

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт

Кафедра водных и наземных экосистем  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_  
Подпись      инициалы, фамилия

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_ \_\_ г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Оценка синтеза физиологически ценных жирных кислот в нескольких тканях хариуса (род *Thymallus*) на основе биохимического и генетического анализов

тема

06.04.01 – «Биология»

код и наименование направления

06.04.01.04 – «Гидробиология и ихтиология»

код и наименование магистерской программы

Руководитель	_____	_____ проф, д.б.н.	<u>О. Н. Кормилец</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Ш. А. Султонов</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	_____ с.н.с., к.б.н.	<u>М. Ю. Трусова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2023

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Оценка синтеза физиологически ценных жирных кислот в нескольких тканях хариуса (род *Thymallus*) на основе биохимического и генетического анализов» содержит 111 страниц текстового документа, 13 иллюстраций, 12 таблиц и 69 использованных источников.

Ключевые слова: ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, АРАХИДОНОВАЯ КИСЛОТА, ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВАЯ КИСЛОТА, ДОКОЗАГЕКСАЕНОВАЯ КИСЛОТА, ХАРИУС БАЙКАЛЬСКИЙ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, ЭЛОНГАЗЫ, ДЕСАТУРАЗЫ.

Объектом исследования являлся хариус байкальский (*Thymallus baicalensis* Dybowski, 1874).

Цель работы: обнаружить синтез физиологически ценных жирных кислот в нескольких тканях и органах хариуса (род *Thymallus*), различающихся по спектрам питания.

Были выделены липиды и определено абсолютное и относительное содержание жирных кислот различных органов и тканей хариуса (мозг, жировая ткань, печень, мышцы, сердце). Проведено выделение РНК из этих же органов и тканей хариуса. Осуществлен анализ относительной экспрессии генов элонгаз (*elovl2*, *elovl5*) и десатураз (*fads2Δ5*, *fads2Δ6*), участвующих в синтезе длинноцепочечных ПНЖК.

ЖК состав жировой ткани показал различия спектров питания хариусов из разных рек, но при этом сходные высокие уровни ЭПК и ДГК, что косвенно указывает на собственный синтез этих кислот. Экспрессия целевых генов была обнаружена во всех тканях, но особенно высокой она была в печени и мозге, в десятки раз превышая значения во всех остальных образцах. Вероятно, синтез ЭПК и ДГК у байкальского хариуса происходит главным образом, в печени и мозге.

# СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Структура липидов .....	7
1.2. Значение липидов .....	9
1.2.1. Роль липидов в организме .....	9
1.2.2. Маркёрное значение жирных кислот.....	14
1.3. Источник ПНЖК для человека .....	19
1.4. Биосинтез жирных кислот .....	20
1.4.1. Общий синтез ЖК.....	20
1.4.2. Биоконверсионные возможности рыб .....	30
1.5. ПНЖК в водных экосистемах .....	42
1.5.1. Жирнокислотный состав продуцентов и их роль в трофических цепях водных экосистем .....	42
1.5.2. Первичные консументы.....	46
1.5.3. ЖК состав рыб .....	51
1.6. Факторы, влияющие на ЖК состав рыб.....	55
1.6.1. Роль питания в формировании ЖК состава .....	55
1.6.2. Другие факторы .....	58
1.7. Характеристика хариуса .....	64
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	66
2.1. Район и объект исследования .....	66
2.2. Жирнокислотный анализ .....	67
2.3. Генетический анализ .....	69
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	76
3.1. Результаты биохимического анализа .....	76
3.2. Результаты генетического анализа .....	92
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	97
ВЫВОДЫ.....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	105

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛК – альфа-линоленовая кислота

АПБ – ацил переносящий белок

АРК – арахидоновая кислота

ВНЖК – высоко ненасыщенные жирные кислоты

ДГК – докозагексаеновая кислота

ДПК – докозапентаеновая кислота

ДЦ-ПНЖК – длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты

ЖК – жирные кислоты

КЦ-ПНЖК – короткоцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты

ЛК – линолевая кислота

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты

НЖК – насыщенные жирные кислоты

НМР – неметилен-разделённые

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПНЖК С16, С18, С20, С22, С24 – полиненасыщенные жирные кислоты с 16, 18, 20, 22, 24 атомами углерода в цепочке соответственно

