime 200 с пикосекундным временем разрешения (фирмы PicoQuant GmbH, Германия) получили серию изображений вакуолей, проинкубированных с лаурданом, и фракции изолированных белок-липидных микродоменов, выделенных из опалесцирующей зоны градиента

сахарозы и также проинкубированных с лаурданом. На основе полученных изображений проводили расчет значений ГП. Значение ГП для вакуолей мембраны варьировало и составляло приблизительно «+0,06», что говорит о ее жидкости. Значение ГП фракции выделенных рафтов оказалось в пределах «+0,7», что свидетельствует, о том, что в этой фракции находятся упорядоченные (плотные) домены. Таким образом, полученные значения ГП для фракции тонопластов и рафтов однозначно характеризуют изолированную опалесцирующую зону градиента сахарозы как зону, содержащую высокоупорядоченные липиды, и подтверждают наличие белково-липидных микродоменов на вакуолярной мембране.

В работе [36] обсуждаются результаты исследования особенностей строения вакуолярных мембран растительных клеток, исследованных с использованием конфокальной микроскопии (рисунок 1.8). Были получены распределения значений ГП флуоресценции лаурдана для различных участков вакуолярной мембраны.



В – везикулы, М – мембрана, Н – «трансвакуолярные нити»,
об. 60^x, масштабные отрезки – 10 мкм

Рисунок 1.8 – Конфокальное изображение изолированных вакуолей, меченных флуоресцентными зондами – АНС (а) и лаурданом (б) [36]

Среднее значение ГП флуоресценции областей, характеризующихся повышенной интенсивностью флуоресценции, и всей мембраны существенно различаются («-0,22» и «-0,04» соответственно, $P < 0,05$, критерий Манна–Уитни). Однако характер распределения значений ГП в случаях ярких областей был различным по сравнению с распределением значений ГП для всей мембраны (рисунок 1.9). По меньшей мере, три отдельных пика могут быть обнаружены в гистограмме распределения значений флуоресценции лаурдана в областях с повышенной интенсивностью. Среди упомянутых выше трех пиков имеются области спектра значений ГП, соответствующие более жидкой, средней плотности и более плотным состояниям вещества (максимумы значений ГП «-0,5», «-0,2», и «+0,35» соответственно). Как видно из гистограммы на рисунке 1.9, значения ГП флуоресценции лаурдана в вакуолярной мембране в норме имеют близкое к нормальному распределению и варьируют в диапазоне от «-0,6» до «+0,4» с максимумом «-0,1», что соответствует жидкокристаллическому состоянию липидов мембраны.

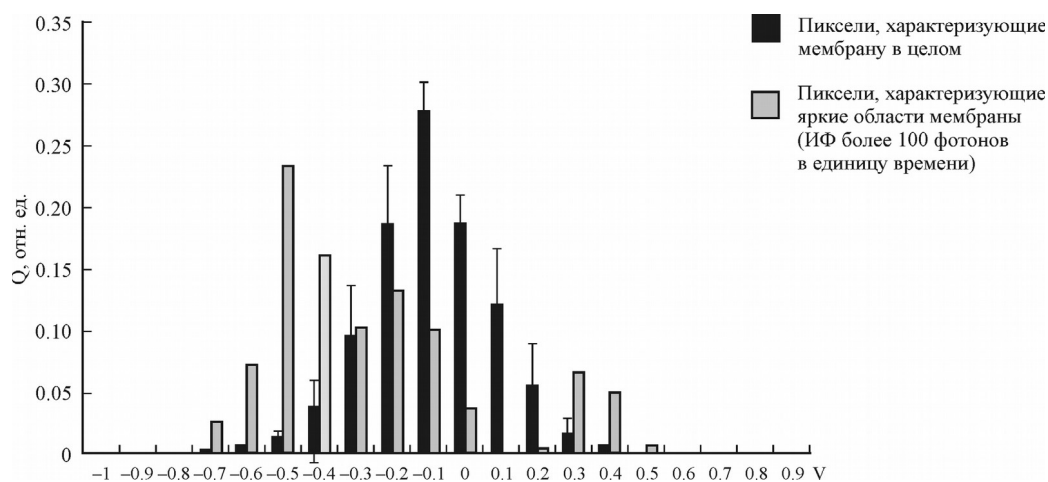


Рисунок 1.9 – Распределение значений ГП флуоресценции лаурдана, связанного с липидной составляющей вакуолярной мембраны [36]

Таким образом, изучение особенностей морфологии, фазового состояния и микровязкости элементов мембран изолированных вакуолей

растительных клеток с помощью конфокальной микроскопии при сканировании верхней области изолированных вакуолей выявило части флуоресценции высокой интенсивности. Такими областями могут быть кластеры липидно-белковых образований с преобладанием их белкового состава. Характер распределения значений флуоресценции ГП лаурдана в этих областях интенсивности флуоресценции отличался от распределения значений ГП для всей мембраны. Полученные данные свидетельствуют о существенной разнице между микровязкой интенсивно флуоресцирующей областью и остальной частью мембраны.

В экспериментах Белугина [37] по изучению свойств упаковки и гидратации липидного бислоя двух популяций везикул с помощью лаурдана выявлено преобладание доли твердофазных доменов в липидном бислое во фракции мембран с высоким содержанием стеринов. Фракции плазмалеммы низкой плотности обогащены стеринами и имеют более упорядоченную структуру липидного матрикса по сравнению с мембранами с высокой плотностью.

Заключение

В настоящем обзоре обобщены данные современной литературы о роли биологической мембраны и отдельных ее структур, в частности мембранных липидов в жизнедеятельности растений. Проведен анализ методов исследования физико-химического состояния биологических мембран. Выявлено, что эффективным инструментом исследования изменений состояния мембраны является метод флуоресцентных зондов. Флуориметрия и многофотомная микроскопия стандартные методы для измерения флуоресценции зондов. Лаурдан остается одним из популярных, универсальных и основным флуоресцентным зондом.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Характеристика материалов и реактивов

В работе для проращивания использовали яровую пшеницу (*Triticum aestivum* L.) сорта «Казанская юбилейная».

В работе использовали следующие химические реактивы: хлорид кальция (CaCl_2 , «Fluka Chemie AG», №2110), нистатин ($\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{NO}_{17}$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 1400-61-9), тритон X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ($n=9-10$), Scintran, № 14630), β -ситостерин ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 83-46-5), триолеин ($(\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COO})_3\text{C}_3\text{H}_5$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 122-32-7), олеиновая кислота ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 112-80-1), сквален ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 111-02-4), фосфатидилхолин («SIGMA-ALDRICH», CAS 8002-43-5), смесь гликоцерамидов («SIGMA-ALDRICH», CAS 85305-88-0), сахароза ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, «ТатХимПродукт», чда), HEPES, ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 7365-45-9), ЭДТА ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 60-00-4), поливинилпирролидон ($(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 9003-39-8), дитиотрийтол ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 3483-12-3), фенилметан сульфонил флуорид ($\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 329-98-6), лаурдан ($\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}$, «SIGMA-ALDRICH», CAS 74515-25-6).

2.2 Выращивание проростков пшеницы

Семена пшеницы предварительно замачивали в дистиллированной воде в течение суток в специальной кювете. Далее наклюнувшиеся семена помещали на различные среды для проращивания:

- $2,5 \cdot 10^{-4}$ М раствор CaCl_2 – контроль;
- 10^{-3} М раствор CaCl_2 – модель 1;
- раствор β -ситостерина с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ М – модель 2;

- раствор нистатина с концентрацией 10^{-4} М – модель 3;
- $1,6 \cdot 10^{-5}$ М раствор тритона X-100 – модель 4.

Кюветы с проростками помещали в растительную камеру на четыре дня при температуре плюс 22 °С и освещенности 100 Вт/м² с 12-часовым фотопериодом.

2.3 Экстрагирование липидов из корней пшеницы

Сумму липидов экстрагировали смесью изопропанола и хлороформа по методу [38] с модификациями [39]:

1) навеску корней (1 г) измельчали, гомогенизировали с 3 мл изопропилового спирта и помещали в термостат на 30 мин предварительно его нагрев до 70 °С;

2) на фильтр Шотта переносили гомогенат и отфильтровывали в круглодонную колбу с помощью водоструйного насоса;

3) материал, который остался на фильтре переносили в пробирку со шлифом, добавляли 5 мл смеси хлороформ – изопропиловый спирт (1:1) и помещали в термостат на 30 мин;

4) гомогенат переносили на фильтр Шотта, экстракт отфильтровывали с помощью водоструйного насоса в ту же круглодонную колбу с первой частью экстракта;

5) объединенный экстракт выпаривали (ротормый испаритель) при температуре 40 °С;

6) к сухому остатку добавляли 2 мл смеси хлороформ: метанол (1:1), количественно переносили в колбу (конечный объем 3 мл), добавляли 4 мл воды, встряхивали и оставляли до разделения хлороформной и водно-метанольной фаз;

7) отбирали хлороформную фазу в пробирки со шлифом и выпаривали на ротормом испарителе;

8) добавляли 100 мкл хлороформа и количественно переносили в виалы, выпаривали (ротормый испаритель);

9) определили выход липидных веществ гравиметрическим методом, взвешивая виалки без и с сухим остатком экстрактом. Полученные результаты приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Определение выхода липидных веществ из выращенных корней пшеницы* (n=2)

Объект исследования	Выход липидных веществ,	
	г	%
Экстракт корней контроль	0,0015	0,15
	0,0012	0,12
Экстракт корней модель 1	0,0015	0,16
	0,0017	0,17
Экстракт корней модель 2	0,0015	0,15
	0,0017	0,17
Экстракт корней модель 3	0,0016	0,16
	0,0015	0,15
Экстракт корней модель 4	0,0046	0,46
	0,0042	0,42

* - для экстракции брали 1 г корней

2.4 Определение состава и содержания липидов в экстрактах из корней пшеницы с применением инструментальной тонкослойной хроматографии

В полученных экстрактах из корней пшеницы определяли состав нейтральных и полярных липидов с применением инструментальной тонкослойной хроматографии (ТСХ) по методике п. 2.7.1.

Для исследования нейтральных липидов на пластину наряду с экстрактами наносили растворы веществ – стандартов с шириной трека 8 мм (таблица 2.2, 2.3). Каждый объект анализировали в трех аналитических проворностях.

Хроматографию проводили в системе растворителей №1, дериватизацию проводили опрыскиванием пластины реактивом №1. Полученные хроматограммы приведены на рисунке 2.1.

Таблица 2.2 – Условия нанесения объектов исследования на хроматограмму при исследовании состава нейтральных липидов

Объект исследования	Условное обозначение	Условия растворения/концентрация	Объем нанесения, мкл	Номер трека
Экстракт корней контроль	Rc _{1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	1,7,13
Экстракт корней модель 1	Rca _{1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	2,8,14
Экстракт корней модель 2	R _{s1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	4,10,16
Экстракт корней модель 3	Rn _{1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	3,9,15
Экстракт корней модель 4	Rt _{1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	5,11,17
Ситостерол	St _{1,2,3}	1 мкг/мкл	8,12,16	6,12,18

Таблица 2.3 – Условия нанесения объектов исследования на хроматограмму при исследовании состава нейтральных липидов

Объект исследования	Условное обозначение	Условия растворения/концентрация	Объем нанесения, мкл	Номер трека
Экстракт корней контроль	Rc _{1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	2,4,6
Ситостерол	St ₁	1 мкг/мкл	6	1
Циклоартенол	St ₂	1 мкг/мкл	6	3
Олеиновая кислота	St ₃	1 мкг/мкл	6	5
Триолеин	St ₄	1 мкг/мкл	6	7
Сквален	St ₅	1 мкг/мкл	6	8

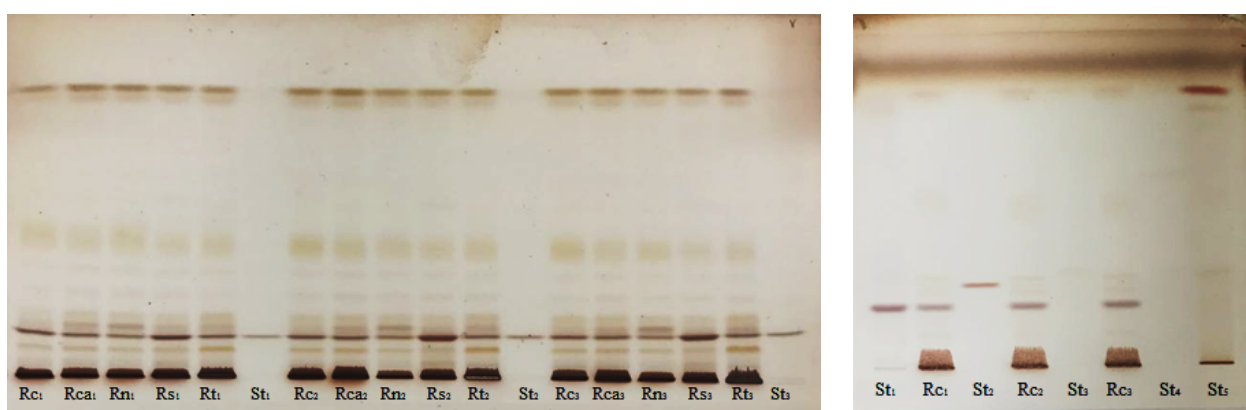


Рисунок 2.1 – Хроматограммы нейтральных липидов в экстрактах корней пшеницы

Для исследования полярных липидов на пластину наряду с экстрактами наносили растворы веществ – стандартов с шириной трека 8 мм (таблица 2.4). Каждый объект анализировали в трех аналитических проворностях.

Таблица 2.4 – Условия нанесения объектов исследования на хроматограмму при исследовании состава полярных липидов

Объект исследования	Условное обозначение	Условия растворения/концентрация	Объем нанесения, мкл	Номер трека
Экстракт корней контроль	R _{C1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	1,7,13
Экстракт корней модель 1	R _{Ca1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	2,8,14
Экстракт корней модель 2	R _{S1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	4,10,16
Экстракт корней модель 3	R _{n1,2,3}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	3,9,15
Экстракт корней модель 4	R _{t1,2}	Сухой остаток растворяли в 50 мкл хлороформа	5	5,17
ФХ	St _{1,2,3}	1 мкг/мл	4,6,8	6,12,18
ГлЦер1 и ГлЦер2	Gl	1 мкг/мл	12	11

Хроматографию проводили в системе растворителей №2, дериватизацию проводили опрыскиванием пластины реактивом №1. Полученные хроматограммы приведены на рисунке 2.2.

Далее пластины помещали в денситометр «TLS Scanner 4» и сканировали в режиме абсорбции при длине волны 490 нм с щелью 8,00×0,40 мм со скоростью 20 мм/с и разрешением 100 мкм/шаг. Результаты сканирования обрабатываются автоматически с помощью специализированной программы «winCATS», версия 1.4.9 с использованием фильтра Savitsky – Golay 7 (цифровой фильтр, который может быть применен к ряду цифровых точек данных в целях сглаживания данных, то есть, чтобы увеличить отношение сигнал – шум, значительно не искажая сигнал). Полученные денситограммы и результаты их обработки приведены в приложении 2,3,4,5. В таблицах 2.6 и 2.7 приведены данные о количественном содержании обнаруженных липидных веществ в исследуемых экстрактах.

Для количественного анализа стеринов, терпеноидов, жирных кислот, триглицеридов, углеводов, ФХ и ГлЦер1 и ГлЦер2 в анализируемых экстрактах на пластины наносили растворы соответствующих веществ – стандартов. По площади (S) полученных пиков соответствующих веществ – стандартов на хроматограмме построены калибровочные графики (таблица 2.5). По

ним определили содержание отдельных групп липидов в анализируемых экстрактах из корней пшеницы. Полученные результаты приведены в таблице 2.8-2.13.

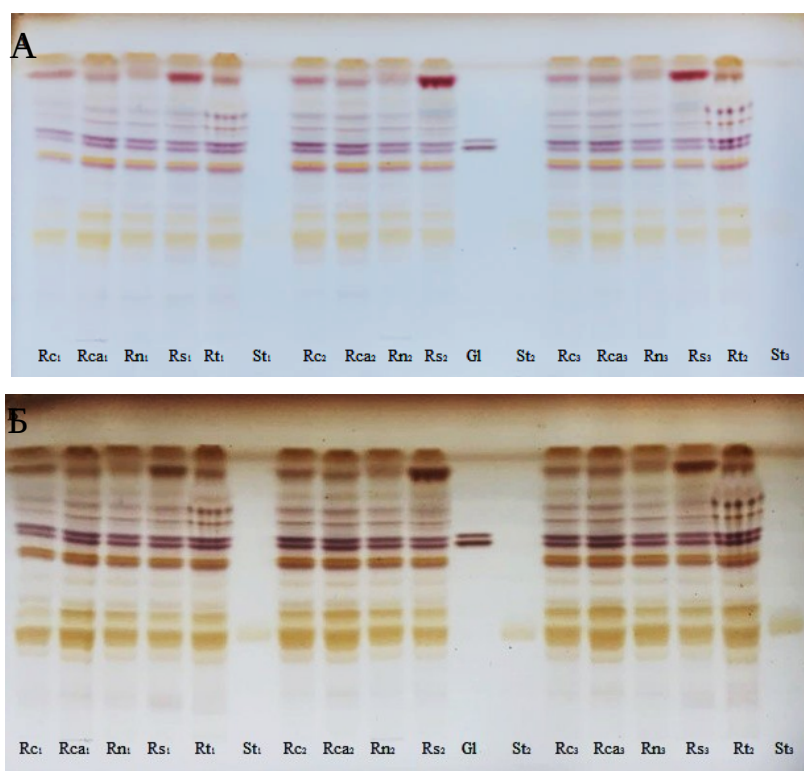


Рисунок 2.2 – Хроматограммы полярных липидов в экстрактах корней пшеницы после нагревания пластины при 150 °С 5 минут (А) и 20 минут (Б)

Таблица 2.5 – Калибровочные графики зависимости площади пика от количества вещества, построенные по веществам – стандартам

Вещества стандарты	Количество вещества	Полученное калибровочное уравнение (по площади пиков)	Единица измерения	r; sdv
β-ситостерол	2; 4; 6; 8; 10	$y=4812,461+668,782x$	мкг	0,96; 6,88
фосфатидилхолин	4; 6; 8	$y=1629+864,6x$	мкг	0,97; 9,47
терпеноиды	0,2; 0,3; 0,4	$y=1344+5,852x$	мкг	0,99; 2,57
жирные кислоты	4; 6; 8	$y=2512+519,2x$	мкг	0,99; 0,97
углеводороды (сквален)	4; 6; 8	$y=4081+651x$	мкг	0,99; 3,07
гликоцерамид 1	2,4; 3,6; 4,8	$y= 4703+2020x$	мкг	0,99; 1,44
гликоцерамид 2	1,6; 2,4; 3,2	$y= 2336+2365x$	мкг	0,99; 0,53

Таблица 2.6 – Состав и содержание полярных липидов в экстрактах из корней пшеницы, выращенных при действии мембранотропных веществ, (n=3)

R _f	Содержание полярных липидов в экстракте корней пшеницы, % ***					Отнесение
	Контроль	CaCl ₂ (10 ⁻³ М)	β-ситостерин (5·10 ⁻⁴ М)	Нистатин (10 ⁻⁴ М)	Тритон X-100 (1,6·10 ⁻⁵ М)	
0,1 5	1,06±0,03	0,95±0,25	1,42±1,05	1,03±0,69	1,50±0,36	ФС
0,1 7	0,62±0,48	1,79±0,53	1,06±0,52	1,20±0,85	1,55±0,80	ФИ
0,3 1	3,18±0,22	3,37±0,39	2,72±0,52	3,17±0,45	3,96±0,86	-
0,3 8 9	19,34±1,4 9	18,13±2,54	15,07±1,73	18,65±1,27	15,87±1,08	ФХ*
0,4 5	7,62±0,98	10,57±0,31	7,15±0,32	8,41±1,04	9,37±1,55	ФГ
0,4 9	2,75±0,24	2,65±0,25	2,21±0,37	2,57±0,15	1,98±0,46	дифосфатидилглицерин
0,5 7	1,88±0,44	2,03±0,13	1,43±0,09	1,82±0,16	2,05±0,70	ДГДГ
0,6 6 2	13,37±1,0 2	12,71±0,11	11,74±0,38	13,58±0,27	13,19±0,02	ФЭ
0,7 2	6,00±0,51	6,25±0,52	5,73±0,19	6,54±0,44	6,39±0,12	ГлЦер 1*
0,7 4	6,57±1,07	6,39±0,91	4,74±0,18	5,53±0,71	5,38±0,33	ГлЦер 2*
0,8 0	3,45±0,51	3,23±0,51	3,99±0,45	3,24±0,66	5,21±0,47	-
0,8 3	4,79±0,76	4,66±1,02	6,17±1,04	4,13±0,58	6,19±0,28	-
0,8 7	3,17±0,61	3,84±0,77	3,65±0,82	3,46±0,67	2,62±0,13	-
0,9 3 4	12,03±1,1 4	9,78±0,90	19,89±2,82	11,83±1,20 5	9,91±1,07	МГДГ
0,9 9	14,95±2,2 5	13,64±0,69	13,06±1,23	14,35±1,53	14,88±2,95	сумма сопутствующих соединений

*- отнесение в сопоставлении с литературными данными [40]

** - отнесение путем сопоставления Rf пятна с Rf вещества-стандарта

***- распределение липидов по площади пиков

Таблица 2.7 – Состав и содержание нейтральных липидов в экстрактах из корней пшеницы, выращенных при действии мембранотропных веществ, (n=3)

R _f	Содержание нейтральных липидов в экстракте корней пшеницы, % ***					Отнесение
	Контроль	CaCl ₂ (10 ⁻³ М)	β-ситостерин (5·10 ⁻⁴ М)	нистатин (10 ⁻⁴ М)	Тритон X-100 (1,6·10 ⁻⁵ М)	
0,04	42,22±2,47	41,77±1,05	40,86±2,12	39,81±2,38	39,21±2,29	сумма сопутствующих соединений
0,14	3,66±0,54	3,95±0,17	4,71±0,62	3,48±0,63	7,46±0,46	1,2-диглицериды*
0,18	13,98±1,08	12,47±0,43	21,41±1,92	11,48±0,28	12,68±0,38	стерины**
0,21	2,42±0,45	4,27±0,19	3,09±0,86	7,42±1,14	4,23±0,60	высшие спирты*
0,25	3,32±0,92	3,66±0,63	2,96±0,22	3,42±0,85	4,96±0,29	терпеноиды*
0,33	0,91±0,14	1,20±0,19	1,20±0,06	1,18±0,11	1,00±0,18	жирные кислоты**
0,41	0,77±0,13	1,02±0,03	0,62±0,10	0,84±0,08	0,89±0,08	-
0,51	10,31±0,55	7,47±0,43	6,35±0,46	9,67±1,36	8,71±0,36	триглицериды**
0,65	0,88±0,07	0,86±0,11	0,80±0,16	0,74±0,12	0,56±0,14	-
0,92	3,33±1,25	3,21±0,45	2,46±0,42	2,44±0,55	3,50±0,99	-
0,98	4,66±0,66	6,04±0,45	3,92±0,72	5,19±0,74	4,69±0,62	эфиры стеринов*
1,00	13,56±1,94	14,08±0,71	11,63±1,15	14,34±1,02	12,10±1,12	углеводороды, сквален**

