



УДК 581.133.032

Газохроматографический анализ свободных жирных кислот митохондрий растений кукурузы при действии гипоксии

Ершова А.Н.¹, Тюрина И.В.²¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный педагогический университет», Воронеж² ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 8.11.2018 г.

DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/622>

Разработан метод выделения свободных жирных кислот митохондрий растений путем перевода в калийные соли и метилирования диазометаном. Газохроматографический анализ метиловых эфиров жирных кислот показал, что доминирующими среди свободных жирных кислот были пальмитиновая (C16:0) и линолевая кислоты (C18:2). При гипоксии и, особенно при действии CO₂ на проростки кукурузы, отмечалось увеличение содержания пальмитолеиновой (C16:1) и линолевой кислот (C18:2), что приводило к повышению ненасыщенности (u/s). Предполагается, что это является результатом распада фосфолипидных компонентов мембран митохондрий, что вызывает нарушение их функционирования в условиях гипоксического стресса.

Ключевые слова: митохондрии, жирные кислоты, газожидкостная хроматография, проростки кукурузы, гипоксия, CO₂-среда

Gas chromatographic analysis of free fatty acids of maize mitochondria under hypoxia

Ershova A.N.¹, Tyurina I.V.²¹Voronezh State Pedagogical University, Voronezh²Voronezh State University, Voronezh

Formation and metabolism of free fatty acids of mitochondria could characterize the condition of membrane phospholipid components and thus functioning of these organoids in different environment. Production of free fatty acids in mitochondria of maize seedlings under short-term (3-24h) hypoxic stress and CO₂-media was studied. Mitochondria was extracted by differential centrifugation method. Fraction purity was controlled by an enzyme of cytochrome oxidase. Method for extraction of free fatty acids from plant mitochondria by conversion into potassium salts and methylation by diazomethane has been developed. Gas-chromatographic analysis of fatty acid methyl esters showed the dominance of palmitic (C16:0) and linoleic (C18:2) acids with content of 14.65% and 20.75% respectively of total acids. Under hypoxia and especially under CO₂ there was an increase of palmitoleic (C16:1) and linoleic (C18:2) acids in maize seedlings. The noted changes of increase in unsaturation of free mono- and diene fatty acids in mitochondria were observed starting 9h of hypoxia and carbon dioxide media and till the end of experiment. This resulted in raised unsaturation (u/s) of free fatty acids of mitochondria from 1.14 to 1.21 and from 1.00 to 1.56 respectively. Assumed, that phospholipid destruction of mitochondria membrane in plants under oxygen deficit could result in free fatty acid accumulation in this cell organoids. More significant changes in mitochondrial fund of free fatty acids were observed in plants exposed in CO₂-media. This proves the assumption that specific effect of carbon dioxide on plants is not only linked to its role of competitive inhibitor of enzymes but also because it involves changes in activity of several membrane-bound enzymes by affecting destruction of membrane

phospholipids. Also, along with biochemical reorganization of mitochondrial membranes in seedlings under high concentrations of CO₂ there should be particular changes in their ultrastructure.

Keywords: mitochondria, fatty acids, gas-liquid chromatography, maize seedlings, hypoxia, CO₂-media

Введение

В ряде работ было показано, что свободные жирные кислоты могут выступать высокоэффективными регуляторами структурного состояния и фосфорилирующей активности митохондрий [1,2]. Накопление свободных жирных кислот наблюдается при воздействиях на растения неблагоприятных условий внешней среды, таких как низкие температуры, инфекция [3,4]. Образование свободных жирных кислот обычно связано с превращением фосфолипидов [5]. В тоже время некоторая часть образовавшихся в клетке свободных жирных кислот может использоваться как на синтез нейтральных липидов и фосфолипидов, так и переноситься из одного вида липидов в другие [5].