СЖК – синтаза жирных кислот

ТАГ – триацилглицерины

ЭПК – эйкозапентаеновая кислота

n-3 – ПНЖК семейства омега-3

n-6 – ПНЖК семейства омега-6

## ВВЕДЕНИЕ

Живые организмы состоят из углеводов, белков, жиров, нуклеиновых кислот и ряда минеральных веществ. Эти компоненты поступают с пищей или синтезируются организмами. Животные основную часть веществ получают из пищи. И если нехватку углеводов в рационе животные, как правило не испытывают, незаменимые аминокислоты легко восполняются разнообразной смешанной диетой, а в специфических нуклеиновых кислотах нет нужды, то недостаток некоторых липидов, а именно, полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), восполнить гораздо сложнее. Это связано с тем, что две ПНЖК – линолевую (18:2n-6, ЛК) и альфа-линоленовую (18:3n-3, АЛК), животные, за редким исключением, не могут синтезировать, а соответственно, дальнейший синтез *de novo* более длинных с большим количеством двойных связей ПНЖК у них невозможен. Из ЛК и АЛК синтезируются длинноцепочечные ПНЖК семейств омега-6 и омега-3, а именно, арахидоновая (20:4n-6, АРК), эйкозапентаеновая (20:5n-3, ЭПК) и докозагексаеновая (22:6n-3, ДГК) кислоты, которые выполняют жизненно важные функции в организме.

В настоящее время человечество испытывает острый дефицит ПНЖК в рационе (Гладышев и др., 2018). Основным пищевым источником омега-3 ПНЖК для человека являются рыбы. Природные рыбные запасы не безграничны. Мировые уловы достигли максимума (~100 млн т/год) и не могут быть существенно увеличены (Гладышев, 2021), а поэтому активно развивается отрасль аквакультуры, где рыбы выращиваются в отрыве от естественной среды обитания. Рыбы, как и все позвоночные, не способны сами синтезировать ПНЖК *de novo*, а потому должны получать их из своей пищи. Современные рыбные корма базируются на рыбной муке и рыбьем жире, добываемые из промысловых уловов (76% общего улова или >1 млн т рыбы). Поглощая кормовые ПНЖК большая часть из них расходуется в процессе метаболизма на внутренние физиологические процессы, из чего

следует, что аквакультура является не производителем, а потребителем ПНЖК (Гладышев, 2021). К тому же изменчивая доступность морских ингредиентов, устойчивый рост цен на них и увеличение мирового производства продукции аквакультуры привели к необходимости их частичной замены ингредиентами наземного происхождения, такими как растительные масла, что непременно сказывается на конечном содержании ПНЖК в рыбе, снижая количество длинноцепочечных ПНЖК семейства омега-3 в мышцах рыбы и, следовательно, ее пищевую ценность для потребителей (Galindo и др., 2021).

Известно, что несмотря на то, что рыбы не способны синтезировать ПНЖК *de novo*, определённые пути биосинтеза физиологически ценных АРК, ЭПК и ДГК у них имеются. Используя ЛК и АЛК из пищи, они способны достраивать их до АРК, ЭПК и ДГК. Способность к такому биосинтезу у разных видов рыб разная и зависит от множества факторов. Таким образом, разведение видов рыб с высокой способностью к биосинтезу ценных длинноцепочечных ПНЖК из их короткоцепочечных предшественников, содержащихся в большом количестве в растительных маслах, сейчас рассматривается как ценная устойчивая стратегия для индустрии аквакультуры (Galindo и др., 2021). Тем самым можно превратить выращиваемую рыбу из потребителя ПНЖК в их производителя (Гладышев, 2021).

Цель работы: обнаружить синтез физиологически ценных жирных кислот в нескольких тканях и органах хариуса (род *Thymallus*), различающихся по спектрам питания.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- Определить состав и содержание жирных кислот в исследуемых тканях и органах хариуса;

- Оценить относительную экспрессию генов ферментов, участвующих в биосинтезе физиологически ценных ПНЖК в исследуемых тканях и органах хариуса.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структура липидов

Липиды – это разнообразная по строению группа биоорганических веществ, общей особенностью которых является их нерастворимость в воде (Nelson и Cox, 2012). Они хорошо растворяются в неполярных и малополярных растворителях: ацетоне, спирте, хлороформе и прочих. Липиды по способности к гидролизу делятся на две большие группы: омыляемые (сложные эфиры спиртов и жирных кислот: триглицериды, фосфолипиды и т. д.) и неомыляемые липиды (холестерин, витамины А, Е, Д, К и т.д.). Большую часть омыляемых липидов составляют **жирные кислоты (ЖК)**.