*- отнесение в сопоставлении с литературными данными [40]

** - отнесение путем сопоставления Rf пятна с Rf вещества-стандарта

***- распределение липидов по площади пиков

Таблица 2.8 – Содержание ФХ в экстрактах из корней пшеницы, выращенной при различном стрессовом воздействии, n=3

Объект исследования	Площадь пика, AU			Содержание ФХ*					
				в экстракте, мкг			мкг/г сыр.в. корней		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Экстракт корней контроль	-	18178,0	16277,0	-	19,14	16,94	-	191,41	169,42
Экстракт корней модель 1	18185,0	18070,1	18271,3	19,15	19,02	19,25	191,49	190,16	192,49
Экстракт корней модель 2	13565,0	13285,3	12176,9	13,81	13,48	12,20	138,05	134,82	122,00
Экстракт корней модель 3	14270,0	14984,2	16195,8	14,62	15,45	16,85	146,21	154,47	168,48
Экстракт корней модель 4	14923,0	16488,6	-	15,38	17,19	-	153,76	171,87	-

* данные рассчитаны с использованием калибровочного графика зависимости площади пика от количества вещества

Таблица 2.9 – Содержание стероидов в экстрактах из корней пшеницы, выращенной при различном стрессовом воздействии, n=3

Объект исследования	Площадь пика, AU			Содержание стероидов*					
				в экстракте, мкг			мкг/г сыр.в. корней		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Экстракт корней контроль	7022,0	7439,0	7360,7	3,30	3,93	3,81	33,04	39,27	38,10
Экстракт корней модель 1	6820,2	7177,0	6898,5	3,00	3,54	3,12	30,02	35,36	31,19
Экстракт корней модель 2	-	13466,9	12934,8	-	12,94	12,14	-	129,41	121,45
Экстракт корней модель 3	5544,0	5607,0	5515,8	1,09	1,19	1,05	10,94	11,88	10,52
Экстракт корней модель 4	7099,7	7184,4	7305,0	3,42	3,55	3,73	34,20	35,47	37,27

* данные рассчитаны с использованием калибровочного графика зависимости площади пика от количества вещества

Таблица 2.10 – Содержание ГлЦер 1 в экстрактах из корней пшеницы, выращенной при различном стрессовом воздействии, n=3

Объект исследования	Площадь пика, AU			Содержание ГлЦер 1*					
				в экстракте, мкг			мкг/г сыр.в. корней		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Экстракт корней контроль	3514,9	6248,7	6055,6	-	0,77	0,67	-	7,65	6,70
Экстракт корней модель 1	4642,1	7206,5	7485,3	-	1,24	1,38	-	12,39	13,77
Экстракт корней модель 2	4411,9	5369,2	5148	-	0,33	0,22	-	3,30	2,20
Экстракт корней модель 3	4287,9	5791,9	5571,5	-	0,54	0,43	-	5,39	4,30
Экстракт корней модель 4	5653,8	7064,5		0,47	1,17	-	4,71	11,69	-

* данные рассчитаны с использованием калибровочного графика зависимости площади пика от количества вещества

Таблица 2.11 – Содержание ГлЦер 2 в экстрактах из корней пшеницы, выращенной при различном стрессовом воздействии, n=3

Объект исследования	Площадь пика, AU			Содержание ГлЦер 2*					
				в экстракте, мкг			мкг/г сыр.в. корней		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Экстракт корней контроль	3484,6	6964,8	7052,2	0,49	1,96	1,99	4,86	19,57	19,94
Экстракт корней модель 1	4294,2	7298,8	8341,1	0,83	2,10	2,54	8,28	20,98	25,39

Экстракт корней модель 2	3656,4	4404,1	4282	0,56	0,87	0,82	5,58	8,74	8,23
Экстракт корней модель 3	3346,3	5049,4	4880,3	0,43	1,15	1,08	4,27	11,47	10,76
Экстракт корней модель 4	4613,7	6130,8		0,96	1,60	-	9,63	16,05	

* данные рассчитаны с использованием калибровочного графика зависимости площади пика от количества вещества

Таблица 2.12 – Содержание терпеноидов в экстрактах из корней пшеницы, выращенной при различном стрессовом воздействии, n=3

Объект исследования	Площадь пика, AU			Содержание терпеноидов*					
				в экстракте, мкг			мг/г сыр.в. корней		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Экстракт корней контроль	1118,6	1823,1	2414,4	-	81,87	182,91	-	0,82	1,83
Экстракт корней модель 1	1625,1	1951,9	2584,6	48,03	103,88	212,00	0,48	1,04	2,12
Экстракт корней модель 2	1452,6	1634,2	1840,8	18,56	49,59	84,89	0,19	0,50	0,85
Экстракт корней модель 3	1374,7	2086	1492,4	5,25	126,79	25,36	0,05	1,27	0,25
Экстракт корней модель 4	2655,8	2656,3	3159,9	224,16	224,25	310,30	2,24	2,24	3,10

* данные рассчитаны с использованием калибровочного графика зависимости площади пика от количества вещества

Таблица 2.13 – Содержание углеводов в экстрактах из корней пшеницы, выращенной при различном стрессовом воздействии, n=3

Объект исследования	Площадь пика, AU			Содержание углеводов *					
				в экстракте, мкг			мкг/г сыр.в. корней		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Экстракт корней контроль	5330,5	8453,6	7675	1,92	6,72	5,52	-	67,17	55,21

Экстракт корней модель 1	7352,8	8788,8	7510,1	5,03	7,23	5,27	50,26	-	52,67
Экстракт корней модель 2	6613,2	6917,8	6039,1	3,89	4,36	3,01	38,90	43,58	30,08
Экстракт корней модель 3	7416	7030	6383,6	5,12	4,53	3,54	51,23	45,30	35,37
Экстракт корней модель 4	7088,9	7024,4	6453,7	4,62	4,52	3,64	46,20	45,21	36,45

* данные рассчитаны с использованием калибровочного графика зависимости площади пика от количества вещества

2.5 Определение проницаемости и фазового состояния мембран клеток корней пшеницы

У проростков, выращенных на средах с добавлением мембранотропных веществ, анализировали выход электролитов и индекс мембранной стабильности по методике, описанной в п. 2.6.2. Полученные данные приведены в таблице 3.1.

Из проростков пшеницы, выращенных на средах с добавлением различных мембранотропных веществ, выделяли микросомальную фракцию и исследовали фазовое состояние мембран по методике, описанной в разделе 2.6.3. Полученные результаты приведены в таблице 3.2.

2.6 Общие методы исследования

2.6.1 Инструментальная тонкослойная хроматография

Инструментальная ТСХ проводилась на лабораторном комплексе «САМАГ» (Швейцария). В состав комплекса входят приборы: «Linomat 5» – для автоматического нанесения экстрактов на хроматограмму, «ADS 2» – для элюирования хроматограммы в системе растворителей, «TLS Scanner 4» – для денситометрической обработки хроматограммы. Работа комплекса осуществляется через компьютер с помощью специализированной компьютерной программы «winCATS», версия 1.4.9. Для хроматографии использовали классические ТСХ пластины на стекле, силикагель 60, размером 10*20 см, «E. MERCK KgaA» (1.00384.0001), которые перед анализом элюировали в этаноле, и активировали нагреванием 120°C 20 мин. Для разделения использовали системы растворителей: №1 – петролейный эфир – этиловый эфир – уксусная кислота (80:20:1); № 2 – хлороформ – метанол – вода (65:25:4). Для дериватизации использовали реагент – 5 % раствором H₂SO₄ в этаноле. Пластины опрыскивали реагентом с помощью

ручного пульверизатора (Ленхром), высушивали, переносили в сушильный шкаф и нагревали 20 мин при температуре 150°C.

2.6.2 Определение выхода электролитов и индекса мембранной стабильности

Навеску корней (100 мг) промывали в бидистиллированной воде 2 – 3 раза, затем помещали в бюксы с бидистиллированной водой (10 мл) и инкубировали 30 мин в термостате при температуре 50°C. С помощью кондуктометра Cond 7310 (WTW, Германия) в растворе инкубации измеряли электропроводность. Затем пробу кипятили в течение 30 и определяли полный выход электролитов. Выход электролитов рассчитывали по формуле

$$\text{Выход электролитов} = (C_1/C_2) \times 100\%,$$

где C_1 – электропроводность после инкубации в течении 30 мин при температуре 40°C;

C_2 – электропроводность после инкубации в течение 30 мин при кипячении.

Индекс мембранной стабильности рассчитывали по формуле

$$\text{Индекс мембранной стабильности} = (1 - C_1/C_2) \times 100\%.$$

2.6.3 Определение величины генерализационной поляризации возбуждения флуоресценции липофильного зонда лаурдана в мембранах микросомальной фракции растительных клеток

Корни (10 г) разрезали на фрагменты, затем размельчили в блендере с 20 мл буфера А и защитными реагентами (1г поливинилпирролидона и 0,0015г дитиотрийтола) + фенилметан сульфонил флуорид 1 мМ (2 мл из 100 мМ стока). Полученный гомогенат отфильтровали через нейлоновую сетку в стакан. Далее фильтрат центрифугировали 10 мин при 3 200 об/мин при 4 °С

(в заранее охлажденной центрифуге). Полученный супернатант повторно центрифугировали 20 мин при 11 500 об/мин при 4°C.

Осадок из центрифужной пробирки ресуспендировали в 6 мл буфера С и использовали для исследования. Его разделили на 3 части по 2 мл, добавили 20 мкл 1мМ раствора лаурдана и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте.

Измерение проводили на спектрофлуориметре ФЛЮОРАТ – 02 – ПАНОРАМА (Россия) при длине волны 360 нм.

Обобщенная поляризация возбуждения была получена из уравнения

$$ГП = (I_{430} - I_{490}) / (I_{430} + I_{490}),$$

где I_{430} и I_{490} являются интенсивностей излучения при 430 и 490 нм.

2.7 Статистическая обработка результатов

Опыты проводили в трех биологических повторностях для каждой из которых эксперименты выполняли трижды (3 аналитические повторности). Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась путем расчета стандартного отклонения с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Обоснование исследования

Растения играют важную роль в жизни человека. Наряду с тем, что флора является неотъемлемой частью биосферы и осуществляет уникальную фотосинтетическую функцию, растения имеют существенное прикладное значение в жизнедеятельности человека. Они дают человеку пищу, а также строительный материал, сырье для промышленности (смолу, масло, каучук, дубильные вещества, спирт и др.). Кроме того, растения обладают уникальными вторичными метаболитами, на основе которых производят разнообразные лекарственные средства.

Продуктивность сельскохозяйственных растений во многом зависит от климата и значительно снижается при неблагоприятных условиях. Большинство сельскохозяйственных культур испытывают серьезные угрозы от воздействия абиотических стрессоров, таких как засуха, засоление, экстремальные температуры, химическая токсичность, УФ-излучение и окислительный стресс. Например, при охлаждении (замораживании) мембраны растений выступают в роли своеобразной мишени, которые принимают удар на себя, и часто это приводит к их повреждению и разрушению растительной клетки в целом [41, 42]. На мембраны растительных клеток могут действовать не только физические факторы окружающей среды, но и различные химические соединения, которые относят к мембранотропным веществам.

Анализ литературных данных показал, что действие мембранотропных веществ на клетки растений мало изучено, в связи с чем проведение исследований в этой области является актуальным. В частности, перспективно определить влияние мембранотропных веществ на компонентный состав мембран и их характеристики, такие как текучесть и проницаемость. Полученные результаты будут иметь фундаментальное и

прикладное значение и на их основе могут быть разработаны рекомендации для растениеводства.

В настоящей работе в качестве объекта исследования была взята пшеница *Triticum aestivum* L. сорта Казанская юбилейная, которая является основной зерновой культурой, возделываемой в Республике Татарстан.

В качестве мембранотропных веществ были выбраны соединения, уплотняющие мембрану, такие как CaCl_2 (10^{-3} М) и β -ситостерин ($5 \cdot 10^{-4}$ М), а также вещества, которые проявляют противоположное воздействие на мембрану и значительно увеличивают ее проницаемость, – нистатин (10^{-4} М) и тритон X-100 ($1,6 \cdot 10^{-5}$ М).

В работе проростки пшеницы выращивали на питательных средах с добавлением различных мембранотропных веществ в течение 4 суток. При исследовании влияния на клеточные мембраны детергента – тритон X-100, для обработки уже брались выращенные корни пшеницы. К ним добавляли раствор детергента, тщательно перемешивали и оставляли на 3 часа для воздействия, после чего их отмывали и брали для анализа.

3.2 Исследование влияния мембранотропных веществ на проницаемость мембран клеток корней пшеницы

Важной характеристикой состояния мембран является индекс мембранной стабильности, который рассчитывается по выходу из тканей проростков электролитов. В таблице 3.1 приведены полученные результаты анализа этих показателей для клеток корней пшеницы при воздействии на них мембранотропных веществ в сравнении с контролем.

Известно, что хлорид кальция – классический мембранный стабилизатор. Ион Ca^{2+} связывается с мембранами и образует мостики между отрицательно заряженными группами двух соседних белковых молекул (а также липидов) мембран [43]. Кроме того, ион Ca^{2+} , связанный с отрицательно заряженной группой, способен отбирать воду, поэтому он

вызывает частичную дегидратацию мембран. Эти свойства ионов Ca^{2+} , согласно [44], являются факторами, стабилизирующими структуру мембраны. Полученные в работе результаты согласуются с литературными данными. Из клеток корней проростков пшеницы, выращенных на среде с хлоридом кальция в концентрации 10^{-3} М, выход электролитов по сравнению с контролем в 1,3 раза ниже, а индекс мембранной стабильности клеток корней пшеницы увеличился почти на 7,0 % (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Выход электролитов и индекс мембранной стабильности в корнях проростков пшеницы при действии различных мембранотропных веществ (n=3)

Объект исследования	Мембранотропное вещество	Выход электролитов, %	Индекс мембранной стабильности, %
Корни пшеницы	контроль	26,4±0,3	73,6
	хлорид кальция (10^{-3} М)	19,5±5,1	80,5
	β -ситостерин ($5 \cdot 10^{-4}$ М)	22,3±1,3	77,7
	нистатин (10^{-4} М)	24,8±2,1	75,2
	третон Х-100 ($1,6 \cdot 10^{-5}$ М)	54,5±10,7	45,5

Увеличение индекса мембранной стабильности на 4,7 % по сравнению с контролем наблюдается также для клеток корней пшеницы, выращенных на среде с β -ситостерином в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М. Известно, что β -ситостерин является одним из основных стероидов, содержащихся в плазматической мембране растительных клеток, и обладает способностью к их упорядочиванию, регулированию проницаемости и текучести [45].

Нистатин – мембранотропное вещество, которое нарушает структурную организацию мембран путем связывания со стеринами, входящих в их состав, и образования пор. В результате этого взаимодействия увеличивается ионная проницаемость мембран, происходит потеря клеткой воды, аминокислот и других компонентов [46; 47]. В работе [47] показано, что уже с первых минут действия нистатина на корни проростков пшеницы происходит резкое увеличение проницаемости мембран для электролитов и деполяризация плазматической мембраны. В нашем исследовании использована даже более высокая концентрация нистатина по сравнению с

[46], однако показано, что индекс мембранной стабильности в корнях пшеницы, выращенных на среде с нистатином, практически не отличается от контроля. В предыдущих работах [47, 48] исследование с нистатином проводилось на отсеченных корнях пшеницы в течение 1-6 ч, т.е. на фоне раневого стресса. В наших экспериментах действию нистатина подвергались интактные проростки пшеницы, которые выращивались на растворе нистатина в течение 4 суток. В связи с этим, можно предположить, что у интактных растений, адаптационный ресурс которых значительно выше, чем у отсеченного органа, происходит адаптация к действию нистатина. Возможно, происходит «залечивание» образовавшихся в первоначальный период нистатиновых пор [49] и восстановление исходной проницаемости клеточных мембран и индекса мембранной стабильности корней пшеницы.

Тритон X-100 (октилфенилполиэтиленгликольный эфир) – это неионный детергент, используемый для разрушения мембран. Механизм его действия основан на извлечении мембранных фосфолипидов и разрушении их комплексов с белками [50]. Показано, что из клеток корней проростков пшеницы вследствие их обработки тритоном X-100 выход электролитов увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем, и почти на 28 % снижается индекс мембранной стабильности (таблица 3.1). Из всех примененных мембранотропных веществ тритон X-100 оказал самое сильное воздействие на мембраны растительных клеток корней пшеницы.

3.3 Исследование липидного профиля в экстрактах из клеток корней пшеницы, выращенных при действии мембранотропных веществ

Из проростков корней, полученных, как и в контрольном, так и в опытных вариантах, извлекали сумму липидов по методу [38] с модификациями [39] и определяли их выход гравиметрическим методом (рисунок 3.1).

Установлено, что выход липидных веществ из контрольного образца – корней пшеницы, выращенных без воздействия мембранотропных веществ, составляет около 0,14 %. Из клеток корней пшеницы, выращенных в присутствии хлорида кальция, β -ситостерина и нистатина, выход липидов по сравнению с контролем незначительно возрастает, в среднем на 0,02 %. Наибольшее количество липидов было получено при экстракции клеток корней пшеницы, обработанных после выращивания детергентом – тритоном X-100 – около 0,6 %. Это почти в 4,5 раза выше, чем в контроле и других опытных образцах. Учитывая сильное повреждающее действие тритона X – 100 на мембраны, можно предположить, что в клетках начинается усиленный синтез липидов, необходимых для их восстановления, и поэтому содержание липидов в опытном образце выше, чем в других и в контроле. Другим возможным объяснением более высокого выхода липидов из клеток корней пшеницы, обработанных тритоном X – 100, является то, что детергент увеличивает доступность липидов к извлечению за счет их высвобождения из мембранных клеточных структур. Оба высказанных предположения требуют проверки и проведения новых экспериментов.

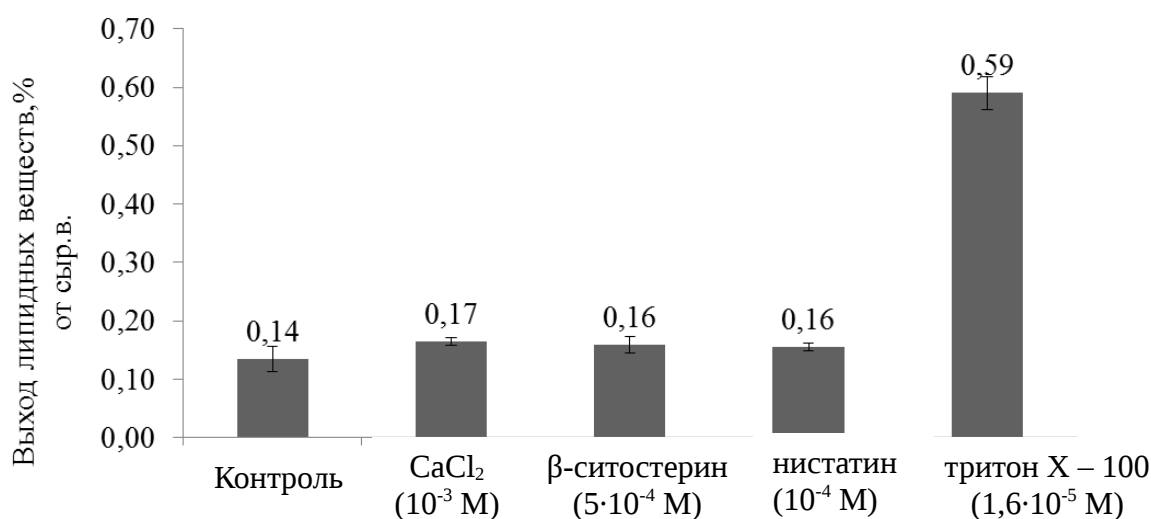


Рисунок 3.1 – Выход липидных веществ из корней пшеницы, выращенных на средах с добавлением мембранотропных веществ

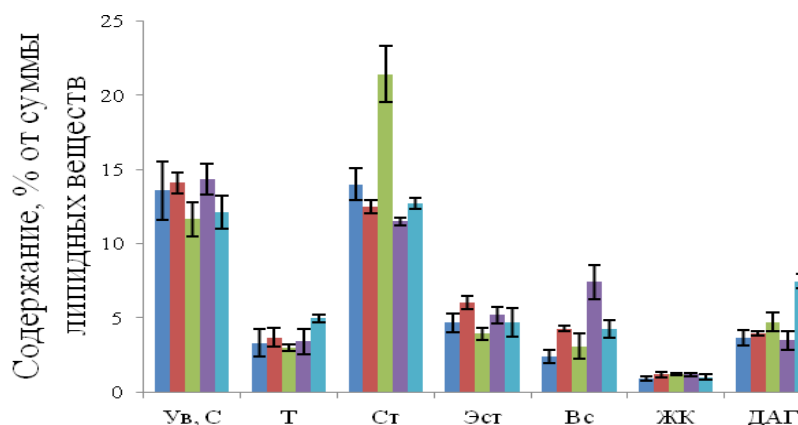
Для понимания тех изменений, которые происходят в клетках при воздействии мембранотропных веществ представляется целесообразным исследовать их липидный профиль. С этой целью в работе была применена тонкослойная хроматография, осуществляемая на оборудовании фирмы «САМАГ». В суммарных экстрактах липидов из контрольного и опытных образцов корней пшеницы анализировали состав нейтральных и полярных липидов с применением различных систем растворителей (п. 2.6.1). Для обнаружения разделенных на ТСХ пластинах липидов их обрабатывали неспецифическим проявителем – 5 % раствором серной кислоты в этаноле. На рисунке 2.1 и 2.2 приведен вид полученных ТСХ пластин анализа состава полярных и нейтральных липидов в исследуемых экстрактах в видимом свете после дериватизации. Отнесение обнаруженных липидных веществ в экстрактах осуществляли путем сопоставления их R_f с R_f веществ – стандартов ФХ, ГлЦер 1 и ГлЦер 2, стеринов (Ст), терпеноидов (Т), жирных кислот, триглицеридов (ТАГ), углеводов, включая сквален (Ув,С) и с литературными данными [21].