Предполагается, что способность растений адаптироваться к экстремальным условиям в значительной степени обусловлена теми сдвигами, которые происходят в мембранах их клеток [6]. В то же время показано, что наиболее чувствительной частью растительной клетки являются митохондрии. Поэтому изменения состояния митохондрий и, в частности, их мембран относят к одному из механизмов "срочной" адаптации клетки к тому или иному воздействию [6]. Образование и метаболизм свободных жирных кислот митохондрий могут характеризовать состояние фосфолипидных компонентов мембран а, следовательно, и функционирование этих органоидов. Исследование образования свободных жирных кислот в митохондриях проводится крайне редко, в отличие от фосфолипидных компонентов мембран, в связи со сложностью их выделения и анализа. Изучение состава свободных жирных кислот митохондрий растений при действии гипоксического стресса и высоких концентраций диоксида углерода практически не проводилось.

В связи этим целью работы была разработка метода выделения свободных жирных кислот митохондрий и изучение их состава у растений в условиях кратковременного гипоксического стресса и CO₂-среды.

Эксперимент

В качестве объекта исследования были выбраны проростки кукурузы (Воронежская 76), выращенные методом гидропоники. Этиолированные проростки без корней и семядолей помещали на 3-24 часа в затемненные вакуум-эксикаторы, через которые пропускали разные газовые среды: воздух (контроль), азот (содержание кислорода 0.5% v/v) и углекислый газ (из баллонов).

Для выделения митохондрий растительную навеску гомогенизировали с пятикратным объемом 0.4 М раствора сахарозы в трис-НСl буфере, рН 7.8, содержащим 2 мМ раствор ЭТДА и 0.1% альбумин. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. Осадок клеточных стенок отбрасывали и супернатант центрифугировали при 8000 об/мин (7 мин). Полученный осадок был обогащен хлоропластами. Для получения митохондриальной фракции надосадочную жидкость снова центрифугировали при 14500 об/мин в течение 15 минут. Осадок переносили в 2 см³ среды очистки (0.4 М сахароза, 0.25 М трис-НСl буфер рН 7.4) и с помощью тefлонового гомогенизатора осторожно переводили в гомогенное состояние. Операцию проделывали дважды. Объем полученной суспензии митохондрий составлял 4 см³. Все операции проводили на холоде при +4°C. В

качестве маркерного фермента митохондрий определяли активность цитохромоксидазы (КФ. 1.9.3.1) по скорости падения оптической плотности раствора при 550 нм за счет окисления восстановленного цитохрома «с» цитохромоксидазой. Активность фермента рассчитывали по уменьшению логарифма молярной концентрации восстановленного цитохрома «с» в единицу времени [7].

Липиды экстрагировали после фиксации проб кипящим изопропанолом смесью гексан: изопропанол (3:2) в присутствии антиоксиданта ионола (0.001%) для предотвращения окисления липидов. Для отделения водорастворимых примесей экстракт обрабатывали 1% Na₂SO₄. Верхний гексановый слой, содержащий липиды, упаривали на роторном испарителе. Липиды растворяли в 2-3 см³ хлороформа [8]. Была разработана методика, позволяющая использовать одну пробу для анализа как свободных жирных кислот, так и для определения жирнокислотного состава липидов. К липидному экстракту добавляли двойной объем 0.05Н калийной щелочи, после перемешивания (1-2 мин) приливали изопропанол (3-4 капли) и центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин.. Верхний слой, содержащий свободные жирные кислоты в виде калийных солей, отмывали петролейным эфиром (дважды по 2 см³) и подкисляли 15% HCl до pH 2.0. Свободные жирные кислоты экстрагировали петролейным эфиром (3 раза по 3 см³) и полученный экстракт упаривали в токе азота.

Метилирование жирных кислот проводили с использованием диазометана, который получали в замкнутой системе добавлением по каплям 0.5 см³ хлороформа к 1.25г гидроксида калия, 0.5 см³ гидразин-гидрата и метанола. Образовавшийся диазометан током сухого воздуха направляли в пробирку, содержащую жирные кислоты, растворенные в гексане. Избыток диазометана поглощался 30% уксусной кислотой. Об окончании метилирования судили по образованию стойкой желтой окраски раствора. Объем пробы метиловых эфиров жирных кислот доводили до 0.5 -1.0 см³ продуванием тока азота. [9].

Метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Chrom 42» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором и колонкой 2.5м, заполненной 10% полиэтиленгликольсукцинатом на хроматоне N-AW («Chemapol», Чехия). Температура камеры испарения составляла 220°C, термостата – 190°C. Скорость газа носителя (гелия) и водорода составляла 40 см³/мин, воздуха - 300 см³/мин [8,9].

Пики метиловых эфиров жирных кислот идентифицировали по времени удерживания на колонке и в сравнении со стандартным набором метиловых эфиров жирных кислот. Первый набор включал метиловые эфиры миристиновой (C 14:0), пальмитиновой (C16:0), стеариновой (C18:0), олеиновой (C18:1) и линолевой (C18:2) кислот («Serva», Германия), вторым - была стандартная смесь K-101 Mixture Zot 1314 («Sigma», США), включающая метиловые эфиры каприновой (C10:0), лауриновой (C12:0), миристиновой (C14:0), пальмитиновой (C16:0), стеариновой (C18:0) и арахидиновой (C20:0) кислот. Содержание жирных кислот выражали в относительных величинах, рассчитывали по площади пиков и выражали в % от суммы площадей всех обнаруженных кислот по показаниям детектора прибора.

Определения проводили в двух биологических и двух аналитических повторностях. В таблицах и на графиках представлены данные одного из типичных опытов в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений.

Обсуждение результатов

Среди свободных жирных кислот митохондрий проростков кукурузы (рис.1) были обнаружены те же жирные кислоты, что и в составе фосфолипидов митохонд-

риальных мембран [8] и это совпадало с результатами других исследователей [4]. Доминирующими среди свободных жирных кислот были пальмитиновая (C16:0) и линолевая кислоты (C18:2), содержание которых составляло 14.65% и 20.75% от суммы всех кислот (табл.1).

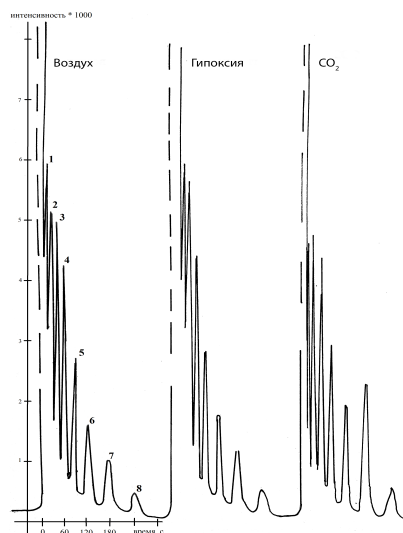


Рис. 1. Хроматограмма свободных жирных кислот митохондрий проростков кукурузы в разных газовых средах: 1–лауриновая (C12:0), 2–миристиновая (C 14:0), 3–пальмитиновая (C16:0), 4–пальмитолеиновая (C16:1), 5–стеариновая (C18:0), 6–олеиновая (C18:1), 7–линолевая (C18:2), 8–арахиновая (C20:0)

Таблица 1. Свободные жирные кислоты митохондрий проростков кукурузы при различных условиях газового состава среды (% от суммы)