**Жирными кислотами** называются карбоновые кислоты с углеводородной цепью длиной от 4 до 36 атомов углерода, на одном конце которой находится карбоксильная (кислотная) группа (COOH), а на другом – метильная группа (CH<sub>3</sub>) (Nelson и Cox, 2012). Цепочки ЖК обычно имеют **чётное число атомов углерода и линейную структуру с цис-конфигурацией**, хотя ЖК с нечётным числом атомов углерода и разветвленной структурой с транс-конфигурацией также встречаются в природе (Mougoig, 2022). Жирные кислоты присутствуют в организмах в виде сложных эфиров (например, триацилглицерины) и служат структурными элементами запасных и мембранных липидов. Жирные кислоты отличаются друг от друга количеством атомов углерода, количеством двойных связей между атомами углерода и наличием заместителей, например, метильных и гидроксильных. Количество двойных связей определяет пространственную структуру (степень скрученности) молекулы, чем больше двойных связей в

молекуле ЖК, тем сильнее закручивается углеродная цепь, приближаясь по форме к спирали (Гладышев, 2012).

В зависимости от количества двойных связей жирные кислоты делят на насыщенные (НЖК) (без двойных связей) и ненасыщенные. А уже ненасыщенные жирные кислоты в свою очередь делят на мононенасыщенные (МНЖК) (с 1 двойной связью) и полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) (с 2 и более двойными связями) (Рисунок 1), среди которых выделяют высоко ненасыщенные жирные кислоты (ВНЖК) (с 4 и более двойными связями).

В зависимости от длины углеродной цепи жирные кислоты подразделяют на короткоцепочечные жирные кислоты (до 20 углеродов) и длинноцепочечные жирные кислоты (от 20 и больше углеродов). Среди ПНЖК наиболее важную физиологическую роль играют именно длинноцепочечные высоко ненасыщенные жирные кислоты (ДЦ-ВНЖК) (Galindo, 2021).

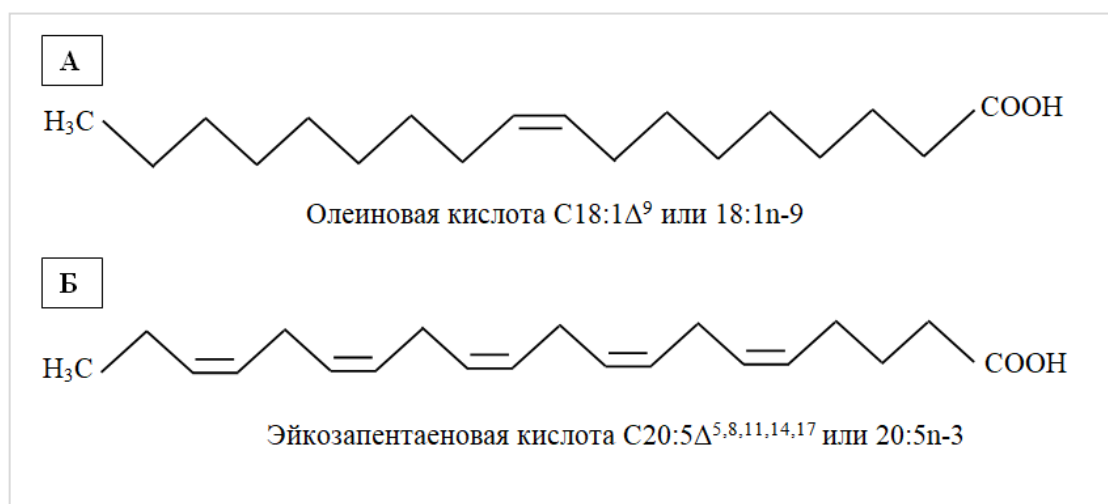


Рисунок 1 – Номенклатура жирных кислот. А) Пример мононенасыщенной жирной кислоты, олеиновая кислота; Б) Пример полиненасыщенной жирной кислоты, эйкозапентаеновая кислота.