Количественное содержание обнаруженных липидов в экстрактах определяли денситометрией на приборе «TLS Scanner 4». Для расчета точного содержания отдельных липидов в исследуемых экстрактах из корней проростков пшеницы были использованы калибровочные графики, построенные по чистым веществам – стандартам (таблица 2.5).

На рисунках 3.2 и 3.3 представлены результаты количественного содержания нейтральных липидов, обнаруженных в исследуемых экстрактах.

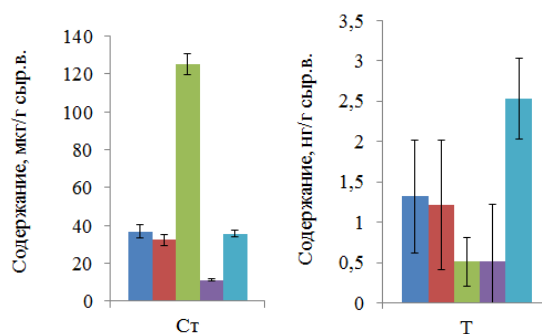
Показано что, они имеют разнообразный качественный состав и включают, как омыляемые (ацилглицериды, эфиры стеринов), так и неомыляемые липиды (стерины, терпеноиды, ЖК и др.). Во всех исследуемых экстрактах основными липидами являются стерины и углеводороды, включая сквален, занимающие около 12 % от суммы липидных веществ. Содержание ацилглицеридов (ТАГ и ДАГ), являющихся основными запасными липидами, составляет в среднем 10-16 %, тогда как на долю ЖК

приходится не более 1 %. Содержание остальных обнаруженных нейтральных липидов в исследуемых экстрактах значительно ниже (рисунок 3.2).



контроль ■ CaCl₂ ■ 0-3 М) β-ситостерин (5·10⁻⁴ М) ■ нистатин (10⁻⁴ М) ■ тритон X - 100 (1,6 ·10⁻⁵ М)

Рисунок 3.2 – Содержание нейтральных липидов в экстрактах из корней проростков пшеницы, выращенных при действии мембранотропных веществ



контроль ■ CaCl₂ ■ 10-3 М) β-ситостерин (5·10⁻⁴ М) ■ нистатин (10⁻⁴ М) ■ тритон X - 100 (1,6 ·10⁻⁵ М)

Рисунок 3.3 – Количество отдельных групп нейтральных липидов в экстрактах из корней проростков пшеницы, выращенных при действии мембранотропных веществ

Анализируя действие мембранотропных веществ на липидный профиль клеток корней пшеницы стоит отметить, что при их выращивании на среде с β-ситостерином, по сравнению с контролем в 3,4 раза увеличивается содержание стерина (рисунок 3.3). Это указывает на то, что растительные

клетки способны использовать β -ситостерин из питательной среды, для образования клеточных мембран, и за счет этого повышается их стабильность по сравнению с контролем (таблица 3.1).

В экстракте из корней пшеницы, выращенных на среде с нистатином, наоборот наблюдается резкое снижение количества стерина, в 3,3 раза по сравнению с контролем и другими опытными объектами. Учитывая, что нистатин специфически связывается со стеринами, входящими в состав клеточных мембран, вследствие чего нарушается их структурная организация, за счет чего происходит сокращение доли стерина в составе клеточных мембран.

При воздействии на клетки корней другим мембранотропом – тритоном X-100, который показал самое сильное повреждающее действие на клеточные мембраны (таблица 3.1), в липидном профиле также наблюдаются изменения по сравнению с контролем. Установлено, что в их составе увеличивается в 2 раза количество терпеноидов. Это подтверждает высказанное ранее предположение о том, что в клетках, обработанных тритоном X – 100, начинается усиленный синтез липидов для восстановления поврежденных мембран и сохранения жизнеспособности растения. Известно, что терпеноиды являются предшественниками в биосинтезе стерина, выполняющих как структурную, так и регуляторные функции в клетках [51] (рисунок 3.4).

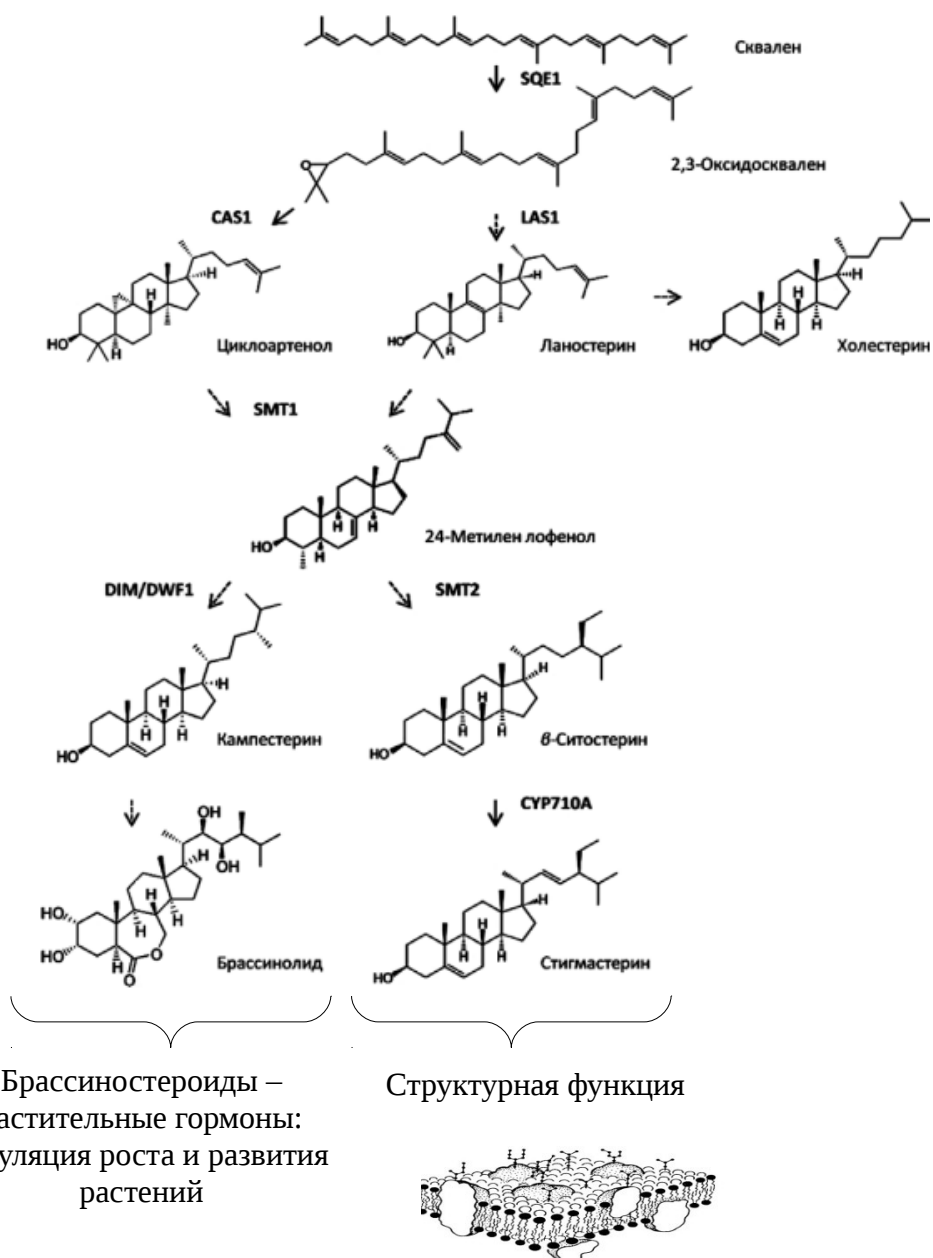
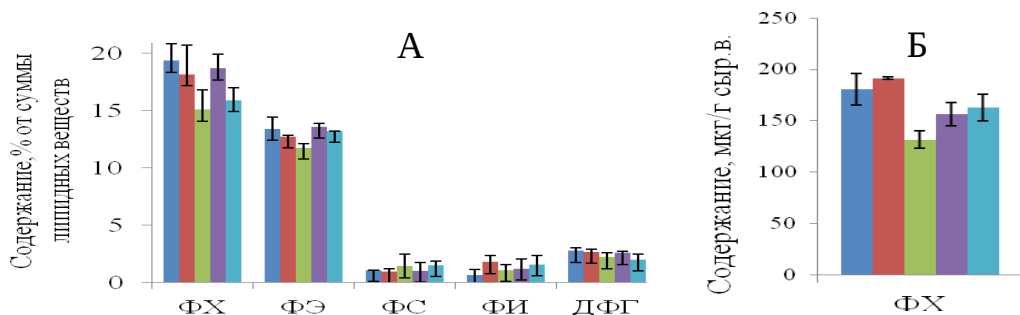


Рисунок 3.4 – Схема биосинтеза стерина у растений, их биологическая роль [51]

На рисунках 3.5 и 3.8 представлены результаты количественного определения, полярных липидов обнаруженных в исследуемых экстрактах.

Установлено, что состав фосфолипидов, обнаруженных во всех исследуемых экстрактах, представлен различными соединениями. Среди них наибольшее количество (около 19 и 13 %, соответственно) приходится на ФХ и ФЭ.



контроль ■ CaCl₂ 10⁻³ M ■ β-ситостерин (5•10⁻⁴ M) ■ нистатин (10⁻⁴ M) ■ третон X-100 (1,6•10⁻⁵ M)

Рисунок 3.5 – Содержание фосфолипидов в экстрактах из корней проростков пшеницы, выращенных при действии мембранотропных веществ: А – содержание по денситограмме (по площади пиков); Б – количество ФХ, рассчитанное по калибровочному графику

Эти соединения являются главными липидными компонентами в клетках высших растений и метаболически связаны друг с другом (рисунок 3.6) [52]. Предшественником их синтеза является фосфатидилсерин, содержание которого в исследуемых экстрактах почти в 13-16 раз ниже, по сравнению с ФХ и ФЭ.

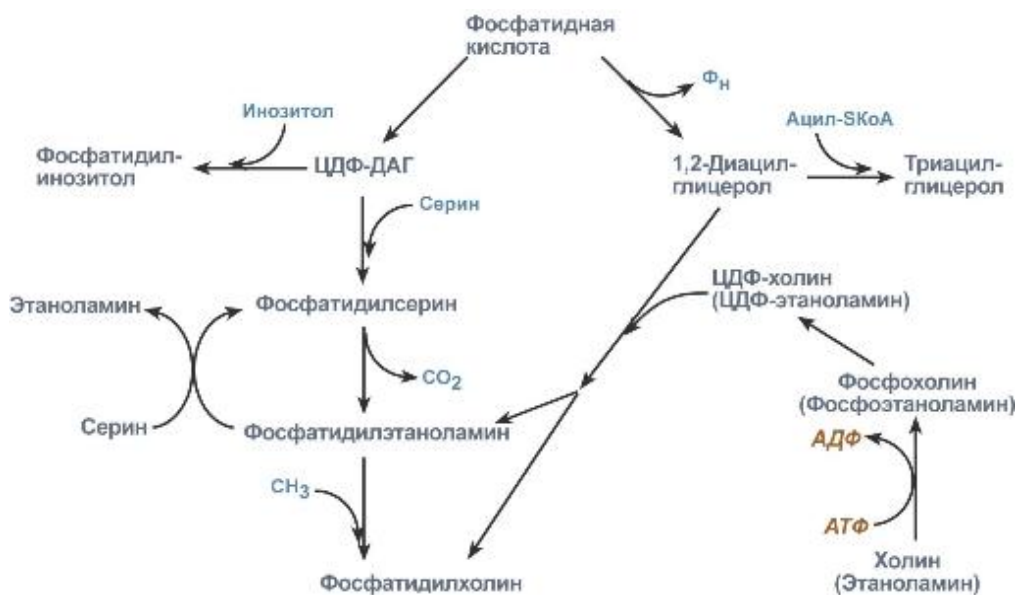


Рисунок 3.6 – Пути биосинтеза важнейших фосфолипидов [52]

Как видно на рисунке 3.5 А, в корнях пшеницы при воздействии мембранных веществ, за исключением хлорида кальция, по сравнению с контролем снижается содержание ФХ. Наименьшее его содержание $131,62 \pm 8,5$ мкг/г сыр. веса отмечено в экстракте из корней пшеницы, выращенных при действии β -ситостерина (рисунок 3.5 Б). Именно в этом экстракте в отличие от остальных опытных образцов увеличивается почти в 3,4 раза доля стерина в липидном профиле. Очевидно, что выявленные изменения в липидном составе корней пшеницы взаимосвязаны между собой. По – видимому, дополнительное встраивание стерина в клетки мембраны происходит путем замещения структур фосфолипида – ФХ в пропорции 2,4 : 1,0.

Определение количества ФИ, являющегося основным компонентом митохондриальных мембран, позволило установить в исследуемых экстрактах, что в корнях пшеницы при воздействии всех применяемых мембранотропных веществ, его содержание увеличивается в 1,7 – 2,9 раза. Это свидетельствует о том, что в растительных клетках в ответе на стресс при воздействии мембранотропных веществ значительную роль берут на себя митохондрии. Об этом также свидетельствуют изменения содержания в экстрактах из опытных образцов другого фосфолипида – дифосфатидилглицерин (ДФГ), входящего в митохондриальные мембраны и играющего важную роль в переносе электронов и окислительном фосфорилировании в митохондриях [52]. Известно, что в фосфатидилинозитидном каскаде при фосфорилировании фосфотидилинозита в мембране образуется фосфатидилинозит – 4,5 – дифосфат. Далее это соединение расщепляется мембрано-связанным ферментом фосфолипазой С на инозиттрифосфат и диацилглицерин (ДАГ) (рисунок 3.7). ДАГ является физиологическим активатором особой протеинкиназы С (связана с молекулой ФС расположенной на цитозольной стороне клеточной мембраны), которая участвует в регуляции многочисленных клеточных процессов, фосфорилируя различные белки –

мишени и некоторые факторы роста, следовательно, обеспечивает клеточные ответы [53].

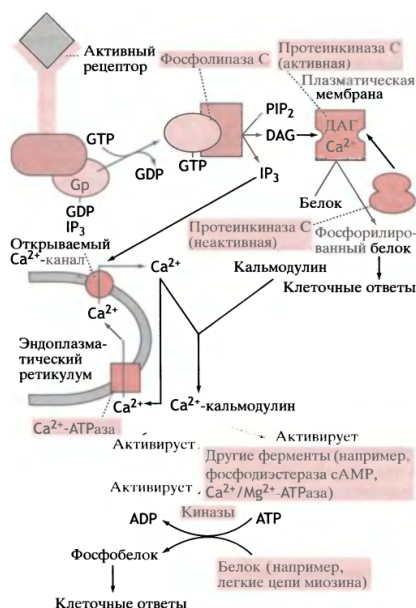
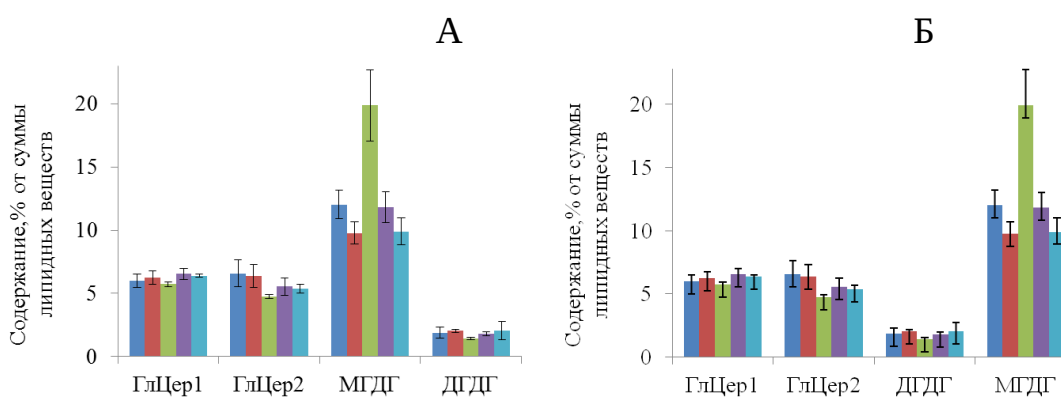


Рисунок 3.7 – Фосфатидилинозитидный каскад: взаимосвязь DAG, инозиттрифосфата и Ca^{2+} в качестве вторичных посредников: ADP – аденозиндифосфат, ATP – аденозинтрифосфат, GDP – гуанозиндифосфат, GTP – гуанозинтрифосфат, PIP_2 – фосфатидилинозит – 4,5 – дифосфат, DAG – диацилглицерид, IP_3 – инозиттрифосфат [53]



контрол ■ $CaCl_2$ (10⁻³ M) ■ β-итостерин (5•10⁻⁴ M) ■ нистатин (10⁻⁴ M) ■ тритон X - 100 (1,6 • 10⁻⁵ M)

Рисунок 3.8 – Содержание гликолипидов в экстрактах из корней проростков пшеницы, выращенных при действии мембранотропных веществ: А – содержание по денситограмме (по площади пиков); Б – количество ГлЦер 1 и 2, рассчитанное по калибровочному графику

Среди гликолипидов, идентифицированных в исследуемых экстрактах, обнаружены гликоцерамиды двух типов (рисунок 3.9), моногалактозилдиацилглицерид (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицерид (ДГДГ) (рисунок 3.8 А). Известно, что эти соединения являются важными мембранными липидными компонентами в растениях. Хотя они не считаются основными компонентами непластидных мембран, изменения в их содержании часто наблюдаются в условиях стресса, что свидетельствует об их важной роли в приобретении толерантности к стрессам у растений [54].

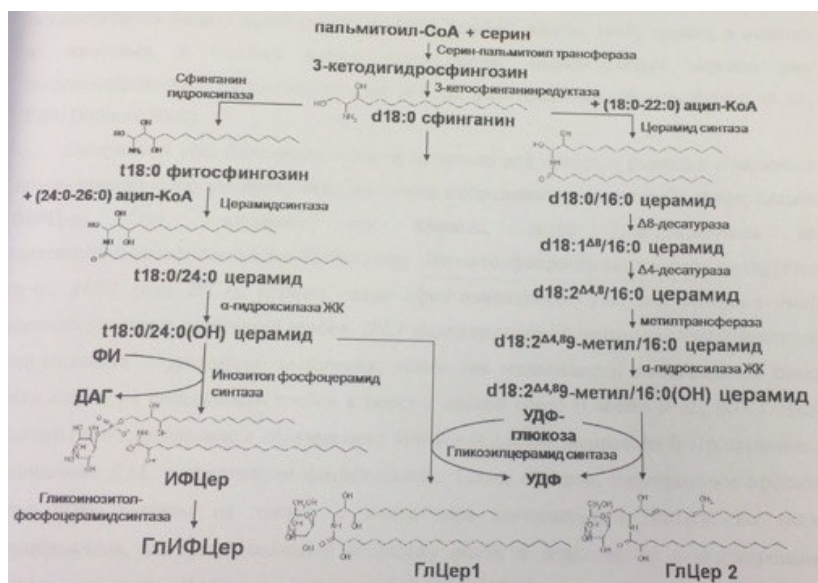


Рисунок 3.9 – Путь синтеза сложных гликолипидов [55]

Анализ гликолипидов в исследуемых экстрактах из опытных образцов корней по сравнению с контролем показал, что например, при воздействии β -ситостерина на корни пшеницы в липидном профиле их содержание существенно изменяется – почти в 2,0 раза увеличивается содержание МГДГ и одновременно с этим в 2,0 раза снижается доля ГлЦер 1 и ГлЦер 2 (рисунок 3.9 Б) по сравнению с контролем. Стоит отметить, что все выявленные изменения в липидном профиле этого опытного образца не влияют на стабильность мембран клеток (таблица 3.1). Также снижение доли ГлЦер 1 и ГлЦер 2 наблюдается в экстракте из корней пшеницы, выращенных при воздействии нистатина, и можно предположить, что это связано с протекающим процессом адаптации растения к этому мембранотропу.

3.4 Исследование влияния мембранотропных веществ на характеристики мембран клеток корней пшеницы

В работе было исследовано фазовое состояние мембран микросомальной фракции клеток корней пшеницы. Выделяли микросомальную фракцию по методике, описанной в пункте 2.6.3, и проводили оценку текучести мембран. Текучесть отражает уровень организации липидов в бислое [56]. На сегодняшний день существуют различные современные методы исследования мембранной текучести. Флуоресцентный метод позволяет с помощью спиновых меток и флуоресцентных зондов оценить упаковку липидов в мембране. В нашей работе использовался флуоресцентный липофильный зонд лаурдан. Его флуоресценция в разных частях спектра позволяет выявить изменения в упорядоченности фосфолипидов в мембране, которая зависит от физического состояния липидного бислоя [57]. По изменению интенсивности излучения флуоресценции лаурдана проводят расчет важного показателя – генерализованная поляризация, по которому оценивают текучесть мембран.

По данным литературы следует, что значение генерализованной поляризации колеблется в пределах от «-1» до «+1». «-1» означает, водную фазу, тогда как значение ГП «+1» означает полностью упорядоченную фазу. Экспериментально эти значения зависят от липидного состава мембран, температуры окружающей среды и прочих факторов [33].

В результате проведенных нами исследований в таблице 3.2 показано, что действие хлорида кальция и β -ситостерина приводит к повышению значения ГП в 1,2 – 1,3 раза. Это может свидетельствовать об упорядочивании мембран. При действии тритона X-100, на клетки корней проростков пшеницы наблюдался обратный эффект, значения ГП снижались. Это говорит о том, что мембрана становится менее упорядоченной. Значение ГП при воздействии нистатина практически не изменяется по сравнению с контролем. Данные результаты согласуются с нашими результатами

экспериментов по анализу выхода электролитов из клеток и индекса мембранной стабильности (таблица 3.1).

Таблица 3.2 – Изменение фазового состояния клеток корней пшеницы, выращенных при воздействии различных мембранотропных веществ, (n=3)

Воздействие на корни	ГП
контроль	0,16±0,01
хлорид кальция (10^{-3} М)	0,19±0,01
β -ситостерин ($5 \cdot 10^{-4}$ М)	0,21±0,03
нистатин (10^{-4} М)	0,14±0,05
третон Х-100 ($1,6 \cdot 10^{-5}$ М)	0,11±0,01

ВЫВОДЫ

1) Установлено, что при воздействии хлорида кальция в липидном составе клеток корней пшеницы изменений не происходит, при этом увеличивается индекс мембранной стабильности на 7 %, по величине генерализованной поляризации, полученной спектральным методом с флуоресцентным зондом, мембраны (в 1,2 раза) становятся более упорядоченными;

2) Показано, что при действии β -ситостерина в клетках корней пшеницы происходит увеличение мембранной стабильности на 4,7 % и упорядоченности липидного бислоя, что очевидно связано с обнаруженными изменениями в их липидном составе содержания следующих соединений – увеличением стерина и моногалактозилдиацилглицерида (в 3,4 и 2 раза соответственно) и снижением фосфатидилхолина и гликоцерамидов (1,4 и 2 соответственно);

3) Выявлено, что в клетках корней пшеницы при выращивании на растворе нистатина в течении 4 суток не происходит снижения мембранной стабильности и упорядоченности мембран, что свидетельствует о более высоком адаптационном ресурсе растений к дестабилизирующему действию примененного мембранотропного соединения, в частности за счет уменьшения в липидном профиле количества стерина (в 3,3 раза);

4) При обработке корней пшеницы тритоном X – 100 наблюдается сильное повреждение клеточных мембран – увеличивается выход электролитов в 2 раза, и почти на 28 % снижается индекс мембранной стабильности. Это воздействие вызывает у растений стрессовый ответ. Показано, что происходит увеличение доли терпеноидов в сумме липидов, которые являются предшественниками биосинтеза стерина, выполняющих в растениях регуляторную и структурную функции.