Вариант	Жирные кислоты					
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:2	20:0
Воздух						
3 ч	7.20±0.10	14.65±0.15	18.42±0.14	12.70±0.20	20.75±0.85	6.93±0.21
6 ч	8.85±0.75	15.15±0.75	17.08±0.52	13.80±0.24	19.56±0.14	5.24±0.42
9 ч	7.09±0.21	14.95±0.15	17.94±0.26	12.95±0.75	20.51±0.18	6.05±0.45
24 ч	8.15±0.35	16.99±0.41	17.43±0.53	13.10±0.30	19.47±0.43	5.95±0.62
Гипоксия						
3 ч	10.20±0.80	14.80±0.30	19.05±0.15	12.05±0.25	23.26±0.13	7.35±0.15
6 ч	8.50±0.34	16.00±0.40	19.50±0.50	11.73±0.33	21.16±0.38	8.15±0.15
9 ч	9.75±0.05	19.80±0.30	19.85±0.25	10.20±0.40	21.47±0.50	7.20±0.64
24 ч	6.48±0.12	20.50±0.50	21.43±0.17	10.30±0.74	23.56±0.14	9.10±0.40
CO ₂						
3 ч	7.75±0.85	18.80±0.20	19.10±0.50	13.05±0.45	20.50±0.46	7.50±0.30
6 ч	6.35±0.15	20.40±0.41	20.93±0.73	11.85±0.85	22.30±0.25	7.73±0.27
9 ч	5.35±0.15	21.45±0.75	22.00±0.20	11.41±0.39	24.03±0.27	8.13±0.20
24 ч	3.35±0.55	24.08±0.52	25.95±0.15	5.43±0.61	28.50±0.80	9.60±0.16

В условиях модифицированных газовых сред в митохондриях растений изменялось соотношение отдельных групп свободных жирных кислот. Как в атмосфере азота, так и CO₂ почти на 50% снижалось содержание стеариновой (C18:0) и миристиновой (C14:0) кислот. При этом увеличивалось содержание пальмитиновой (C16:0) кислоты. Однако действие атмосферы углекислого газа проявлялось в этом случае сильнее и раньше, чем влияние обычного дефицита кислорода (табл.1). Одновременно в митохондриях проростков при гипоксии произошло значительное увеличение содержания ненасыщенных свободных жирных кислот – пальмитолеиновой

(C16:1) и линолевой (C18:2), что совпадает с данными, полученными для митохондрий корней кукурузы [10]. Однако в большей степени это увеличение было характерно для проростков, находившихся в среде CO₂, чем в атмосфере инертного газа, что отражалось на отношении ненасыщенные/насыщенные жирные кислоты в этих вариантах опыта (табл.2).

Таблица 2. Содержания основных групп свободных жирных кислот митохондрий проростков кукурузы при действии гипоксии и CO₂-среды (% от суммы кислот, U- ненасыщенные кислоты, S- насыщенные кислоты)

Вариант	Свободные жирные кислоты		
	U	S	U/S
Воздух			
3 ч	39.2	34.2	1.13
6 ч	36.6	41.8	0.89
9 ч	38.5	35.1	1.09
24 ч	37.9	37.2	1.02
Гипоксия			
3 ч	42.4	37.1	1.14
6 ч	40.7	36.3	1.12
9 ч	41.4	36.6	1.11
24 ч	45.0	37.3	1.21
CO ₂ -среда			
3 ч	39.6	39.6	1.00
6 ч	43.2	38.6	1.12
9 ч	46.1	38.2	1.20
24 ч	52.5	33.4	1.56

Отмеченные изменения по возрастанию уровня ненасыщенности свободных моно- и диеновых жирных кислот митохондрий, особенно были заметны начиная с 9 часов воздействия как гипоксии, так и среды углекислого газа и сохранялись до конца опыта. К концу 24-часовой экспозиции проростков в условиях дефицита кислорода и повышенного содержания углекислоты соотношение u/s возросло с 1.14 до 1.21 и с 1.00 до 1.56 соответственно. Увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот в митохондриальном фонде отмечалось ранее и при действии на растения других стрессов, например, низкой температуры [1,4]. Однако в большей степени при этом среди свободных ненасыщенных жирных кислот накапливались кислоты C16-ряда. В случае же действия гипоксии в корнях происходило увеличение содержания олеиновой и линолевой кислот, т.е. кислот C18-ряда [10]. Роль повышения ненасыщенности свободных жирных кислот в условиях гипотермии или дефицита кислорода пока еще не ясна. Однако предполагается, что действие температуры также может быть опосредовано содержанием кислорода в митохондриях [1]. Усиление образования свободных жирных кислот может быть связано как с изменением скорости обмена [10], так и с усилением распада фосфолипидных компонентов мембран под действием фосфолипаз, что неоднократно отмечалось при действии различных стрессов на растения [4,6].