Наиболее часто используемая и международно-признанная система номенклатуры определяется «Международным союзом теоретической и прикладной химии» (IUPAC). Система  $n-x$  (« $\omega x$ » или «омега- $x$ ») устанавливает, что ЖК можно идентифицировать по следующей формуле:  $C:D n-x$ , где  $C$  = длина цепи,  $D$  = количество этиленовых/двойных связей, и  $n - x$  (или  $\omega x$ ) указывает положение первой ненасыщенности, считая от метильного конца молекулы.  $C:D n-x$  номенклатура одинакова для НЖК и МНЖК, поскольку она конкретно обозначает число углерода и ненасыщенности, а для МНЖК ещё и расположение двойной связи. Точно так же эта номенклатура широко используется для ПНЖК (Monroig и др., 2022). Двойные связи полиненасыщенных жирных кислот почти никогда не сопряжены (чередуются одинарные и двойные связи, как в  $-CH=CH-CH=CH-$ ), а разделены метиленовой группой:  $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$  (Nelson и Cox, 2012). Это относится к подавляющему большинству физиологически значимых ПНЖК в липидном метаболизме животных. Однако некоторые ПНЖК имеют двойные связи, которые не всегда прерываются метиленовой группой, поэтому  $n-x$  номенклатура не может установить конкретное положение всех двойных связей. Такие атипичные ПНЖК обычно называют «неметилен-разделённые» (НМР) жирными кислотами и обычно обнаруживают в липидах морских беспозвоночных. В таких случаях используется система  $\Delta u$  (дельта- $u$ ), где двойные связи нумеруются с карбоксильного конца и имеют общую формулу  $C:D \Delta u$ , где  $C$  = длина цепи,  $D$  = количество этиленовых/двойных связей, а « $u$ » указывает на положение каждой двойной связи (Monroig, 2022).

## 1.2. Значение липидов

### 1.2.1. Роль липидов в организме

Липиды играют несомненно важную роль в жизни любого организма. Без них не обходится ни одна живая клетка. Обычно содержание жиров в клетках около 10% (мембранные липиды), в адипоцидах более 80% (запасные липиды); в небольших количествах также присутствуют и другие «активные» липиды. В организме они выполняют множество функций (Nelson и Cox, 2012):

- **Жиры служат источником энергии.** Атомы углерода жирных кислот более восстановлены, чем атомы сахаров, а значит окисление триацилглицеринов дает более чем в два раза больше энергии, чем окисление углеводов. К тому же поскольку триацилглицерины являются гидрофобными и, следовательно, негидратированными, организм, который использует жир в качестве топлива, не должен нести дополнительный вес воды для гидратации, который связан с накопленными полисахаридами (2 г на грамм полисахарида).
- **Жиры могут служить источником метаболической воды.** Этим пользуются многие животные (впадающие в спячку или обитающие в пустынных экосистемах).
- **Жиры выполняют защитную и теплоизоляционную функцию.** Жировая ткань предохраняет организм от потери тепла, защищает органы от повреждений. Воски обладают защитными, водоотталкивающими свойствами, предохраняют от ультрафиолета, сохраняют эластичность и увлажненность поверхности тела.
- **Липиды выполняют структурную функцию.** Фосфо- и гликолипиды, а также стеринны входят в состав клеточных мембран. Воск образует кутикулу на поверхности листьев и стеблей, из воска пчелы строят соты.
- **Жир снижает удельный вес тела.** Водными животными используют это для увеличения плавучести.

- **Липиды служат сигнальными молекулами.** Например, **гормоны** (производные витамина D, половые гормоны), переносимые кровью из одной ткани в другую, **внеклеточные и внутриклеточные гормоноподобные вещества** (эйкозаноиды, производные фосфатидилинозитола), генерируемые в ответ на внеклеточный сигнал (гормон или фактор роста). Летучие липиды, вырабатываемые растениями, служат сигналами, которые передаются по воздуху, позволяя растениям отпугивать насекомых-вредителей и приманивать опылителей, хищных насекомых (для защиты от травоядных насекомых) или даже жертв (хищные растения).
- **Липиды функционируют как кофакторы** (витамин К) ферментов в реакциях переноса электронов в хлоропластах и митохондриях или при переносе фрагментов сахара в различных реакциях гликозилирования.
- **Липиды являются якорями для мембранных белков** (ковалентно присоединенные жирные кислоты, пренильные группы и фосфатидилинозитол)
- **Липиды с системой сопряженных двойных связей составляют пигменты**, поглощающие видимый свет. Некоторые из них действуют как светоулавливающие пигменты при зрении и фотосинтезе; другие производят естественные окраски, такие как оранжевый цвет тыквы и моркови и желтый цвет канареечных перьев.