Список использованной литературы

1. Mazur, P. Freezing injury in plants / P. Mazur // *Ann. Rev. Plant Physiol.* -1969. - V. 20. - P. 419-448.
2. Dubey, R.S. Photosynthesis in plants under stressful conditions / R.S. Dubey // Ed. M. Pessarakli. - New York: Marcel Dekker Inc., 1997. - P. 859 – 875.
3. Рис, Э. Введение в молекулярную биологию. От клеток к атомам : [пер. с англ] / Э. Рис, М. Стернберг. – М.: Мир, 2002. – 142с. – Перевод изд: From cells to atoms an illustrated introduction to molecular biology / Anthony R. Rees, Michael J. E. Sternberg. – London : by Blackwell Scientific Publications, 1984.
4. Banfalvi, G. Permeability of biological membranes / G. Banfalvi. – Springer, 2016. – 263 p.
5. Holthuis, J.C.M. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis / J.C.M. Holthuis, A.K. Menon // *Nature*. – 2014. – V.510. – pp 48–57.
6. Lynch, D.V. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function / D.V. Lynch, T.M. Dunn // *New Phytol.* - 2004. - V.161. - P. 677–702.
7. [Sena, F.](#) Spectral phasor analysis reveals altered membrane order and function of root hair cells in *Arabidopsis dry2/sqe1-5* drought hypersensitive mutant / F. [Sena](#) , M. [Sotelo-Silveira](#) , S. [Astrada](#) , M.A. [Botella](#) , L. [Malacrida](#) , O. [Borsani](#) // *Plant Physiol Biochem.* – 2017. – V. 119. – pp 224–231.
8. Martin, S. W. Lipid microdomains - plant membranes get organized / S. W. Martin, B. J. Glover, J. M. Davies, // *Trends Plant Sci.* – 2005. – V.10. – P. 263–265.
9. Bhat, R.A. Lipid rafts in plants / R.A. Bhat, R. Panstruga // *Planta* – 2005. – V. 223. – P. 5–19.
10. Jacobson, K. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics / K. Jacobson, O.G. Mouritsen, R.G. Anderson // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – V. 9. – P. 7–14.
11. Fielding, C.J. Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction / C. J. Fielding, P. E. Fielding // *Biochem. Soc. Trans.* – 2004. –V.32. – P.65–69.
12. Grosjean, K. Differential effect of plant lipids on membrane organization: Specificities of phytosphingolipids and phytosterols / K. Grosjean, S. Mongrand,

L. Beney, F. Simon-Plas, P. Gerbeau-Pissot // J. Biol. Chem. – 2015. – V. 290. – pp 5810–5825.

13. Ando, J. Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by raman microscopy / J. Ando, M. Kinoshita, J. Cui, H. Yamakoshi, K. Dodo, K. Fujita, M. Murata, M. Sodeoka // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – V. 112. – pp 4558–4563.

14. Pike, L.J. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover / L. J. Pike and J. M. Miller // J. Biol. Chem. - 1998. - V. 273. – P. 22298–22304.

15. [Burkart](#), R. Dynamic complexity: plant receptor complexes at the plasma membrane / [R. Burkart](#), Y. Stahl // Current Opinion in Plant Biology. – 2017. – V. 40. – .pp 15–21.

16. Schapire, A. Plasma membrane repair in plants / A. Schapire, V. Valpuesta, M. Botella // Plant Science. – 2009. – V.14. – pp 645–652.

17. Volkov, A. Cold plasma interactions with plants: Morphing and movements of Venus flytrap and *Mimosa pudica* induced by argon plasma jet / A. Volkov, K. Xu, V. Kolobovc // Bioelectrochemistry. – 2017. – V. 118. – pp 100–105.

18. Baloyi, N. Proteomic analysis of Arabidopsis plasma membranes reveals lipopolysaccharide-responsive changes /N. Baloyi, A. Dubery, A. Piater // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2017. – V. 486. – pp 1137–1142.

19. Валитова, Ю.Н. Связывание стероидов влияет на функционирование мембран и состав сфинголипидов в корнях пшеницы / Ю.Н. Валитова, Е.Р. Котлова, А.В. Новиков, А.Л. Шаварда, К.А. Артеменко, Р.А. Зубарев, Ф.В. Минибаева // Биохимия. – 2010. – Т. 75(5). – С. 644 – 653.

20. Valitova, J.N. Effects of sterol-binding agent nystatin on wheat roots: The changes in membrane permeability, sterols and glycosceramides / J.N. Valitova, F.V. Minibayeva, E.R. Kotlova, A.V. Novikov, A.L. Shavarda, L.I. Murtazina, I.S. Ryzhkina // Phytochemistry. – 2011. – V. 72(14-15). – P. 1751–1759.

21. Valitova, J. Sterol binding by methyl- β -cyclodextrin and nystatin - comparative analysis of biochemical and physiological consequences for plants / J. Valitova, A. Sulkarnayeva, E. Kotlova, A. Ponomareva, F. Mukhitova, L.

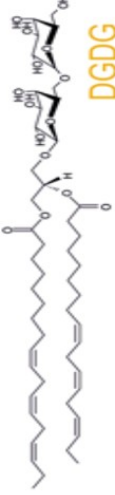
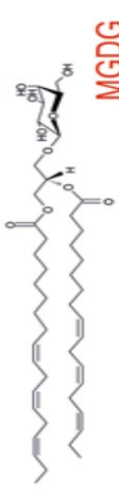
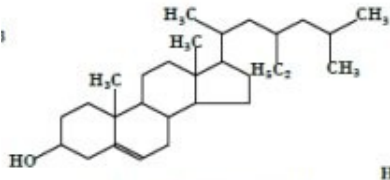
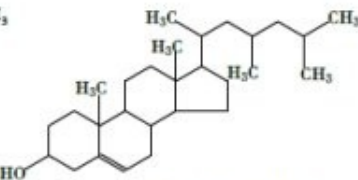
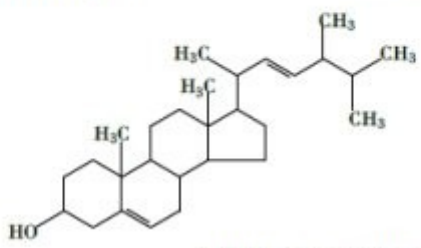
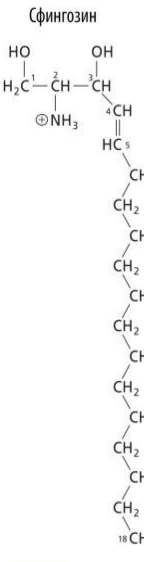
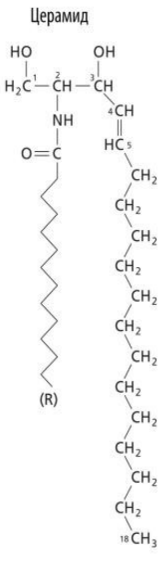
- Murtazina, I. Ryzhkina, R. Beckett, F. Minibayeva // FEBS J. – 2014. – V. 281(8). – P. 2051–2060.
22. Сулкарнаева, А.Г. Стрессиндуцированные изменения мембранных стероидов в корнях пшеницы / А. Г. Сулкарнаева, Ю. Н. Валитова, Ф. К. Мухитова, Ф. В. Минибаева // Доклады академии наук. – 2014. – Т. 455, № 2. – С. 229–231.
23. http://old.pskgu.ru/ebooks/revinbio/revinbio_2_21.pdf
24. Carde, J. Electron Microscopy of Plant Cell Membranes / J. Carde // Methods in Enzymology. – 1987. – V. 148. – pp 599–622.
25. [Kobayashi](#), S. Confocal cryomicroscopic analysis and cryodynamics of endoplasmic reticulum in herbaceous plant cells / [S. Kobayashi](#), [N. Kutsuna](#), [K. Tanino](#), [Y. Kawamura](#) // Environmental and Experimental Botany. – 2014. – V. 106. – pp 44– 51.
26. Pabst, G. Applications of neutron and X-ray scattering to the study of biologically relevant model membranes / G. Pabst, N. Kucerka, M.-P. Nieh, M.C. Rheinstädter, J. Katsaras // Chemistry and Physics of Lipids. – 2010. – V. 163. – pp 460–479.
27. Bonaventura, G. Laurdan monitors different lipids content in eukaryotic membrane during embryonic neural development. C/ G. Bonaventura, M.L. Barcellona, O. Golfetto, J.L. Nourse, L.A. Flanagan, E. Gratton. // *ell biochemistry and biophysics*. – 2014. – V. 70(2). – pp 785–94.
28. Golfetto, O. Laurdan fluorescence lifetime discriminates cholesterol content from changes in fluidity in living cell membranes // O. Golfetto, E. Hinde, E. Gratton // *Biophysical journal*. – 2013. – V. 104(6). – pp 1238–47.
29. Литвин, Ф.Ф. Молекулярная спектроскопия: основы теории и практика. Учеб. пособие / Ф.Ф. Литвин, В.Т. Дубровский, Р.А. Хатыпов, К.В. Неверов, Т.Н. Калабухов, Г.В. Микулинская, Л.Я. Сатина. – М.: ИНФРА – М, 2016. – 263 с. – ISBN 978 – 5 – 16 – 005727 – 9.
30. Sanchez, S.A. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo / S. A. Sanchez, M. A. Triccerri, E. Gratton // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109. – pp 7314–7319.

- 31.** Jay, A. Disorder Amidst Membrane Order: Standardizing Laurdan Generalized Polarization and Membrane Fluidity Terms / A. Jay, J. Hamilton // *J Fluoresc.* – 2017. – V. 27. – pp 243–249.
- 32.** Jurkiewicz, P. Lipid hydration and mobility: an interplay between fluorescence solvent relaxation experiments and molecular dynamics simulations / P. Jurkiewicz, L. Cwiklik, P. Jungwirth, M. Hof // *Biochimie.* – 2012. – V. 94. – pp 26–32
- 33.** Sanchez, S.A. Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope / S. A. Sanchez, M.A. Tricerri, G. Gunther, E. Gratton // *FORMATEX.* – 2007. – pp. 1007 – 1014.
- 34.** Dietrich, C. Lipid rafts reconstituted in model membranes / C. Dietrich, L. Bagatolli, Z. Volovyk, N. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton // *Biophys J.* – 2001. – V. 80. – pp 1417–1428.
- 35.** Нестеркина, И.С. Выявление липид-белковых микродоменов (рафтов) на вакуолярной мембране : автореферат диссертации ... кандидата биологических наук : 03.01.05 / Нестеркина Ирина Сергеевна. – Иркутск., 2011. – 104 с.
- 36.** Нурминского, В.Н. Особенности структуры вакуоли растительной клетки, выявленные с помощью конфокальной микроскопии / В.Н. Нурминский, А.Л. Ракевич, Е.Ф. Мартынович, Н.В. Озолина, И.С. Нестеркина, Е.В. Колесникова, А.А. Пилипченко, Р.К. Саляев, М.Ю. Чернышов // *Цитология.* – 2015. – Т. 57(6). – С. 443–451.
- 37.** Белугин, Б.В. Значение латеральной гетерогенности РІР-аквапоринов для транспорта воды через плазмалемму растительных клеток : автореферат диссертации ... кандидата биологических наук : 03.01.05 / Белугин Борис Владимирович. – Москва., 2011. – 111 с.
- 38.** Nichols, B.W. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: improvements in analysis by thin-layer chromatography / B.W. Nichols // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1963. – V. 70. – P. 417–422.
- 39.** Kotlova, E.R. Alterations in the composition of membrane glycerol- and sphingolipids in the course of *Flammulina velutipes* surface culture development / E.R. Kotlova, S.V. Senik // *Microbiology.* – 2009. – V. 78. – P. 193–201.

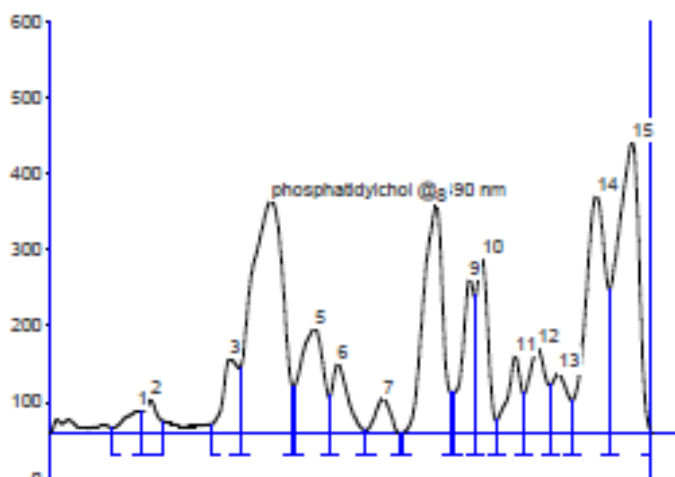
40. Кейтс, М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М.: Изд-во Мир, 1975. – 322 с.
41. Shi, H. [Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass \[Cynodactylon \(L\). Pers.\] by exogenous melatonin/ H. Shi, C. Jiang, T. Ye, D.X. Tan, R.J. Reiter, H. Zhang, R. Liu, Z. Chen // J. Exp. Bot. – 2015. – V. 66. – pp 681–694.](#)
42. Минибаева, Ф.В. Электрогенез и дыхательный газообмен корней пшеницы при различном кальциевом и стероидном статусе : автореферат диссертации ... кандидата биологических наук : 03.00.12 / Минибаева Фарида Вилевна. – Казань., 1990. – 23 с.
43. Forstner, J. Calcium – binding sites in human erythrocyte ghosts / J. Forstner, J. Manery // *Feb. Proc.* – 1970. – V. 29. – p. 664.
44. Левин, С.В. Структурные изменения клеточных мембран / С.В. Левин. – Л.: Наука ЛО, 1976. – 224 с.
45. Marsan, M. Ability of clionasterol and poriferasterol (24-epimers of sitosterol and stigmasterol) to regulate membrane lipid dynamics / M. Marsan, I. Muller, A. Milon // *Chemistry and Physics of Lipids.* – 1996. – V. 84. – pp 117 – 121.
46. Coutinho, A. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation / A. Coutinho, L. Silva, A. Fedorov, M. Prieto // *Biophys J.* – 2004. – V. 87. – pp. 3264–3276.
47. Гордон, Л.Х. Энергетический обмен клеток корней пшеницы при модификации ионной проницаемости плазмалеммы каналоформером нистатином / Л.Х. Гордон, Ю.Н. Валитова, Т.И. Огородникова, Д.Ф. Рахматуллина, А.Ю. Алябьев, Н.Л. Лосева, А.Н. Ценцевичский, Н.Ф. Рубан // *Цитология.* – 2005. – Т. 7(12). – С. 1088–1094.
48. Сулкарнаева, А. Г. Состав стероидов и активность генов С24-стерин метилтрансферазы *Triticum aestivum* при стрессе : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.01.05 / Сулкарнаева Альбина Гарифулловна. – Казань., 2016. – 24 с.
49. Васильев, Ю.М. Клеточная поверхность и реакция клеток / Ю.М. Васильев, А.Г. Маленков – Л. : Медицина, 1968. – 291 с.

50. https://genetics_dictionary.academic.ru/5005/%D0%A2%D1%80%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%BD
51. Валитова, Ю. Н. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции / Ю. Н. Валитова, А. Г. Сулкарнаева, Ф. В. Минибаева // Биохимия. – 2016. – Т. 81. – С. 1050 – 1068.
52. Ленинджер, А. Биохимия / А. Ленинджер. – М.: Изд-во Мир, 1974. – 957 с.
53. Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М. : МАИК «Наука/Интерпериодика», 2002. – 446 с. – ISBN 5 – 7846 – 0036 – 2.
54. Zhang, M. Regulation of galactolipid biosynthesis by over expression of the rice *mgd* gene contributes to enhanced aluminum tolerance in tobacco / M. Zhang, X. Deng, L. Yin, L. Qi, X. Wang, S. Wang, H. Li // Front Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 337.
55. Baretto – Bergter, E. Structure and biological functions of fungal cerebrosides / E. Baretto – Bergter, M. R. Pinto, M. L. Rodrigues // Annals of the Brazilian Academy of Sciences. – 2004. – V. 76, № 1. – P. 67 – 84.
56. Gerbeau-Pissot, P. Modification of Plasma Membrane Organization in Tobacco Cells Elicited by Cryptogein / P. Gerbeau-Pissot, C. Der, T. Dominique, I. Anca, K. Grosjean, Y. Roche, J. Perrier-Cornet, S. Mongrand, F. Plas // Plant Physiology. – 2014. – V. 164. – P. 273 – 286.
57. Bagatolli, L. Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence / L. Bagatolli, , E. Gratton, , G. Fidelio // Biophys. J. - 1998. - V. 75. - P. 331-341.

Химическая структура основных липидов, найденных в корнях пшеницы

Фосфолипиды	Гликолипиды
<p>Фосфатидная кислота</p> $\begin{array}{c} \text{O} & \text{O} \\ \parallel & \parallel \\ \text{R}_2-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} & \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\ & \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- & \\ & \\ \text{O}^- & \end{array}$ <p>Фосфатидилхолин</p> $\begin{array}{c} \text{O} & \text{O} \\ \parallel & \parallel \\ \text{R}_2-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} & \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\ & \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- & \text{O}^- \\ & \\ \text{O}^- & \text{O}^- \end{array} \begin{array}{l} \text{Остаток холина} \\ \text{O}^- \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \end{array}$ <p>Фосфатидилэтанолламин</p> $\begin{array}{c} \text{O} & \text{O} \\ \parallel & \parallel \\ \text{R}_2-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} & \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\ & \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- & \\ & \\ \text{O}^- & \end{array} \begin{array}{l} \text{Остаток серина} \\ \text{O}^- \\ \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)(\text{NH}_2) \end{array}$ <p>Фосфатидилсерин</p> $\begin{array}{c} \text{O} & \text{O} \\ \parallel & \parallel \\ \text{R}_2-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} & \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\ & \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- & \text{O}^- \\ & \\ \text{O}^- & \text{O}^- \end{array} \begin{array}{l} \text{Остаток серина} \\ \text{O}^- \\ \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)(\text{NH}_2) \end{array}$	<p>DGDG</p>  <p>MGDG</p> 
<p>Стерины</p> <p>β – ситостерин</p>  <p>кампестерин</p>  <p>стигмастерин</p> 	<p>Сфинголипиды</p> <p>Сфингозин</p>  <p>Церамид</p> 

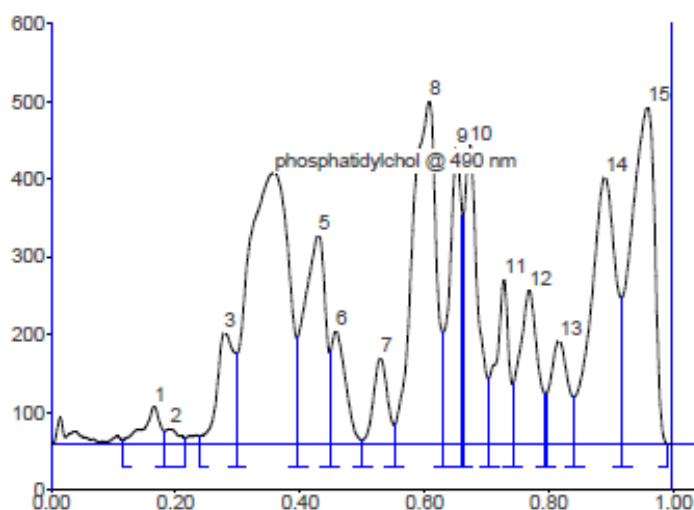
Трек 1. Rc₁



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height
Peak deleted by operator							
Peak deleted by operator							
1	0.11	5.9	0.15	29.4	1.19	0.16	28.0
2m	0.16	28.1	0.17	43.2	1.76	0.20	15.0
3m	0.28	10.5	0.31	97.1	3.94	0.33	85.1
4	0.33	85.9	0.38	304.7	12.38	0.42	59.1
5	0.42	59.7	0.45	137.4	5.58	0.48	46.4
6	0.48	47.6	0.49	90.5	3.68	0.54	2.8
7	0.54	2.9	0.57	45.2	1.84	0.60	0.0
8	0.60	0.0	0.66	298.0	12.11	0.69	51.2
9	0.69	51.5	0.72	202.2	8.21	0.73	178.1
10	0.73	180.7	0.74	229.6	9.33	0.76	15.6
11	0.76	16.2	0.80	100.9	4.10	0.81	50.6
12	0.81	51.6	0.83	112.1	4.55	0.85	62.3
13	0.86	62.7	0.87	77.9	3.16	0.89	42.5
14	0.89	42.5	0.93	311.7	12.66	0.96	187.9
15m	0.96	188.8	0.99	382.0	15.52	1.03	2.7

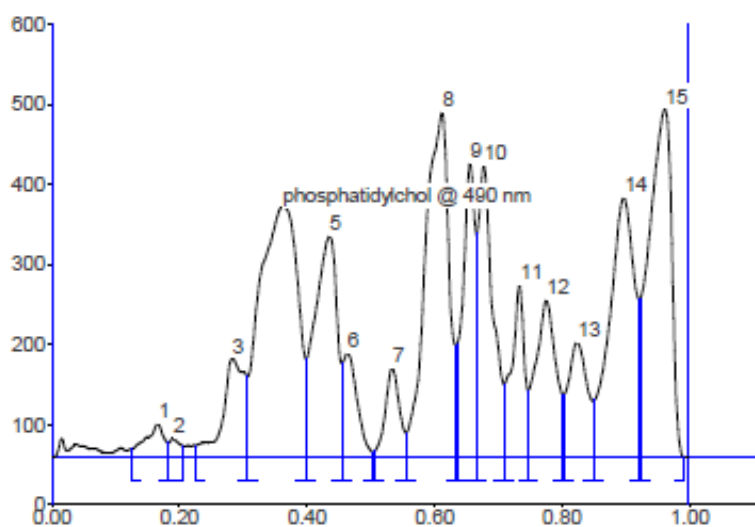
ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА ПОЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ ОТ 1.12.17 (20171201_КТВВ_РЛ.ска) Приложение 2