Заключение

Проведенные нами исследования показали, что в распределении насыщенных и ненасыщенных жирных кислот среди свободных кислот митохондрий проростков, экспонированных в разных газовых средах, наблюдались значительные изменения.

При этом увеличение содержания таких свободных жирных кислот, как пальмитиновая, пальмитолеиновая и линолевая, сопровождалось уменьшением их количества в фосфолипидах мембран митохондрий, как это было показано ранее [8]. Очевидно, именно деструкция фосфолипидов мембран митохондрий у растений в условиях дефицита кислорода могла приводить к накоплению свободных жирных кислот в этих органоидах клетки. В то же время нельзя исключить и возможность влияния газовых сред на скорость процессов межмолекулярного обмена жирных кислот между фондами свободных и связанных в фосфолипидах митохондрий. Эти процессы осуществляются соответствующими ацилтрансферазами..

Более значительные изменения в фонде свободных жирных кислот митохондрий происходили у растений, экспонированных в среде CO_2 . Среда высоких концентраций диоксида углерода в большей степени, чем инертные газы, уменьшала и ненасыщенность фосфолипидов мембран митохондрий, как это было показано нами ранее [8]. Как известно [5,6], уменьшение ненасыщенности жирных кислот приводит к более плотной упаковке фосфолипидов в мембране, снижению подвижности жирных кислот, увеличению жесткости мембран, что вызывает изменение их проницаемости. Локальные же изменения липидного состава мембран под влиянием различных факторов представляются и как один из механизмов аллостерического контроля над деятельностью отдельных групп ферментов [8]. Таким образом, специфичность действия двуокиси углерода на растения связана не только с тем, что он выступает в роли конкурентного ингибитора ряда ферментов [9], но, вызывая значительные нарушения в липидных компонентах биологических мембран, определяет и специфические изменения активности ряда мембраносвязанных ферментов растений.

На особенности функционирования митохондрий проростков, находящихся в атмосфере повышенного содержания углекислого газа, должно сказываться и накопление в фонде свободных жирных кислот большего, чем при обычном дефиците кислорода, количества полиненасыщенных жирных кислот. Увеличение содержания свободных жирных кислот в митохондриях, особенно ненасыщенных, отмечается при действии и других факторов среды [1,3]. При этом показано, что именно свободные жирные кислоты снижают электрический потенциал митохондрий, разобщают процессы окисления и фосфорилирования [2]. Хотя механизм разобщающего действия свободных жирных кислот на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях еще не ясен, однако то, что именно в среде CO_2 у растений должны наблюдаться и большие, по сравнению с обычным анаэробизмом, изменения электрического потенциала митохондрий, становится уже очевидным.

Свободные жирные кислоты с длинной углеводной цепью обладают детергеноподобным действием и могут усиливать реакции ПОЛ [1]. Активация процессов ПОЛ была ранее показана для митохондрий проростков кукурузы при действии условий кратковременной (до суток) гипоксии [8,11]. Можно предположить, что в активации процессов ПОЛ в митохондриях растений при гипоксии важную роль играет не только нарушение работы ЭТЦ-дыхания за счет сбоя в отсутствии конечного акцептора кислорода, но и накопление свободных жирных кислот вследствие усиления процессов деструкции фосфолипидов.

Вызывая изменения в содержании ненасыщенных и насыщенных свободных жирных кислот митохондрий за счет деструкции фосфолипидных компонентов мембран в большей степени, чем обычный дефицит кислорода, углекислый газ мог существенно изменять и проницаемость мембран, что отражалось на их функционировании. Как известно [12] у растений в анаэробных условиях наблюдаются изменения ультраструктуры митохондрий. Можно предположить, что и при действии на растения повышенных концентраций углекислого газа наряду с биохимической пере-

стройкой мембран митохондрий должно происходить изменение их ультраструктуры.