Итак, основу большинства липидов составляют жирные кислоты. Насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты (НЖК и МНЖК) обладают низкой реакционной способностью, их биологическое значение сводится к обеспечению организма энергией (Шульгина и др., 2019). Большая часть полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) встраивается в мембраны клеток. Значительная часть клеточных процессов происходит именно на мембранах (клетки или органеллы). Метаболизм целого организма во многом определяется процессами, ассоциированными с мембранами,

свойства которых определяются составом жирных кислот (Махутова и Гладышев, 2020). Известно, что для ПНЖК характерны низкие потенциальные барьеры вращения вокруг одинарных углерод-углеродных связей, вследствие чего их углеродные цепи быстро вращаются, создавая очень высокое латеральное давление на соседние молекулы в клеточных мембранах, тем самым повышая активность мембран-связанных ферментов. Так высокое содержание докозагексаеновой (22:6n-3, ДГК) кислоты обеспечивает высокую активность фермента «натрий-калиевого насоса» - натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы), которая играет ключевую роль в создании потенциала действия в клетках (Гладышев и др., 2018). Это обеспечивает высокую эффективность восприятия светового сигнала и проведения нервного импульса (Махутова, Гладышев, 2020), вследствие чего ДГК является важной молекулой в нервных тканях (Heissenberger, 2010). Также ДГК повышает активность ферментов электрон-транспортной цепи, тем самым обеспечивая высокую скорость клеточного дыхания (Гладышев и др., 2018). Ряд исследований говорят о влиянии ДГК на текучесть мембран, противовоспалительные и окислительные эффекты (например, нейропротекция), правильное развитие нервной системы, и сенсорное функционирование (например, острота зрения) (Ebm и др., 2021).

Помимо ДГК, высокой физиологической ценностью обладают и другие длинноцепочечных ПНЖК, а именно, арахидоновая (20:4n-6, АРК) и эйкозапентаеновая (20:5n-3, ЭПК) кислоты. Из АРК и ЭПК путем ферментативного окисления производятся гормоноподобные биологически активные вещества – эйкозаноиды (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, резолвины, липоксины и др.), которые регулируют многие важнейшие физиолого-биохимические функции организма (Махутова и др., 2017). Эйкозаноиды чрезвычайно важные вещества, в отличие от настоящих гормонов, действуют только на клетки вблизи места синтеза и не транспортируются кровью для воздействия на клетки других тканей или органов, а потому почти все ткани способны к их синтезу (Nelson и Cox,

2012). Эти производные жирных кислот обладают широким спектром физиологического действия, связанным с реакцией организма на внешние раздражители, например, они оказывают влияние на свертываемость крови, иммунную реакцию, воспалительные и противовоспалительные реакции, сердечно-сосудистый тонус, почечные и нейронные функции, линочные процессы у беспозвоночных, работу репродуктивных органов и прочее (Schmitz G, 2008). При том, АРА является предпочтительным субстратом для синтеза эйкозаноидов у рыб несмотря на преобладание ЕРА в тканях рыб (Monroig и др., 2018).

Эйкозаноиды омега-6 и омега-3 являются контрегуляторами: производные АРК (простагландины и тромбоксаны второй серии, лейкотриены четвертой серии) вызывают у людей сужение сосудов, усиливают агрегацию тромбоцитов (т.е. вызывают образование тромбов и повышают артериальное давление), запускают воспалительную и аллергическую реакции, индуцируют боль; тогда как производные ЭПК (простагландины и тромбоксаны третьей серии, лейкотриены пятой серии) снижают артериальное давление, обладают противовоспалительным и антиаллергическим действием (Гладышев, 2021). Жирные кислоты n-3 конкурентно замещают в мембранах клеток и метаболических путях арахидоновую кислоту, что приводит к торможению ее превращения в простагландины, стимулирующие рост опухолей. Этим обусловлено выраженное онкопрофилактическое действие n-3 жирных кислот (Шульгина и др., 2019). Таким образом, для нормального функционирования организма человека необходим баланс соотношения омега-6/омега-3 (n-3/n-6) ПНЖК (Гладышев, 2021).