Трек 7. Rc₂



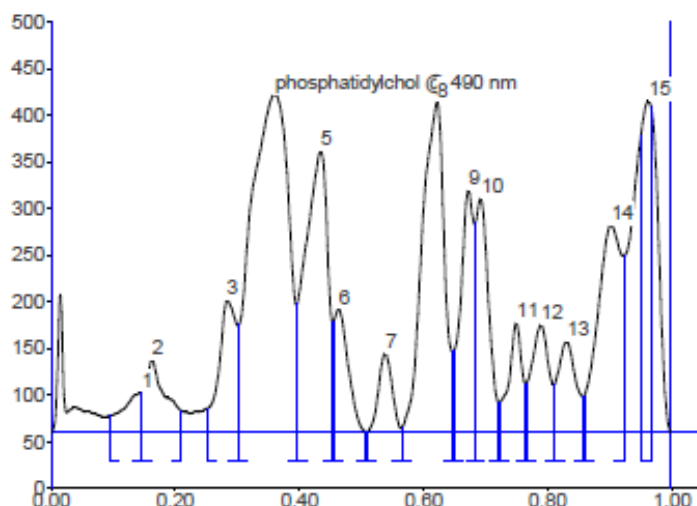
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height
Peak deleted by operator							
Peak deleted by operator							
1m	0.12	6.2	0.17	48.8	1.35	0.19	16.6
2	0.19	16.6	0.20	19.6	0.54	0.22	8.2
3	0.25	11.0	0.29	143.9	3.98	0.31	116.5
4	0.31	116.9	0.37	349.3	9.66	0.41	136.3
5	0.41	137.8	0.44	269.3	7.44	0.46	117.1
6	0.46	119.3	0.47	146.2	4.04	0.51	4.6
7	0.52	4.8	0.55	110.5	3.05	0.57	24.3
8	0.57	25.7	0.63	442.1	12.22	0.65	143.9
9	0.65	144.6	0.67	381.3	10.54	0.68	293.2
10	0.68	294.0	0.69	384.3	10.62	0.72	83.7
11	0.73	85.8	0.75	212.6	5.88	0.76	76.3
12	0.77	78.3	0.79	198.3	5.48	0.82	64.2
13	0.82	64.7	0.84	133.3	3.68	0.87	60.1
14	0.87	60.7	0.92	343.9	9.51	0.94	188.4
15	0.95	189.1	0.99	434.2	12.00	1.02	0.1

Трек 13. Rc₃



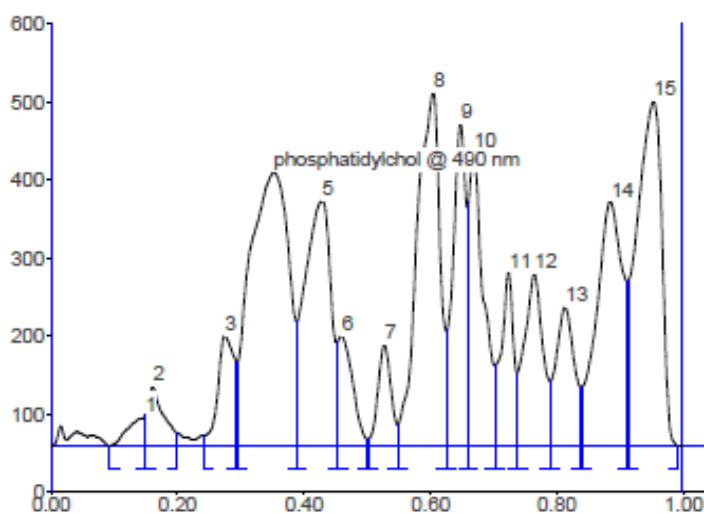
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height
Peak deleted by operator							
Peak deleted by operator							
1m	0.13	9.8	0.17	41.5	1.19	0.19	
2m	0.19	17.2	0.20	22.7	0.65	0.21	
3m	0.23	14.5	0.29	123.2	3.53	0.31	
4	0.32	100.5	0.37	311.7	8.93	0.41	
5	0.41	123.0	0.45	276.0	7.91	0.47	
6	0.47	118.0	0.48	130.0	3.73	0.52	
7	0.52	6.4	0.55	111.1	3.18	0.57	
8	0.57	30.2	0.63	430.1	12.33	0.65	
9	0.65	141.0	0.68	366.8	10.51	0.69	
10	0.69	279.3	0.70	364.1	10.44	0.73	
11	0.73	91.7	0.76	214.1	6.14	0.77	
12	0.77	83.7	0.80	195.8	5.61	0.83	
13	0.83	77.5	0.85	143.2	4.11	0.87	
14	0.88	70.4	0.92	323.5	9.27	0.95	
15	0.95	198.2	0.99	435.1	12.47	1.02	

Трек 2. Rca₁



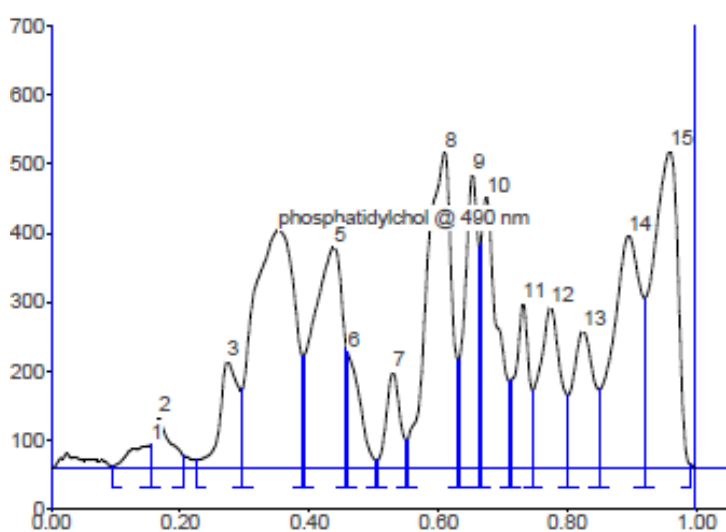
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf
Peak deleted by operator						
Peak deleted by operator						
1m	0.10	17.9	0.15	42.6	1.46	0.15
2m	0.15	43.3	0.17	77.7	2.67	0.22
3	0.26	26.0	0.29	142.2	4.88	0.31
4	0.31	114.9	0.37	362.2	12.43	0.41
5	0.41	138.4	0.45	301.4	10.34	0.47
6	0.47	118.6	0.48	132.0	4.53	0.52
7	0.52	0.2	0.55	84.8	2.91	0.58
8	0.58	5.4	0.64	354.1	12.15	0.67
9	0.67	87.2	0.69	259.0	8.89	0.70
10	0.70	225.0	0.71	250.8	8.61	0.74
11	0.74	32.3	0.77	117.3	4.02	0.79
12	0.79	52.5	0.81	115.4	3.96	0.83
13	0.84	51.9	0.86	97.2	3.34	0.88
14	0.88	39.2	0.93	222.1	7.62	0.95
15m	0.98	317.5	0.99	355.0	12.18	1.00

Трек 8. Rca₂



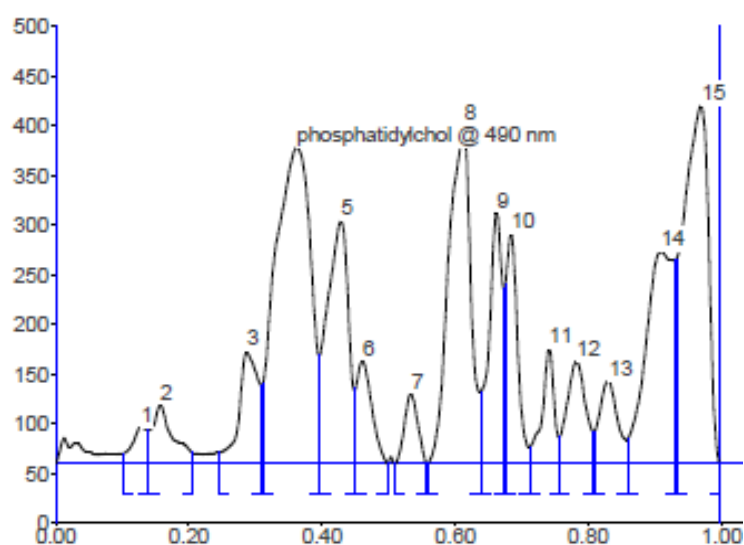
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf
Peak deleted by operator						
Peak deleted by operator						
1m	0.10	0.1	0.15	38.2	1.00	0.15
2m	0.15	40.2	0.17	75.8	1.99	0.20
3	0.25	13.3	0.28	141.3	3.71	0.30
4	0.30	107.9	0.36	350.6	9.21	0.40
5	0.40	160.5	0.44	313.7	8.24	0.47
6	0.47	134.2	0.47	141.1	3.71	0.52
7	0.52	8.6	0.54	129.6	3.41	0.56
8	0.57	27.4	0.62	453.3	11.91	0.64
9	0.65	149.9	0.67	412.6	10.84	0.68
10	0.68	311.0	0.69	376.5	9.89	0.72
11	0.72	103.4	0.75	221.8	5.83	0.76
12	0.76	94.2	0.79	219.9	5.78	0.81
13	0.81	83.9	0.84	178.1	4.68	0.86
14	0.86	75.4	0.91	312.9	8.22	0.94
15	0.94	210.6	0.98	441.0	11.59	1.02

Трек 14. Rca₃



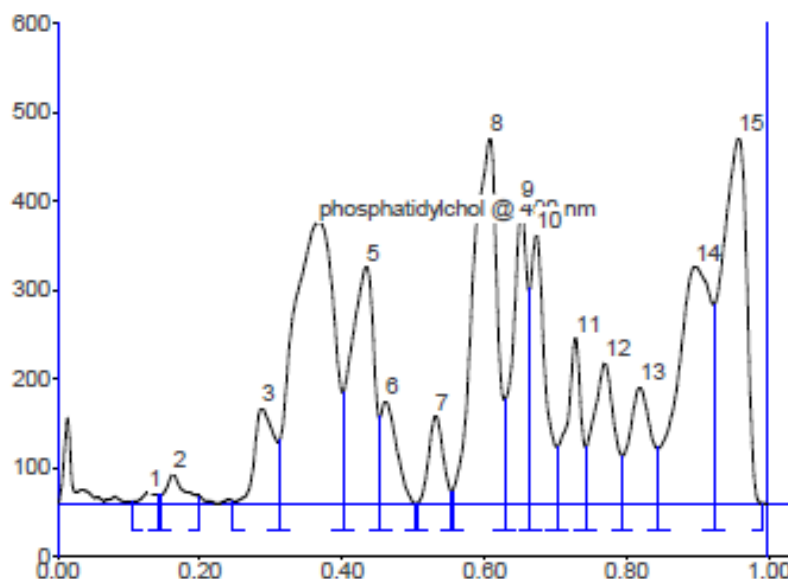
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf
Peak deleted by operator						
Peak deleted by operator						
1m	0.10	1.9	0.16	33.0	0.83	0.16
2m	0.16	34.5	0.17	72.7	1.83	0.21
3	0.23	10.9	0.28	155.4	3.91	0.30
4	0.31	114.4	0.36	344.9	8.68	0.40
5m	0.40	161.6	0.45	319.7	8.04	0.47
6m	0.47	168.3	0.47	168.3	4.23	0.52
7	0.52	11.1	0.55	138.2	3.48	0.57
8	0.57	40.4	0.63	457.5	11.51	0.65
9	0.65	158.5	0.67	425.0	10.69	0.68
10	0.69	325.5	0.69	392.7	9.88	0.73
11	0.73	126.2	0.75	238.7	6.01	0.77
12	0.77	113.4	0.80	233.6	5.88	0.82
13	0.83	105.6	0.85	198.9	5.01	0.87
14	0.88	114.0	0.92	336.8	8.47	0.95
15	0.95	246.7	0.99	459.5	11.56	1.02

Трек 3. Rn₁



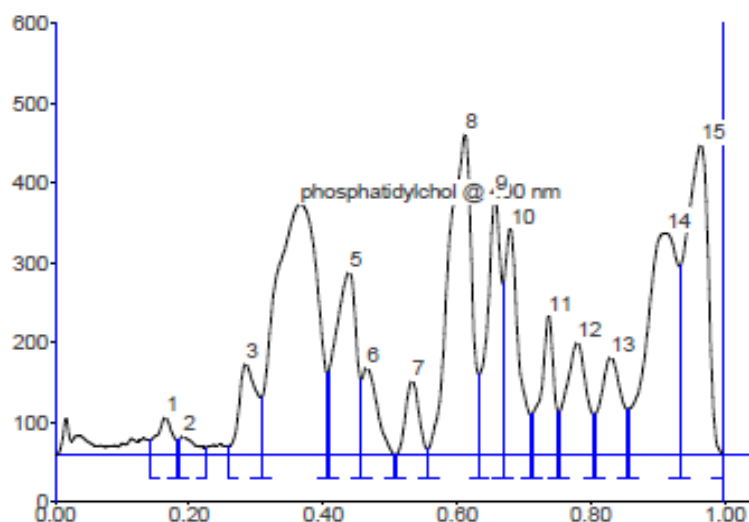
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf
Peak deleted by operator						
Peak deleted by operator						
1	0.10	10.9	0.13	36.7	1.39	0.13
2m	0.14	33.9	0.16	59.1	2.23	0.22
3	0.25	11.3	0.30	113.0	4.27	0.30
4	0.32	80.4	0.37	318.3	12.03	0.41
5	0.41	109.2	0.44	244.4	9.23	0.44
6	0.46	76.5	0.47	103.6	3.91	0.52
7	0.53	0.3	0.55	70.5	2.67	0.55
8	0.58	0.2	0.63	340.0	12.85	0.63
9	0.66	73.1	0.68	252.6	9.54	0.68
10	0.70	180.5	0.70	231.1	8.73	0.70
11	0.73	17.3	0.76	116.8	4.41	0.76
12	0.78	27.5	0.81	103.1	3.89	0.81
13	0.83	33.3	0.86	83.4	3.15	0.86
14m	0.89	25.0	0.94	213.7	8.08	0.94
15m	0.96	206.0	1.00	360.2	13.61	1.00

Трек 9. Rn₂



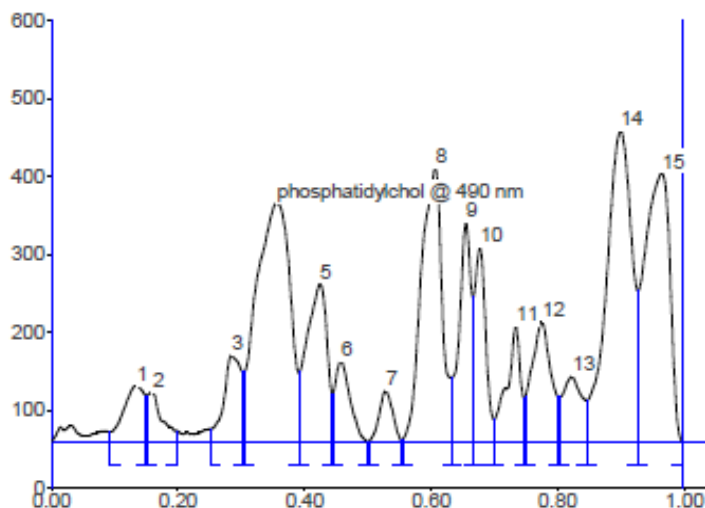
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf
Peak deleted by operator						
Peak deleted by operator						
1m	0.11	2.4	0.13	13.2	0.42	0.15
2m	0.15	9.4	0.17	33.3	1.06	0.21
3	0.25	2.7	0.30	108.1	3.42	0.32
4	0.32	70.4	0.38	316.7	10.02	0.41
5	0.41	125.5	0.45	266.7	8.44	0.47
6	0.47	97.3	0.47	115.9	3.67	0.52
7	0.52	0.5	0.55	99.0	3.13	0.57
8	0.57	14.0	0.63	412.5	13.05	0.65
9	0.65	117.3	0.67	337.8	10.69	0.68
10	0.68	243.2	0.69	302.2	9.56	0.72
11	0.72	63.8	0.75	186.9	5.92	0.76
12	0.77	64.1	0.79	158.1	5.00	0.82
13	0.82	53.9	0.84	131.5	4.16	0.87
14	0.87	62.4	0.92	266.7	8.44	0.95
15	0.95	224.5	0.99	411.2	13.01	1.02

Трек 15. Rn₃



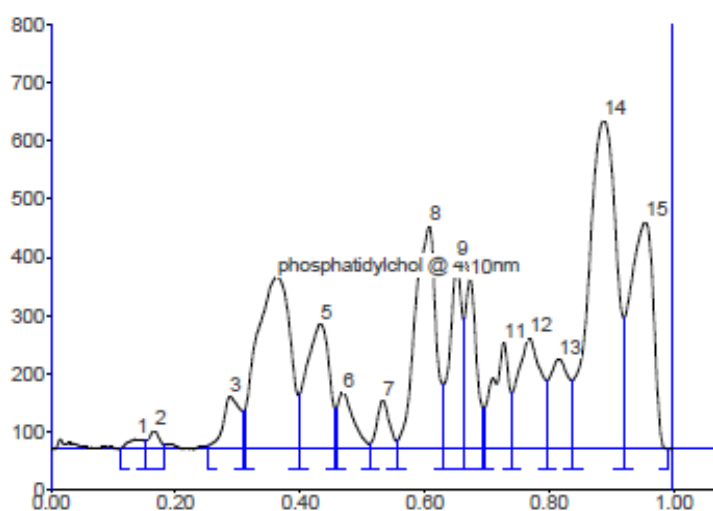
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf
Peak deleted by operator						
Peak deleted by operator						
1	0.15	18.1	0.17	47.3	1.55	0.19
2	0.19	18.5	0.20	23.6	0.78	0.23
3	0.27	11.1	0.29	114.0	3.74	0.32
4	0.32	73.0	0.38	314.1	10.31	0.42
5	0.42	103.6	0.45	229.1	7.52	0.47
6	0.47	94.5	0.48	109.9	3.61	0.52
7	0.52	0.1	0.55	93.0	3.05	0.57
8	0.57	8.0	0.63	401.9	13.20	0.65
9	0.65	101.9	0.68	323.8	10.63	0.69
10	0.69	217.0	0.70	283.8	9.32	0.73
11	0.73	49.9	0.76	174.3	5.72	0.77
12	0.78	53.4	0.80	141.1	4.63	0.83
13	0.83	50.8	0.85	122.6	4.03	0.88
14	0.88	57.2	0.94	278.0	9.13	0.96
15	0.96	236.8	0.99	388.9	12.77	1.03

Трек 4. Rs₁



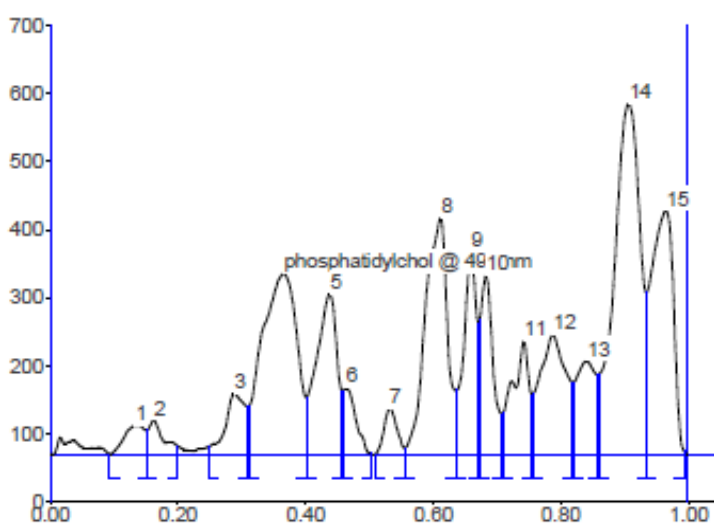
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height
Peak deleted by operator				
Peak deleted by operator				
1m	0.10	12.6	0.14	71.8
2m	0.16	59.1	0.16	63.5
3	0.26	16.1	0.29	110.3
4	0.31	89.8	0.37	306.1
5	0.40	89.0	0.44	202.3
6	0.46	61.9	0.47	103.3
7	0.52	0.5	0.54	65.1
8	0.57	2.4	0.62	350.1
9	0.65	82.5	0.67	280.0
10	0.69	185.4	0.70	248.3
11	0.72	29.1	0.76	148.3
12	0.77	57.8	0.80	153.3
13	0.83	57.1	0.85	83.4
14	0.87	53.6	0.93	397.9
15	0.96	194.4	0.99	343.9

Трек 10. Rs₂



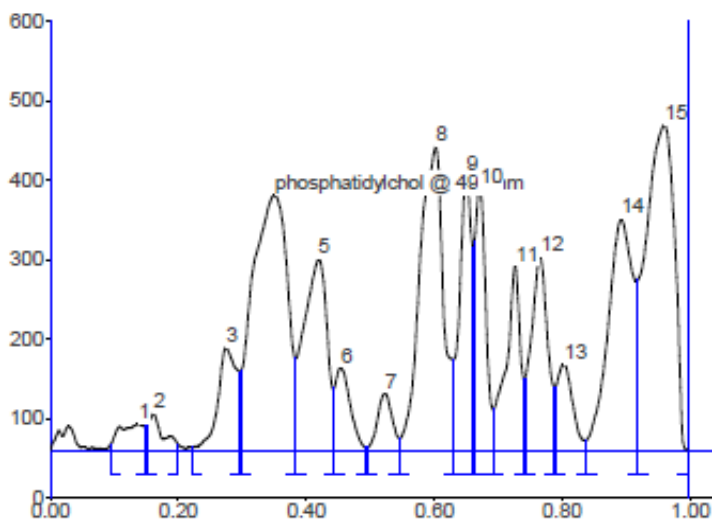
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf
Peak deleted by operator						
1	0.12	2.5	0.14	18.0	0.54	0.16
2	0.16	15.4	0.17	32.6	0.98	0.19
3	0.26	6.5	0.30	91.7	2.75	0.32
4	0.32	66.8	0.37	297.1	8.92	0.41
5	0.41	95.1	0.45	215.8	6.48	0.47
6	0.47	71.6	0.48	97.7	2.93	0.53
7	0.53	10.1	0.55	84.7	2.55	0.57
8	0.57	14.9	0.63	384.5	11.55	0.65
9	0.65	112.7	0.67	324.6	9.75	0.68
10	0.68	227.4	0.69	292.4	8.78	0.72
11	0.72	71.2	0.75	184.5	5.54	0.76
12	0.76	96.7	0.79	192.6	5.78	0.82
13	0.82	118.6	0.84	155.6	4.67	0.86
14	0.86	119.3	0.91	566.0	17.00	0.95
15	0.95	226.8	0.98	391.2	11.75	1.02