Список литературы

1. Войников В.К. Температурный стресс и митохондрии растений. Новосибирск. Наука. 1987. 134 с.
2. Petruzza E., Braidot E., Nady G. // *FEBS Lett.* 1992. Vol. 307. No 3, pp. 267-271.
3. Pukaski P. // *Physiol. Plantarum.* 1990. Vol. 79. No 2. pp. 105-106.
4. Vojnicov V.K., Luzova G.B., Korzun A.M. // *Planta.* 1983. Vol. 158. No 1. pp. 194-198.
5. Harwood J.L. // *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 1988. Vol. 39. pp. 101-138.
6. Чиркова Т.В., Вальтер Т., Леффлер С., Новицкая Л.Д. // *Физиология растений.* 1995. Т.42. № 3. С. 368-376.
7. Ершова А.Н. // *Цитология.* 2001. Т.43. № 4. С. 346-347.
8. Землянухин А.А., Ершова А.Н. // *Доклады АН СССР.* 1986. Т. 281. № 3. С. 762-764.
9. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. Воронеж. Воронеж. гос. ун-т. 2007. 264 с.
10. Гринева Г.М., Брагина Т.В. // *Физиология растений.* 1993. Т.40. № 4. С. 662-667.
11. Ершова А.Н., Бердникова О.С. // “Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды”, сборник материалов Всерос. конференции с междунар. Участием, 10-15 июля 2018г. Иркутск. 2018. С. 312-315. DOI: 10.1093/aob/mcf244, available at: www.sifibr.irk.ru
12. Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P., Polyakova L.I. et al. // *Annals of Botany*, 2003. Vol. 91. No 2. pp. 155-172. DOI: 10.1093/aob/mcf244, available at: www.aob.oupjournals.org

References

1. Vojnicov V.K., Temperaturnyj stress i mitohondrii restenij., Novosibirsk, Nauka Publ., 1987, 134 p.
2. Petruzza E., Braidot E., Nady G., *FEBS Lett.*, 1992, Vol. 307, No 3, pp. 267-271.
3. Pukaski P., *Physiol. Plantarum*, 1990, Vol. 79, No 2, pp. 105-106.
4. Vojnicov V.K., Luzova G.B., Korzun A.M., *Planta*, 1983, Vol. 158, No 1, pp. 194-198.
5. Harwood J.L., *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 1988, Vol. 39, pp. 101-138.
6. Chirkova T.V., Valter T., Leffler C., Novitskaya L.D., *Fiziologiya rasteniy*, 1995, Vol. 42, No 3, pp. 368-376.
7. Ershova A.N., *TSitologiya*, 2001, Vol.43, No 4, pp. 346-347.
8. Zemlyanukhin A.A., Ershova A.N., *Doklady AN SSSR*, 1986, Vol. 281, No 3, pp. 762-761
9. Ershova A.N. *Metabolicheskaya adaptatsiya rastenij k gipoksii i povyshennomu sodержaniyu dioksida ugleroda.* Voronezh, Voronezh State Univ. Publ., 2007, 264 p.
10. Grineva G.M., Bragina T. V., *Fiziologiya rasteniy*, 1993, Vol. 40, No 4, pp. 662-667.
11. Ershova A.N., Berdnikova O.S. “Mechanisms of resistance of plants & microorganisms to unfavorable environmental”, Proceedings of All-Russian Scientific Conference with International Participation, July 10-15, 2018, Irkutsk, 2018, pp. 312-315. DOI: 10.1093/aob/mcf244, available at: www.sifibr.irk.ru
12. Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P., Polyakova L.I. et al., *Annals of Botany*, 2003, Vol. 91, No 2, pp. 155-172. DOI: 10.1093/aob/mcf244, available at: www.aob.oupjournals.org

Ершова Антонина Николаевна - профессор, д.б.н., заведующая кафедрой биологии растений и животных, Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж

Тюриня Ирина Владимировна – студент, Воронежский государственный университет, Воронеж

Ershova Antonina N. – professor, grand PhD (biology), department of plant and animal biology Chair, Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, email: aershova@vspu.ac.ru

Tyurina Irina V. – student, Voronezh State University, Voronezh