Длительное отсутствие ПНЖК в рационе приводит к симптомам дефицита, которые, как правило, у рыб включают: снижение роста и повышение смертности. Другие патологии, которые были отмечены включают миокардит, бледную / опухшую (жирную) печень, кишечные

стеатоз, эрозия, кровотечение из жабр, лордоз, снижение репродуктивного потенциала и шоковый синдром (Tocher, 2010). Снижение статуса ДГК может привести к когнитивным нарушениям и нарушения зрения (Monroig и др., 2018). Пониженное потребление данных веществ рыбами также постепенно приводит к изменению жирнокислотного состава в клеточных мембранах (Shulgina, 2019).

Известно, что омега-3 ПНЖК оказывают благоприятное воздействие на здоровье человека при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона и язвенный колит. Эпидемиологические исследования показали, что омега-3 ПНЖК обладают защитным эффектом (т.е. снижают риск) при злокачественных образованиях колоректального отдела, груди и простаты и может быть полезным при химиотерапии (Gerber, 2012). Добавки ДГК имеют положительные результаты для здоровья недоношенных детей и благотворно влияют на здоровье при некоторых психологических / поведенческих / психиатрических расстройствах, а омега-3 ПНЖК может помочь предотвратить некоторые патологические состояния, связанные с нормальным старением. (Monroig и др., 2018)

### **1.2.2. Маркёрное значение жирных кислот**

Синтез жирных кислот происходит у всех существ, причём у разных групп организмов он весьма специфичен, ввиду их особых условий обитания, занимаемых экологических ниш, трофической специализации и эволюционной истории. Специфичность синтеза жирных кислот проявляется в наличии у отдельных таксонов таких ЖК, которые не встречаются у других таксонов. В результате, жирные кислоты можно рассматривать как источник информации. В последние десятилетия жирные кислоты широко используются в качестве индикаторов пищевых взаимодействий в водных

экосистемах (Makhutova и др., 2022; Brewster и др., 2018). Применение жирных кислот в исследованиях трофических связей основано на предположении, что определенные виды/таксоны жертв обладают уникальными наборами жирных кислот, которые включаются в ткани потребителя с небольшими изменениями и предсказуемым образом (Gora и др., 2022). Кроме того, ЖК анализ даёт интегральную характеристику спектра питания потребителей в течение нескольких недель, что позволяет более точно определить рацион рыб, по сравнению с классическим гидробиологическим методом, основанном на анализе содержимого кишечника (Nielsen и др., 2018).

### Таксономические маркёры

Многие организмы, такие как бактерии, водоросли и некоторые беспозвоночные, синтезируют специфические, характерные только для них ЖК (рисунок 2).