Трек 16. Rs₃



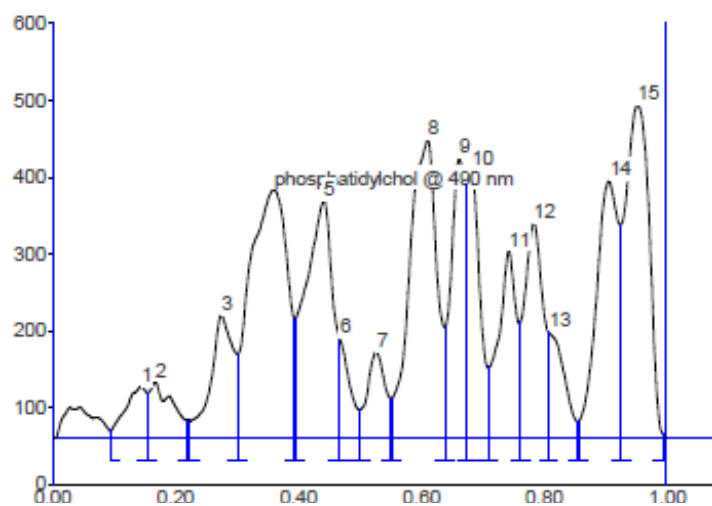
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf
Peak deleted by operator						
Peak deleted by operator						
1	0.10	0.5	0.14	42.7	1.37	0.16
2m	0.16	36.0	0.17	50.3	1.62	0.21
Peak deleted by operator						
3m	0.26	11.7	0.30	88.9	2.86	0.32
4	0.32	70.9	0.38	265.6	8.55	0.41
5m	0.41	84.6	0.45	235.8	7.59	0.47
6m	0.47	93.7	0.48	97.1	3.13	0.52
7	0.52	0.5	0.55	68.1	2.19	0.57
8	0.57	9.6	0.63	347.5	11.18	0.65
9	0.66	94.2	0.68	298.0	9.59	0.69
10	0.69	198.0	0.70	262.1	8.44	0.73
Peak deleted by operator						
11m	0.73	60.1	0.76	166.0	5.34	0.78
12	0.78	88.4	0.81	175.2	5.64	0.84
13	0.84	106.2	0.87	137.0	4.41	0.88
14	0.88	117.3	0.93	515.0	16.57	0.96
15	0.96	238.9	0.99	357.7	11.51	1.02

Трек 5. Rt₁



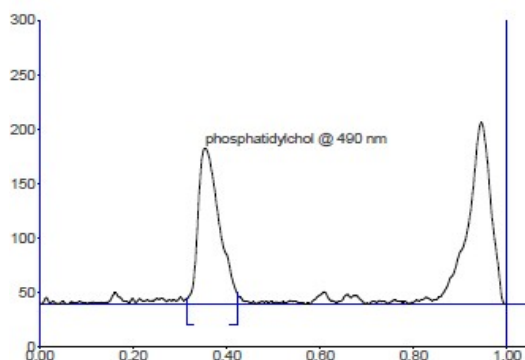
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height
Peak deleted by operator							
Peak deleted by operator							
1m	0.10	7.7	0.14	33.0	1.00	0.15	33.0
2m	0.16	31.6	0.17	46.1	1.40	0.21	46.1
Peak deleted by operator							
3	0.23	3.7	0.28	129.5	3.93	0.31	129.5
4	0.31	100.3	0.36	321.5	9.77	0.39	321.5
5	0.40	115.5	0.43	240.6	7.31	0.46	240.6
6	0.46	78.9	0.47	104.2	3.17	0.51	104.2
7	0.51	3.8	0.54	71.9	2.19	0.56	71.9
8	0.56	15.4	0.62	381.7	11.60	0.65	381.7
9	0.65	114.7	0.67	346.7	10.53	0.68	346.7
10	0.68	262.7	0.69	330.0	10.03	0.71	330.0
11	0.71	52.0	0.75	232.2	7.05	0.76	232.2
12	0.76	91.1	0.79	244.5	7.43	0.81	244.5
13	0.81	80.1	0.83	108.4	3.29	0.86	108.4
14	0.86	13.2	0.92	291.4	8.85	0.94	291.4
15	0.95	214.2	0.99	409.9	12.45	1.03	409.9

Трек 17. Rt₂



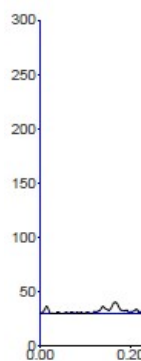
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height
Peak deleted by operator							
Peak deleted by operator							
Peak deleted by operator							
1	0.10	10.3	0.15	67.2	1.81	0.16	67.2
Peak deleted by operator							
2m	0.16	59.2	0.17	73.6	1.98	0.23	73.6
3	0.23	23.3	0.28	160.4	4.32	0.31	160.4
4	0.31	110.1	0.37	324.0	8.73	0.41	324.0
5m	0.41	156.2	0.45	309.8	8.35	0.48	309.8
6m	0.48	129.6	0.48	129.6	3.49	0.51	129.6
7	0.52	37.0	0.54	112.8	3.04	0.57	112.8
8	0.57	52.2	0.63	388.2	10.46	0.66	388.2
9	0.66	145.6	0.68	365.0	9.84	0.69	365.0
10	0.69	331.5	0.70	348.4	9.39	0.73	348.4
11	0.73	92.5	0.76	243.7	6.57	0.78	243.7
12m	0.78	151.3	0.81	280.2	7.55	0.83	280.2
13m	0.83	138.0	0.83	138.0	3.72	0.88	138.0
14	0.88	22.4	0.93	335.0	9.03	0.95	335.0
15	0.95	278.8	0.98	434.1	11.70	1.02	434.1

Трек 6. Фосфатидилхолин , St₁

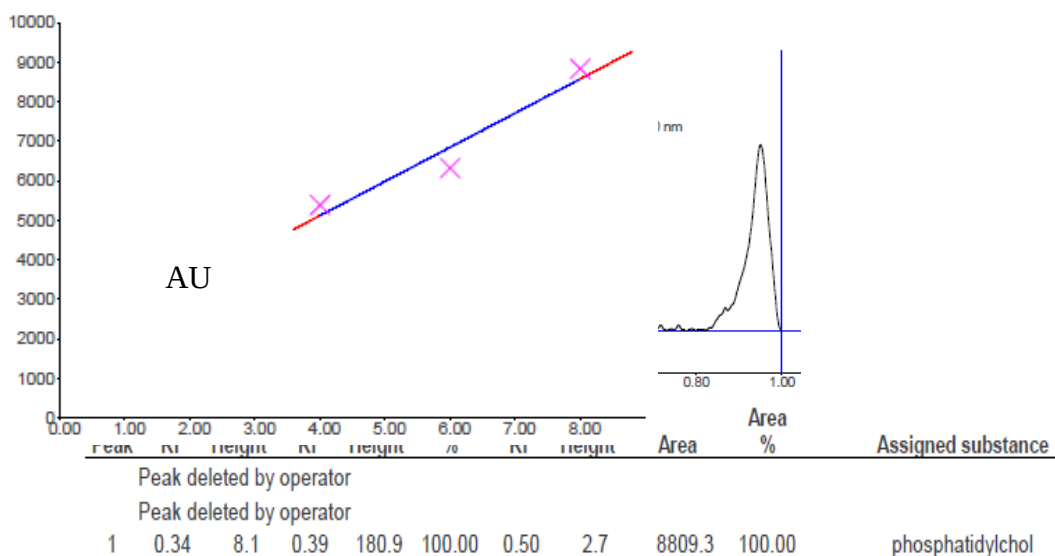


Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.32	4.6	0.36	143.5	100.00	0.43	10.1	5351.0	100.00	phosphatidylchol

Трек 12. Фосфатидилхолин



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %
Peak deleted by operator					
1	0.33	9.2	0.37	148.6	100.00



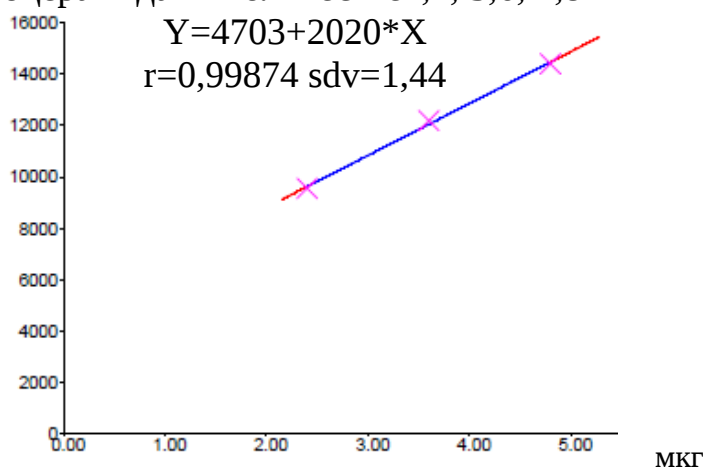
Калибровочные графики
для фосфатидилхолин

$$Y=1629+864,6*X$$

$$r=0,96687 \text{ sdv}=9,47$$

AU AU

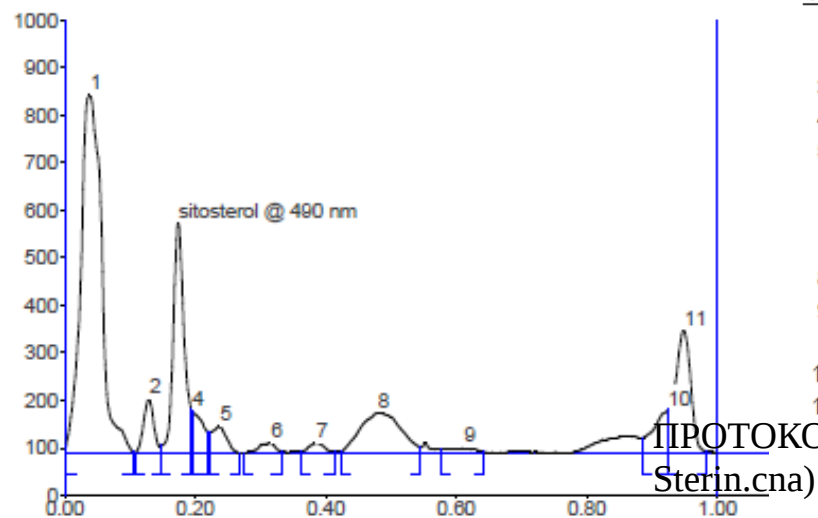
Калибровочные графики, построенные по площади пика
для гликоцерамида1 в количестве 2,4; 3,6; 4,8 мкг



Калибровочные графики
для гликоцерамида2 в к

$$Y=2336+2365*X$$

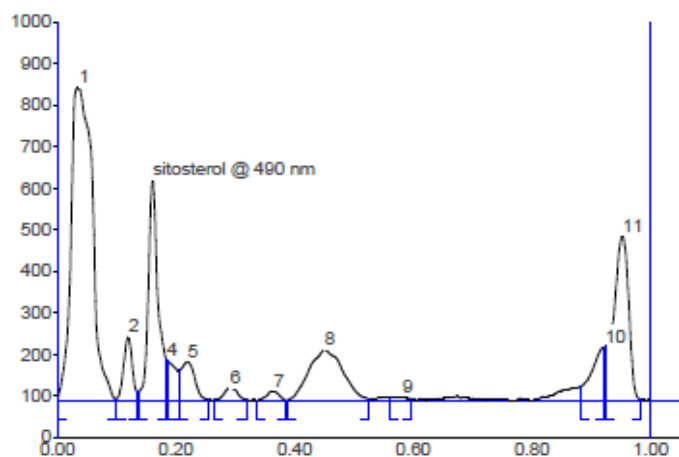
$$r=0,99988 \text{ sdv}=0,53$$

Трек 1. Rc₁

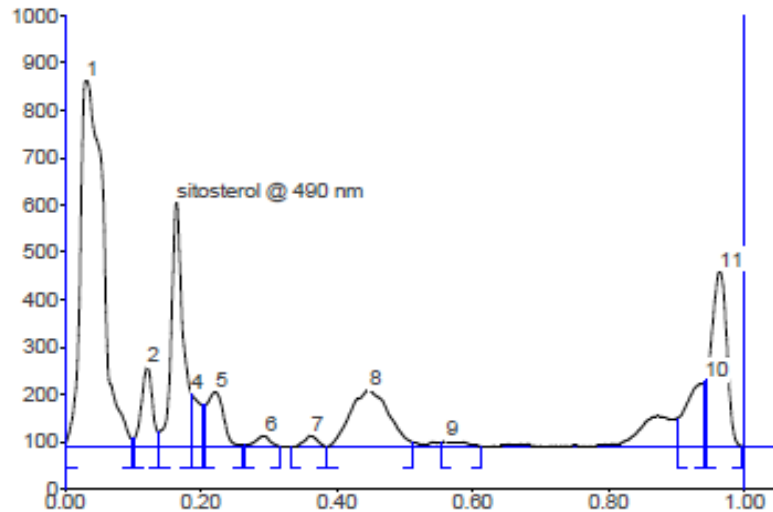
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.00	18.4	0.04	753.0	38.15	0.11	2.1	20655.2	46.59	unknown *
2	0.11	0.2	0.14	112.6	5.70	0.16	13.7	1515.5	3.42	unknown *
3m	0.16	14.7	0.18	485.1	24.57	0.21	90.6	6995.2	15.78	sitosterol
4m	0.21	86.4	0.21	86.4	4.38	0.23	44.4	1272.7	2.87	unknown *
5m	0.23	44.4	0.25	55.0	2.79	0.28	0.0	1118.6	2.52	unknown *
6	0.29	0.3	0.33	20.5	1.04	0.35	2.7	436.0	0.98	unknown *
7	0.38	3.6	0.41	20.5	1.04	0.44	2.4	423.4	0.96	unknown *
Peak deleted by operator										
8m	0.45	2.9	0.51	84.5	4.28	0.58	12.2	4486.7	10.12	unknown *
9m	0.61	7.3	0.65	10.0	0.51	0.68	2.7	368.9	0.83	unknown *
Peak deleted by operator										
10m	0.94	31.6	0.98	88.8	4.50	0.98	88.8	1729.2	3.90	unknown *
11m	0.98	90.8	1.00	257.4	13.04	1.04	2.9	5330.5	12.02	unknown *

Приложение 3

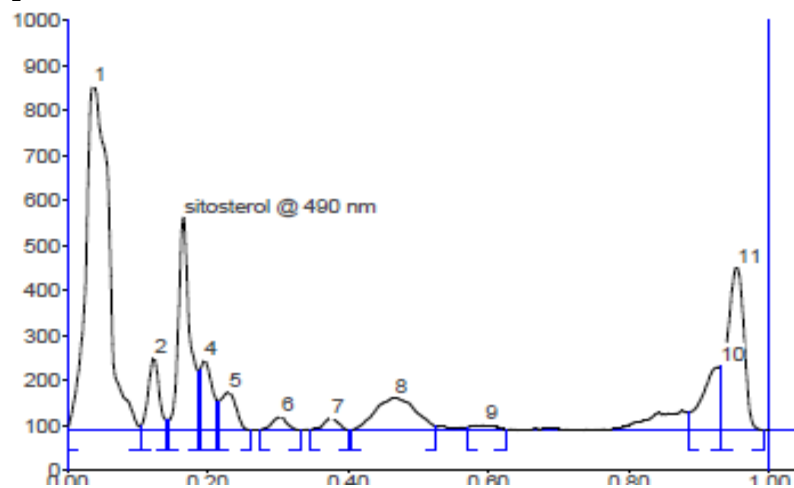
ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА ПОЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ ОТ 29.09.17 (20172909_KIBV_NL_Sterin.cna)

Трек 7. Rc₂

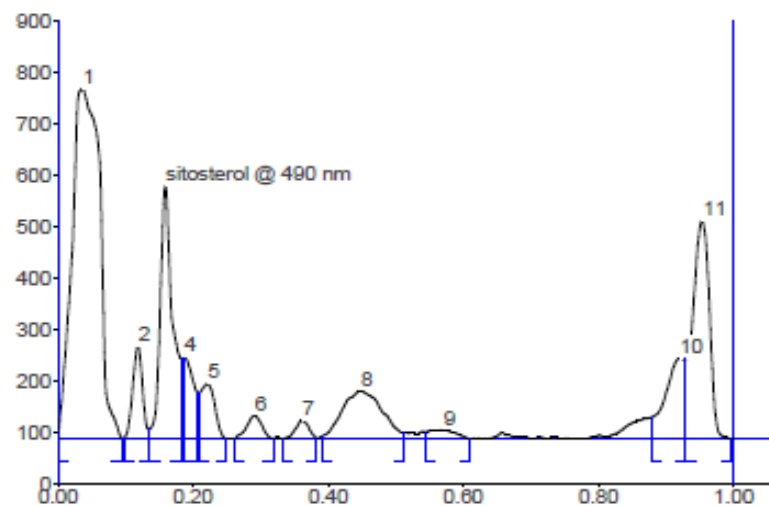
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	6.1	0.04	751.6	32.31	0.10	3.0	23154.9	43.02	unknown *
2	0.11	3.3	0.13	151.6	6.51	0.14	20.1	1915.9	3.56	unknown *
3m	0.15	20.8	0.17	531.4	22.84	0.19	99.5	7506.0	13.94	sitosterol
4m	0.20	95.4	0.20	95.4	4.10	0.22	71.1	1324.1	2.46	unknown *
5	0.22	71.7	0.23	92.1	3.96	0.27	1.6	1823.1	3.39	unknown *
6	0.28	1.4	0.31	29.9	1.29	0.34	2.0	563.4	1.05	unknown *
7	0.36	0.3	0.39	21.8	0.94	0.41	0.2	380.5	0.71	unknown *
8	0.41	0.2	0.48	121.3	5.21	0.56	3.6	5918.3	10.99	unknown *
9m	0.59	7.4	0.62	8.2	0.35	0.63	2.6	188.0	0.35	unknown *
10m	0.93	32.3	0.98	128.4	5.52	0.98	128.4	2464.3	4.58	unknown *
11m	0.98	130.3	1.01	395.0	16.98	1.04	1.5	8589.6	15.96	unknown *

Трек 13. Rc₃

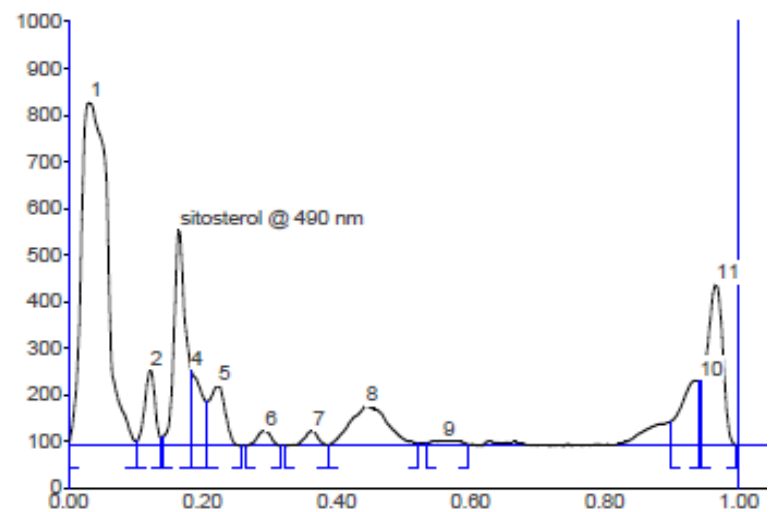
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	12.5	0.03	773.7	32.58	0.11	16.0	22233.2	41.54	unknown *
2	0.11	16.6	0.13	169.1	7.12	0.15	31.7	2386.8	4.46	unknown *
3m	0.15	32.0	0.17	516.6	21.75	0.20	117.7	7532.7	14.07	sitosterol
4m	0.20	112.3	0.20	112.3	4.73	0.22	87.1	1359.5	2.54	unknown *
5	0.22	87.6	0.23	116.2	4.89	0.28	2.3	2414.4	4.51	unknown *
6	0.28	2.5	0.31	23.5	0.99	0.34	0.1	422.9	0.79	unknown *
7	0.35	0.0	0.38	23.9	1.01	0.41	0.0	385.2	0.72	unknown *
8	0.41	0.1	0.47	120.3	5.06	0.54	8.9	5827.8	10.89	unknown *
9	0.59	9.3	0.59	12.3	0.52	0.65	0.6	349.2	0.65	unknown *
Peak deleted by operator										
10m	0.95	60.1	1.00	136.5	5.75	1.00	136.5	3203.1	5.98	unknown *
11m	1.00	140.5	1.02	370.3	15.59	1.05	1.4	7404.1	13.83	unknown *

Трек 2. Rca₁

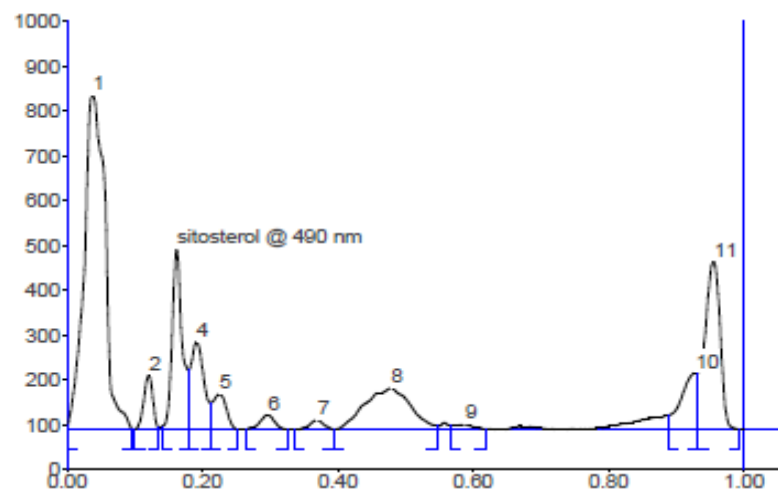
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	5.8	0.04	765.5	33.45	0.11	8.3	21626.6	43.09	unknown *
2	0.11	9.9	0.13	160.8	7.03	0.15	22.9	2186.8	4.36	unknown *
3	0.15	23.1	0.18	473.2	20.68	0.20	131.8	6820.2	13.59	sitosterol
4	0.20	133.9	0.21	155.4	6.79	0.23	65.1	2346.2	4.67	unknown *
5	0.23	65.1	0.24	84.7	3.70	0.28	0.1	1625.1	3.24	unknown *
6	0.29	0.1	0.32	31.0	1.36	0.35	0.1	558.1	1.11	unknown *
7	0.37	1.1	0.40	27.6	1.21	0.43	0.0	509.4	1.01	unknown *
8m	0.43	0.0	0.49	73.5	3.21	0.56	9.4	3625.8	7.22	unknown *
9m	0.60	6.9	0.63	12.2	0.53	0.66	2.8	382.1	0.76	unknown *
Peak deleted by operator										
10m	0.94	39.3	0.99	142.2	6.21	0.99	142.2	3158.3	6.29	unknown *
11m	0.99	144.2	1.01	362.3	15.83	1.05	0.1	7352.8	14.65	unknown *

Трек 8. Rca₂

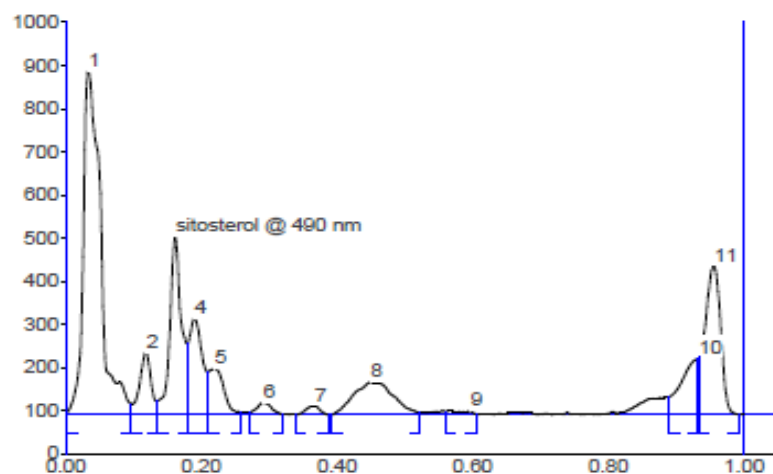
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	17.0	0.04	679.5	28.50	0.10	1.0	23903.2	41.40	unknown *
2	0.10	0.9	0.13	178.5	7.49	0.14	17.7	2243.1	3.89	unknown *
3m	0.14	18.8	0.17	491.3	20.61	0.19	155.4	7742.0	13.41	sitosterol
4m	0.20	156.2	0.20	157.7	6.61	0.22	88.9	2207.7	3.82	unknown *
5m	0.22	88.6	0.23	106.7	4.48	0.26	0.1	1951.9	3.38	unknown *
6	0.28	0.6	0.31	45.1	1.89	0.34	0.8	862.7	1.49	unknown *
7	0.35	0.1	0.38	35.6	1.49	0.41	0.5	602.8	1.04	unknown *
8	0.41	4.1	0.47	93.3	3.91	0.54	10.5	4702.7	8.15	unknown *
9	0.58	13.1	0.60	17.4	0.73	0.65	0.1	593.2	1.03	unknown *
Peak deleted by operator										
10m	0.93	42.1	0.97	156.8	6.58	0.98	153.5	3821.1	6.62	unknown *
11	0.98	154.4	1.01	422.3	17.71	1.05	0.0	9099.8	15.76	unknown *

Трек 14. Rca₃

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	8.0	0.03	737.1	31.90	0.11	10.9	24560.4	44.61	unknown *
2	0.11	12.1	0.13	163.0	7.05	0.15	17.4	2186.0	3.97	unknown *
3m	0.15	18.5	0.18	465.0	20.12	0.19	170.7	6898.5	12.53	sitosterol
4m	0.19	161.0	0.19	161.0	6.97	0.22	96.0	2293.6	4.17	unknown *
5	0.22	96.3	0.24	129.9	5.62	0.27	0.7	2584.6	4.69	unknown *
6	0.28	0.7	0.31	33.4	1.45	0.34	0.2	594.8	1.08	unknown *
7	0.34	0.2	0.39	33.2	1.44	0.41	2.7	599.3	1.09	unknown *
8	0.41	2.9	0.47	86.7	3.75	0.55	5.9	4234.9	7.69	unknown *
9	0.56	6.0	0.59	12.6	0.54	0.63	3.6	482.8	0.88	unknown *
Peak deleted by operator										
10m	0.95	52.7	1.00	141.5	6.12	1.00	141.5	3397.7	6.17	unknown *
11m	1.00	142.5	1.02	347.5	15.04	1.05	2.7	7227.5	13.13	unknown *

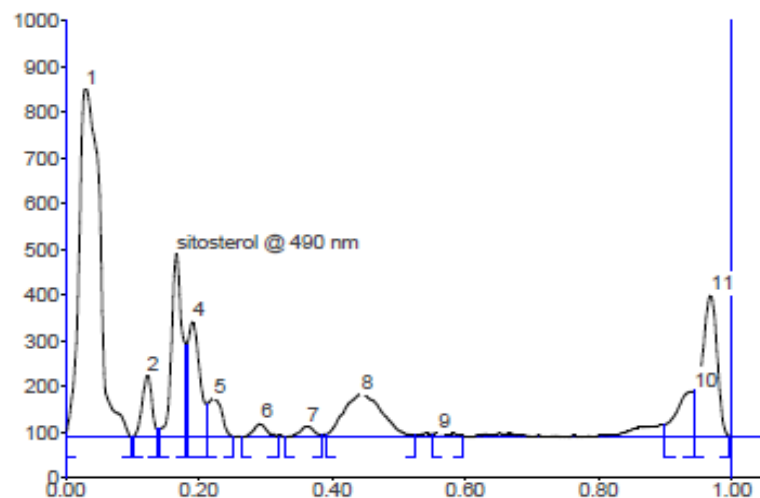
Трек 3. Rn₁

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	8.9	0.04	745.9	33.77	0.10	0.4	19903.3	41.51	unknown *
2	0.11	0.3	0.13	121.7	5.51	0.14	4.4	1395.2	2.91	unknown *
3	0.15	7.4	0.17	403.4	18.26	0.19	132.4	5260.0	10.97	sitosterol
4	0.19	133.8	0.20	196.6	8.90	0.22	60.3	3284.0	6.85	unknown *
5	0.23	60.4	0.24	79.1	3.58	0.27	0.1	1374.7	2.87	unknown *
6	0.28	1.4	0.31	33.2	1.50	0.34	1.1	625.7	1.31	unknown *
7	0.36	0.4	0.39	21.8	0.99	0.42	0.4	391.6	0.82	unknown *
8m	0.42	0.4	0.51	92.7	4.20	0.58	9.9	5389.8	11.24	unknown *
9m	0.60	9.5	0.62	12.4	0.56	0.65	0.9	300.8	0.63	unknown *
Peak deleted by operator										
10m	0.94	31.8	0.98	126.8	5.74	0.99	126.7	2601.4	5.43	unknown *
11m	0.99	127.6	1.01	375.3	16.99	1.05	0.0	7416.0	15.47	unknown *

Трек 9. Rn₂

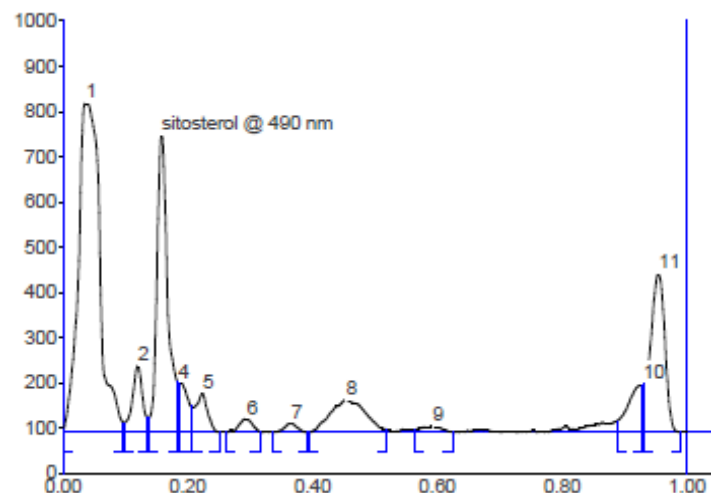
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.00	7.2	0.04	797.9	34.65	0.10	26.4	17675.0	37.75	unknown *
2	0.10	25.7	0.13	144.7	6.28	0.14	32.2	2149.0	4.59	unknown *
3	0.14	33.2	0.17	415.8	18.06	0.19	165.0	6249.7	13.35	sitosterol
4	0.19	167.9	0.20	223.8	9.72	0.22	100.5	3750.7	8.01	unknown *
5	0.22	101.0	0.23	107.4	4.66	0.27	6.9	2086.0	4.46	unknown *
6	0.29	6.3	0.31	28.9	1.25	0.34	1.0	571.2	1.22	unknown *
7	0.36	0.0	0.39	20.7	0.90	0.41	0.7	369.2	0.79	unknown *
8	0.42	0.1	0.48	76.0	3.30	0.55	6.0	3876.6	8.28	unknown *
9m	0.59	7.9	0.63	9.7	0.42	0.64	2.7	258.4	0.55	unknown *
10m	0.94	42.6	0.99	132.0	5.73	0.99	132.0	2801.1	5.98	unknown *
11m	0.99	134.9	1.01	345.8	15.02	1.05	0.9	7030.0	15.02	unknown *

Трек 15. Rn₃



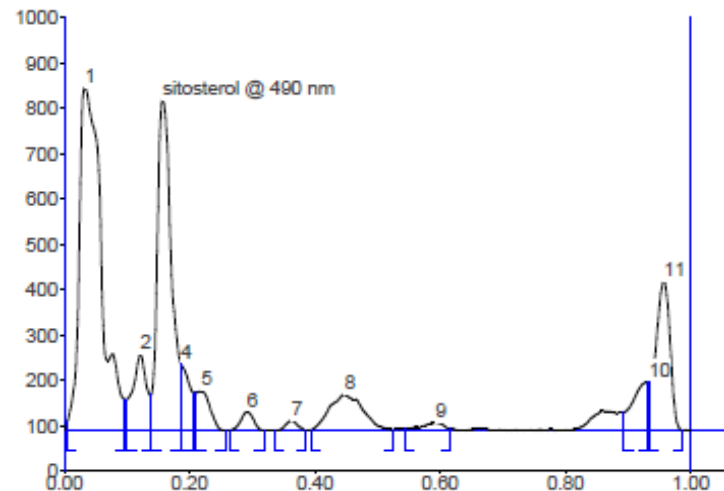
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	9.4	0.03	762.0	34.55	0.10	0.3	20261.1	42.74	unknown *
2	0.11	0.4	0.13	135.6	6.15	0.15	17.5	1709.5	3.61	unknown *
3	0.15	19.1	0.18	402.0	18.23	0.19	203.2	5594.3	11.80	sitosterol
4	0.19	203.2	0.20	251.9	11.42	0.22	72.7	3992.3	8.42	unknown *
5	0.23	73.3	0.24	85.1	3.86	0.27	0.3	1492.4	3.15	unknown *
6	0.28	0.6	0.31	29.8	1.35	0.34	2.6	511.7	1.08	unknown *
7	0.35	0.1	0.38	24.0	1.09	0.41	5.4	452.9	0.96	unknown *
8	0.41	7.1	0.47	95.0	4.31	0.56	3.6	4733.4	9.98	unknown *
9m	0.58	6.9	0.59	9.9	0.45	0.63	2.1	268.5	0.57	unknown *
10m	0.95	26.8	1.00	100.5	4.56	1.00	100.5	2209.0	4.66	unknown *
11m	1.00	101.6	1.03	309.9	14.05	1.06	1.3	6183.1	13.04	unknown *

Трек 4. Rs₁



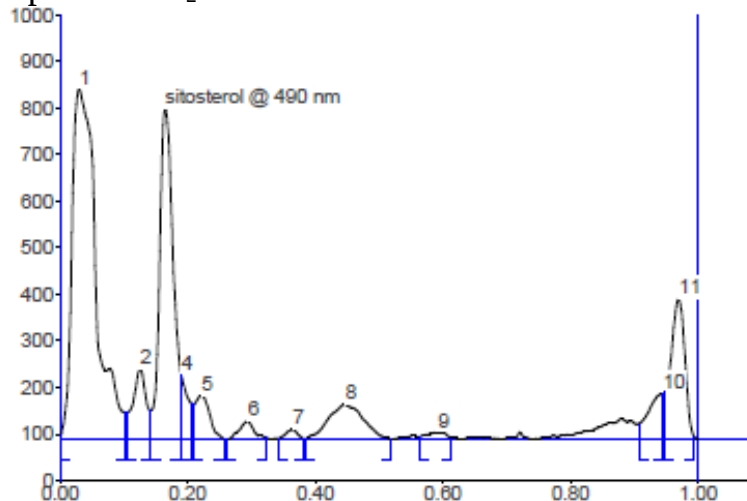
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.00	7.2	0.04	728.4	31.28	0.10	21.9	21668.4	42.63	unknown *
2	0.10	22.0	0.13	148.0	6.36	0.14	32.3	2132.4	4.20	unknown *
3m	0.15	32.6	0.17	658.2	28.27	0.19	112.4	9911.5	19.50	sitosterol
4m	0.20	110.1	0.20	110.1	4.73	0.22	58.1	1460.6	2.87	unknown *
5	0.22	54.9	0.24	87.7	3.77	0.27	0.2	1452.6	2.86	unknown *
6m	0.28	0.0	0.31	30.8	1.32	0.33	1.8	581.0	1.14	unknown *
7	0.35	0.1	0.39	21.4	0.92	0.41	0.2	371.1	0.73	unknown *
8m	0.42	0.1	0.48	73.1	3.14	0.55	6.3	3538.9	6.96	unknown *
9m	0.60	7.5	0.63	13.5	0.58	0.66	0.9	418.7	0.82	unknown *
Peak deleted by operator										
Peak deleted by operator										
10m	0.94	25.7	0.98	106.5	4.57	0.98	106.5	2209.9	4.35	unknown *
11m	0.99	108.2	1.01	350.9	15.07	1.05	0.1	7084.9	13.94	unknown *

Трек 10. Rs₂



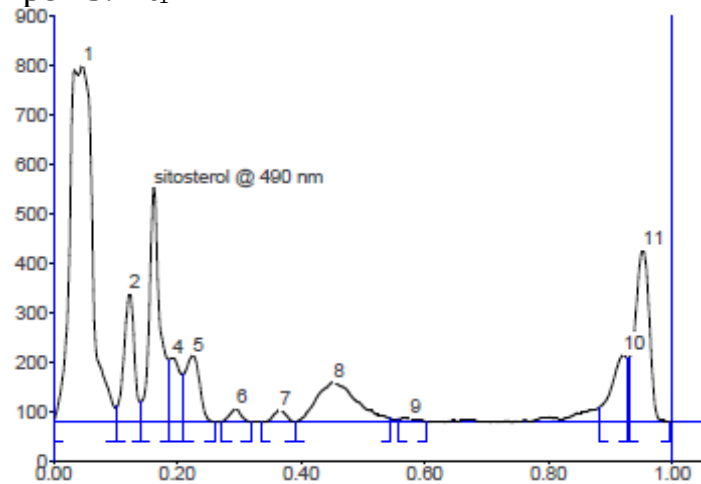
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.00	18.3	0.03	756.4	30.43	0.10	68.7	22994.6	39.62	unknown *
Peak deleted by operator										
2	0.11	68.8	0.13	167.7	6.75	0.15	78.5	3211.9	5.53	unknown *
3m	0.15	80.5	0.17	727.9	29.28	0.20	153.7	13955.0	24.05	sitosterol
4m	0.20	147.9	0.20	147.9	5.95	0.22	83.0	1936.6	3.34	unknown *
5m	0.22	83.6	0.23	87.3	3.51	0.27	0.1	1634.2	2.82	unknown *
6	0.28	0.2	0.31	42.3	1.70	0.34	1.1	735.8	1.27	unknown *
7	0.36	0.2	0.38	23.0	0.92	0.41	0.3	373.7	0.64	unknown *
8	0.42	1.8	0.47	79.3	3.19	0.56	3.0	3724.2	6.42	unknown *
9	0.58	3.7	0.63	18.4	0.74	0.65	3.4	575.6	0.99	unknown *
Peak deleted by operator										
10m	0.95	40.2	0.99	107.0	4.30	0.99	107.0	2296.8	3.96	unknown *
11m	0.99	108.5	1.01	328.5	13.22	1.05	0.4	6598.2	11.37	unknown *

Трек 16. Rs₂



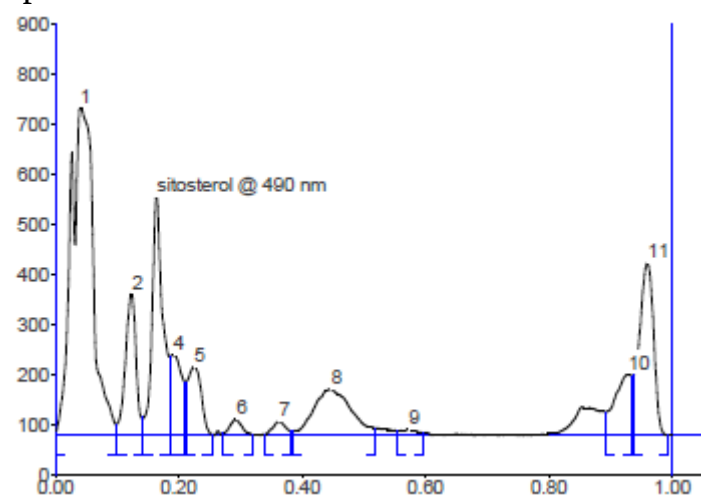
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.00	6.0	0.03	750.6	31.58	0.11	56.0	24211.3	43.58	unknown *
2	0.11	55.5	0.13	150.0	6.31	0.15	60.5	2662.5	4.79	unknown *
3m	0.15	60.8	0.17	707.7	29.78	0.20	147.4	12934.8	23.28	sitosterol
4m	0.20	137.0	0.20	137.0	5.76	0.22	73.4	1366.7	2.46	unknown *
5m	0.22	73.1	0.23	92.7	3.90	0.27	0.2	1840.8	3.31	unknown *
6	0.28	0.1	0.31	36.7	1.55	0.34	1.8	710.3	1.28	unknown *
7	0.36	0.3	0.39	19.4	0.82	0.40	1.3	296.3	0.53	unknown *
8	0.41	1.4	0.47	73.2	3.08	0.55	0.2	3418.8	6.15	unknown *
9	0.60	5.2	0.63	13.8	0.58	0.65	1.6	364.6	0.66	unknown *
Peak deleted by operator										
Peak deleted by operator										
10m	0.96	31.9	1.00	96.4	4.06	1.00	96.4	1912.9	3.44	unknown *
11m	1.00	99.6	1.03	299.2	12.59	1.05	3.9	5842.7	10.52	unknown *

Трек 5. Rt₁



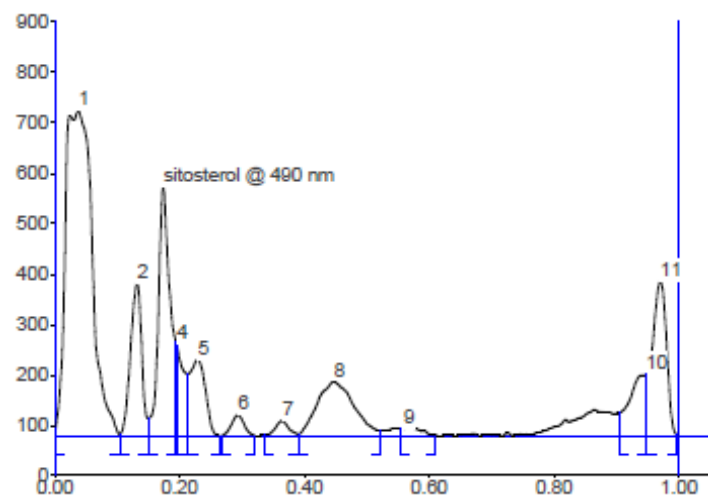
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	4.9	0.05	720.7	30.63	0.11	30.1	22768.5	41.93	unknown *
2	0.11	31.7	0.13	262.1	11.14	0.15	41.4	3824.0	7.04	unknown *
3	0.15	42.1	0.17	474.7	20.17	0.20	127.2	7099.7	13.08	sitosterol
4	0.20	127.5	0.20	130.9	5.56	0.22	96.8	1986.7	3.66	unknown *
5	0.22	97.8	0.24	135.0	5.74	0.28	1.2	2655.8	4.89	unknown *
6	0.29	2.3	0.31	28.8	1.23	0.34	1.4	450.4	0.83	unknown *
7	0.36	0.0	0.39	25.9	1.10	0.41	2.0	448.4	0.83	unknown *
8m	0.41	1.8	0.48	81.5	3.46	0.58	7.8	4584.2	8.44	unknown *
9m	0.59	6.6	0.61	9.0	0.38	0.64	1.4	229.6	0.42	unknown *
10m	0.93	29.2	0.98	136.0	5.78	0.98	129.4	3160.3	5.82	unknown *
11	0.99	130.6	1.01	348.7	14.82	1.05	1.1	7088.9	13.06	unknown *

Трек 11. Rt₂



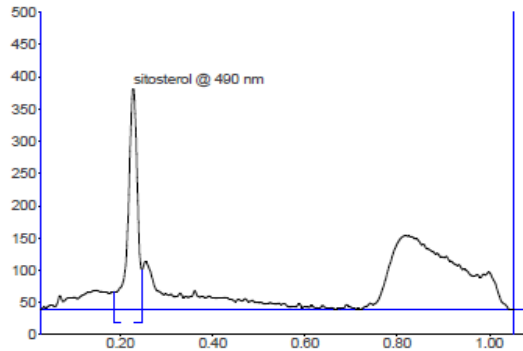
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	7.0	0.04	654.3	27.91	0.10	22.4	20463.9	38.29	unknown *
2	0.11	23.0	0.13	282.9	12.06	0.15	34.4	4233.3	7.92	unknown *
3m	0.15	35.6	0.17	477.5	20.36	0.20	157.4	7184.4	13.44	sitosterol
4m	0.20	157.8	0.20	161.2	6.87	0.22	105.9	2674.7	5.00	unknown *
5	0.22	105.9	0.24	137.4	5.86	0.27	2.5	2656.3	4.97	unknown *
6	0.29	4.0	0.31	32.0	1.37	0.34	0.3	560.4	1.05	unknown *
7	0.36	2.2	0.38	28.8	1.23	0.41	8.0	532.6	1.00	unknown *
8	0.41	8.0	0.47	93.1	3.97	0.55	14.4	4885.4	9.14	unknown *
9	0.59	9.1	0.61	12.1	0.52	0.63	4.5	307.2	0.57	unknown *
Peak deleted by operator										
10	0.94	47.2	0.98	121.8	5.19	0.99	118.9	2923.3	5.47	unknown *
11	0.99	119.8	1.02	343.7	14.66	1.05	0.1	7024.4	13.14	unknown *

Трек 17. Rt₃

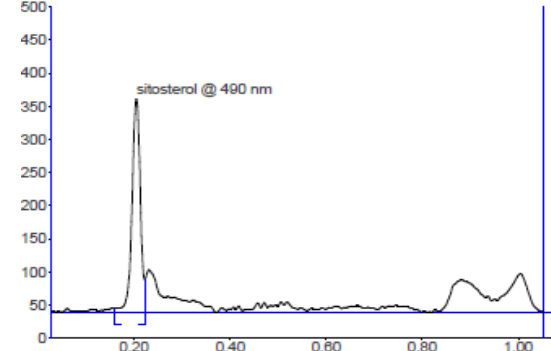


Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	12.6	0.04	643.9	26.98	0.11	2.4	23577.7	41.15	unknown *
2	0.11	3.3	0.14	301.5	12.63	0.16	34.3	4672.4	8.15	unknown *
3m	0.16	34.9	0.18	493.3	20.67	0.21	186.6	8030.6	14.02	sitosterol
4m	0.21	179.7	0.21	179.7	7.53	0.23	121.8	1970.1	3.44	unknown *
5	0.23	122.2	0.24	150.9	6.32	0.28	0.2	3159.9	5.51	unknown *
6	0.28	0.5	0.31	40.7	1.71	0.34	0.2	696.6	1.22	unknown *
7	0.35	0.9	0.39	29.4	1.23	0.41	2.8	538.3	0.94	unknown *
8	0.41	3.1	0.47	107.0	4.48	0.55	9.8	5381.3	9.39	unknown *
9m	0.59	13.4	0.59	14.6	0.61	0.65	0.7	419.3	0.73	unknown *
										Peak deleted by operator
										Peak deleted by operator
10m	0.96	45.7	1.00	120.6	5.05	1.00	120.6	2757.6	4.81	unknown *
11m	1.00	122.1	1.03	305.0	12.78	1.05	2.7	6094.3	10.64	unknown *

Трек 1. Ситостерин 2мкл , St₁



Трек 11. Ситостерин 2мкл , St₃

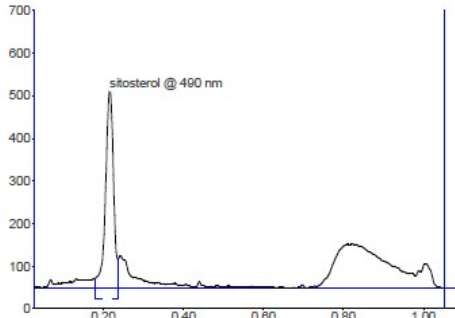


Приложение 4

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.16	5.3	0.21	322.2	100.00	0.22	49.0	4674.4	100.00	sitosterol

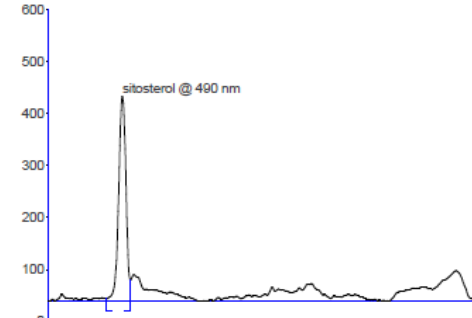
ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА ПОЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ ОТ 29.09.17 (20172909_KIBB_NI-Sterin.cna) Приложение 4

Трек 2. Ситостерин 4мкл , St₁



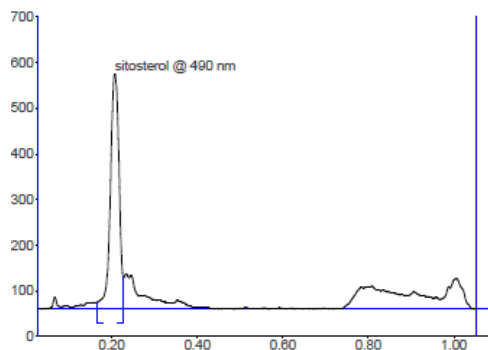
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.18	23.2	0.22	462.3	100.00	0.24	67.5	7693.4	100.00	sitosterol

Трек 12. Ситостерин 4мкл , St₃



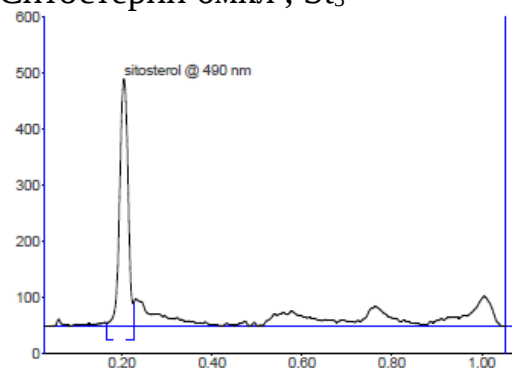
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.17	4.4	0.21	395.2	100.00	0.22	39.7	5814.1	100.00	sitosterol

Трек 3. Ситостерин бмкл , St₁



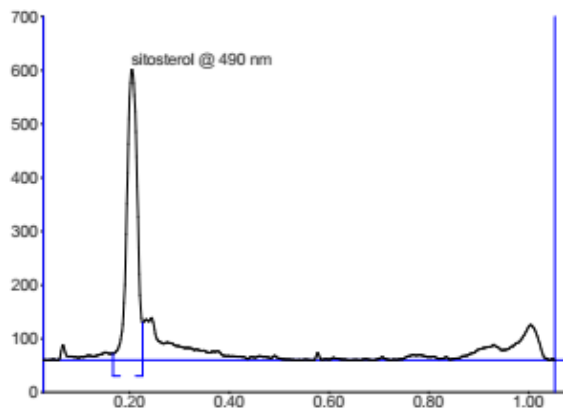
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.17	15.6	0.21	515.9	100.00	0.23	69.2	8844.5	100.00	sitosterol

Трек 13. Ситостерин бмкл , St₃



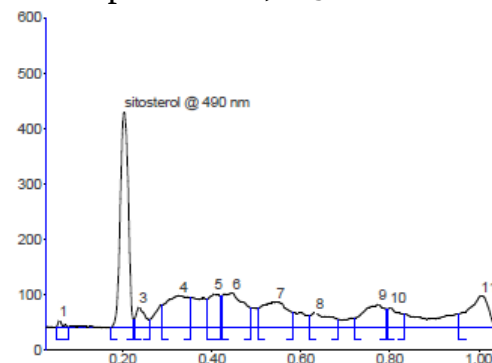
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned subst
1	0.17	5.6	0.21	440.6	100.00	0.23	40.3	6869.7	100.00	sitosterol

Трек 4. Ситостерин 8мкл , St₁



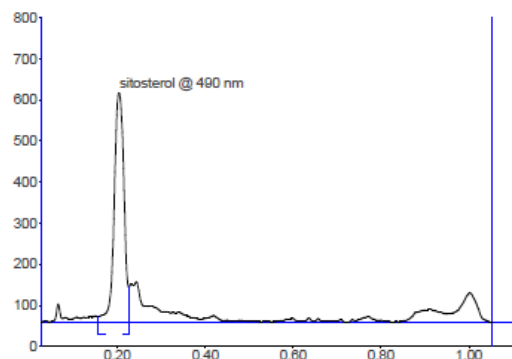
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.17	12.3	0.21	541.8	100.00	0.23	69.9	9486.5	100.00	sitosterol

Трек 14. Ситостерин 8мкл , St₃



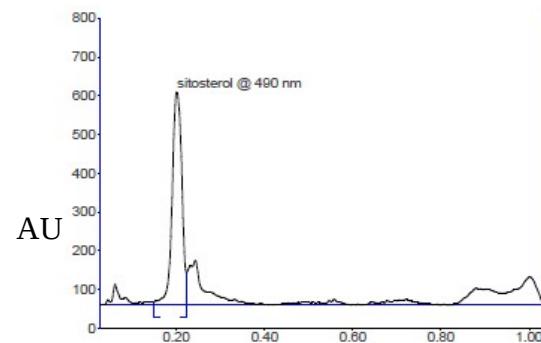
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.05	0.7	0.06	14.5	1.72	0.08	2.3	130.2	0.62	unknown *
2	0.17	0.4	0.20	391.3	46.47	0.22	14.9	5849.3	27.66	sitosterol

Трек 5. Ситостерин 10мкл , St1



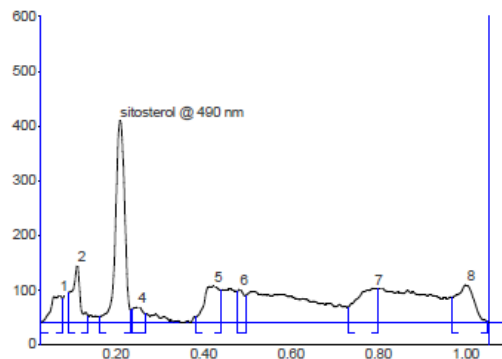
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.17	12.1	0.21	460.3	100.00	0.23	73.8	7469.7	100.00	sitosterol

Трек 10. Ситостерин 10мкл , St2



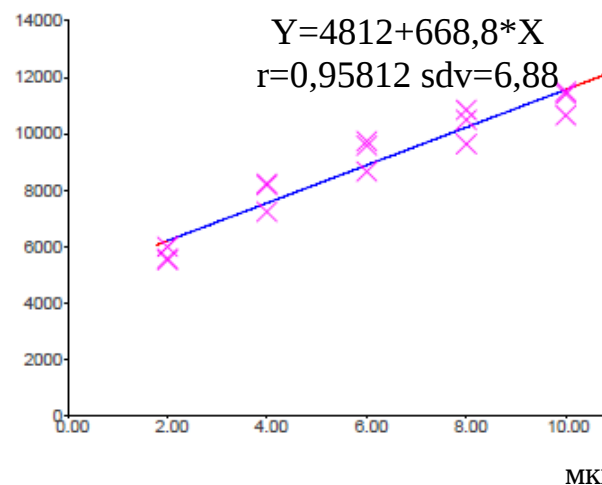
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned sub:
1	0.15	9.3	0.20	550.8	100.00	0.22	84.2	10280.2	100.00	sitosterol

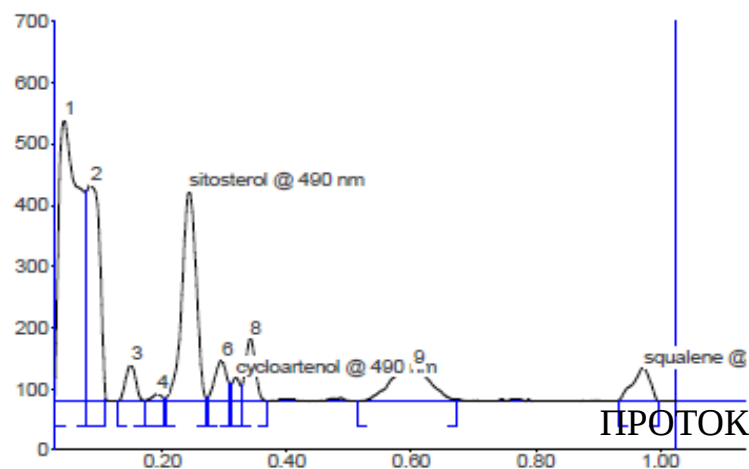
Трек 15. Ситостерин 10мкл , St3



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.03	0.5	0.07	50.6	6.19	0.08	44.4	1061.6	6.02	unknown *
2	0.09	55.6	0.11	105.7	12.91	0.14	12.5	1713.1	9.71	unknown *
3	0.16	11.8	0.21	370.6	45.30	0.24	23.0	6535.8	37.04	sitosterol

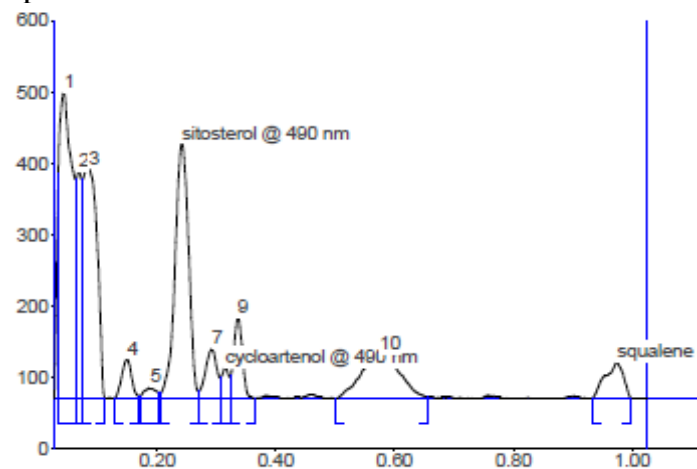
Калибровочные графики построенные по площади пика для β - ситостерина в количестве 2,4,6,8,10 МКГ



Трек 2. RC₁

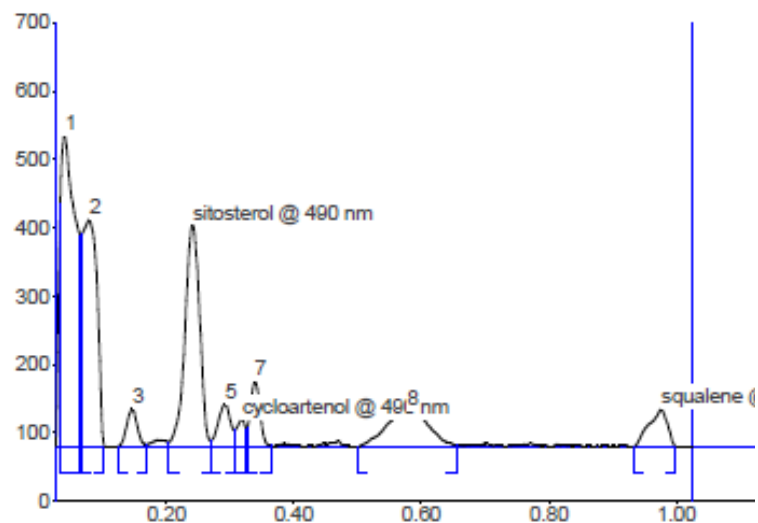
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.03	39.5	0.04	459.2	29.76	0.08	342.0	12769.3	37.95	unknown *
2	0.08	342.8	0.09	353.8	22.93	0.11	3.4	6249.1	18.57	unknown *
3	0.13	0.2	0.15	59.6	3.86	0.17	1.7	822.1	2.44	unknown *
4	0.17	1.7	0.19	12.2	0.79	0.21	4.6	170.0	0.51	unknown *
5	0.21	5.0	0.24	342.5	22.19	0.27	5.6	6564.9	19.51	sitosterol
6	0.27	6.8	0.30	66.8	4.33	0.31	27.5	1091.2	3.24	unknown *
7	0.31	27.8	0.32	39.2	2.54	0.33	25.0	423.0	1.26	cycloartenol
8	0.33	26.9	0.34	102.5	6.64	0.37	0.3	1348.0	4.01	unknown *
9	0.51	0.2	0.60	53.0	3.43	0.67	2.2	2913.4	8.66	unknown *
10	0.93	0.4	0.98	54.5	3.53	1.00	0.3	1292.9	3.84	squalene

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ ОТ 2.12.17 (20171202_KIBB_NL.cna) Приложение 5

Трек 4. RC₂

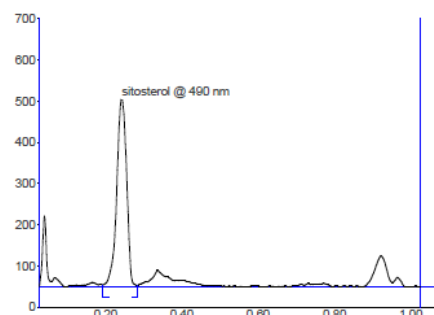
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.03	316.6	0.04	429.9	23.39	0.06	308.3	8073.7	24.91	unknown *
2	0.07	309.0	0.07	319.1	17.37	0.07	307.6	2506.4	7.73	unknown *
3	0.08	308.4	0.09	322.4	17.54	0.11	1.3	6288.9	19.41	unknown *
4	0.13	0.2	0.15	55.3	3.01	0.17	4.4	781.6	2.41	unknown *
5	0.17	4.0	0.19	15.5	0.84	0.21	8.2	276.2	0.85	unknown *
6	0.21	8.3	0.24	357.5	19.46	0.27	10.5	6885.4	21.25	sitosterol
7	0.27	10.6	0.29	69.5	3.78	0.31	29.6	1147.5	3.54	unknown *
8	0.31	30.7	0.32	42.9	2.33	0.32	30.2	439.1	1.35	cycloartenol
9	0.33	32.6	0.34	113.2	6.16	0.37	0.7	1381.8	4.26	unknown *
10	0.50	0.7	0.58	61.9	3.37	0.66	2.8	3320.5	10.25	unknown *
11	0.93	0.4	0.98	50.4	2.74	1.00	0.5	1307.2	4.03	squalene

Трек 6. Rc₃



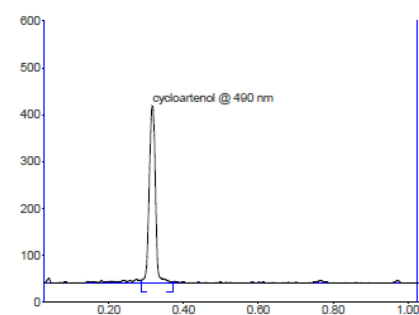
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.03	355.3	0.04	455.1	30.96	0.07	309.3	9074.6	30.88	unknown *
2	0.07	309.7	0.08	331.2	22.53	0.10	0.2	6510.9	22.15	unknown *
3	0.13	0.2	0.15	54.7	3.72	0.17	2.8	760.8	2.59	unknown *
4	0.21	6.2	0.24	324.7	22.09	0.27	8.7	6253.1	21.28	sitosterol
5	0.27	8.9	0.29	61.9	4.21	0.31	23.8	1009.7	3.44	unknown *
6	0.31	24.4	0.32	40.5	2.75	0.33	25.1	452.1	1.54	cycloartenol
7	0.33	27.4	0.34	95.2	6.48	0.36	1.7	1190.0	4.05	unknown *
8	0.50	0.2	0.58	52.2	3.55	0.66	1.7	2833.1	9.64	unknown *
9	0.93	0.2	0.98	54.5	3.71	1.00	0.3	1305.0	4.44	squalene

Трек 1. Ситостерин , St₁



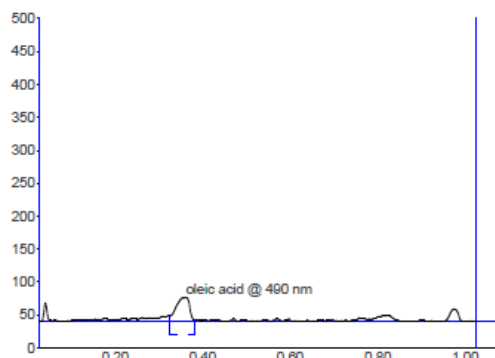
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.20	4.1	0.24	456.5	100.00	0.28	4.2	9880.3	100.00	sitosterol

Трек 3. Циклоартенол , St₂



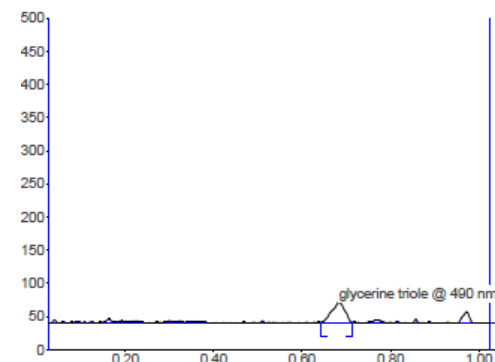
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.29	6.6	0.32	381.2	100.00	0.37	2.9	5331.9	100.00	cycloartenol

Трек 5. Олеиновая кислота , St₃



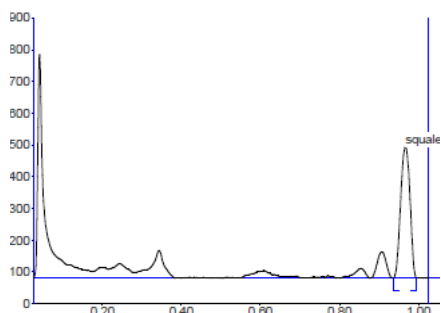
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.33	8.2	0.36	36.9	100.00	0.38	2.4	928.7	100.00	oleic acid

Трек 7. Триолеин , St₄



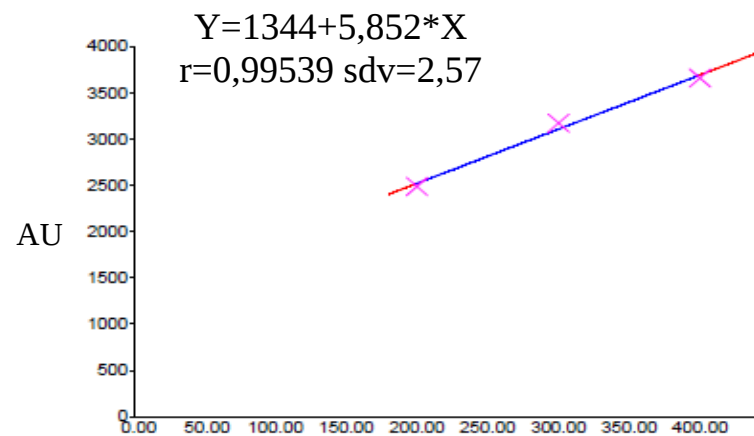
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.64	1.1	0.69	32.1	100.00	0.72	1.5	804.4	100.00	glycerine triole

Трек 7. Сквален , St₅

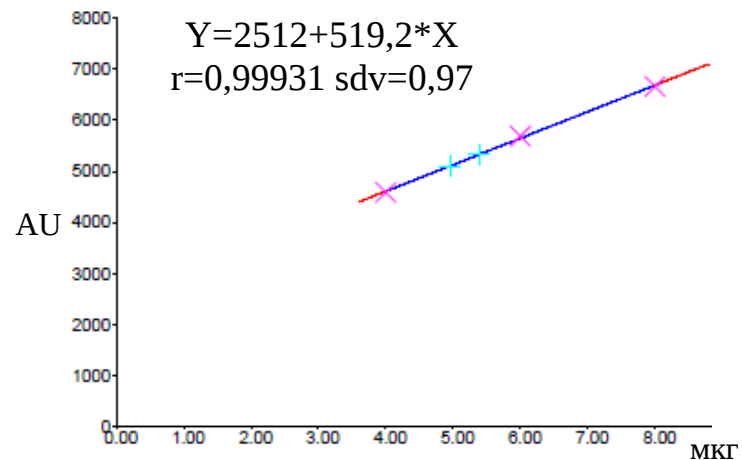


Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.94	1.1	0.97	413.5	100.00	1.00	1.0	8171.1	100.00	squalene

Калибровочный график построенные по площади пика для терпеноидов в количестве 0,2;0,3;0,4 нг



Калибровочный график построенные по площади пика для жирной кислоты в количестве 4,6,8 мкг



Калибровочный график построенные по площади пика для углеводорода (сквален) в количестве 4,6,8 мкг