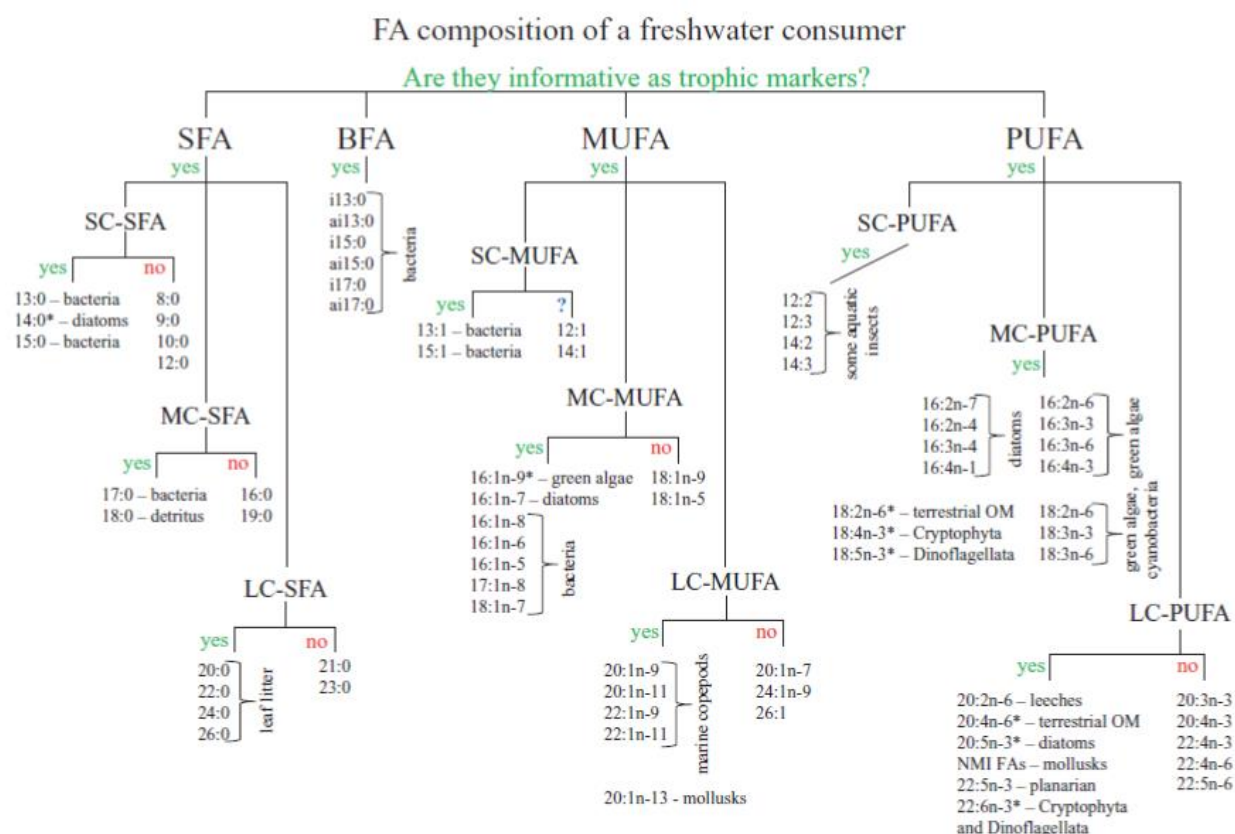


Рисунок 2 - Общие маркёры ЖК и немаркёрные часто встречающиеся ЖК у типичных представителей пресноводной фауны: SFA - насыщенные ЖК; BFA – разветвленные ЖК; MUFA – мононенасыщенные ЖК; PUFA - полиненасыщенные ЖК; SC – короткоцепочечный ЖК; MC – среднецепочечные ЖК; LC – длинноцепочечный ЖК; OM - органическое вещество. Рисунок из работы Makhutova и др., 2022.

Синтез ЖК у бактерий имеет принципиально иной механизм по сравнению с животными и растениями и, соответственно, характеризуется образованием нетипичных жирных кислот: ЖК с нечётным числом атомов углерода и их различные изомеры (циклические, цис-, транс-, изо-, антеизо-кислоты и т.д.). Общепризнанными и широко используемыми ЖК-маркёрами бактериального органического вещества в водоемах являются  $i13:0$ ,  $ai13:0$ ,  $13:0$ ,  $i15:0$ ,  $ai15:0$ ,  $15:0$ ,  $i17:0$ ,  $ai17:0$ ,  $17:0$ ,  $i17:1n-7$ ,  $18:1n-7$  (Makhutova и др., 2022). Стоит отметить, что разные группы бактерий имеют разные наборы ферментов для синтеза ненасыщенных жирных кислот, в результате чего обладают специфическими ЖК, присущими только их конкретной группе.

Для зелёных водорослей (Chlorophyta) характерен синтез ЖК семейств  $n-6$  и  $n-3$ , преимущественно с 16 и 18 атомами углерода. У большинства видов среди ПНЖК преобладают  $18:2n-6$ ,  $18:3n-3$ ,  $16:2n-6$ ,  $16:3n-3$  и  $16:4n-3$  (Makhutova и др., 2022).

Для диатомовых водорослей (Bacillariophyta) характерен синтез таких специфических ЖК, как С16 ПНЖК семейств  $n-7$ ,  $n-4$  и  $n-1$ . При соотношении  $16:1n-7/16:0$  ЖК в сестоне, близком либо превышающем 1, можно говорить о доминировании диатомей в фитопланктонном комплексе. Кроме того, характерной чертой многих видов диатомей является высокий уровень  $14:0$  и  $20:5n-3$  (Makhutova и др., 2022; Сущик, 2008).

Отличительной чертой криптофитовых водорослей (Cryptophyta) является высокий уровень  $18:4n-3$ , достигающий до 10–20% от общего количества ЖК, и значительное количество  $22:6n-3$ . Еще одной особенностью криптофитов является высокое соотношение  $n-3/n-6$  ( $\approx 20/1$ ) (Makhutova и др., 2022).



Динофлагелляты (Dinoflagellata) выделяются по значимым уровням 18:5n-3 и 22:6n-3. Однако некоторые виды демонстрируют специфические ЖК (Makhutova и др., 2022).

Высшие водные и наземные растения, помимо обязательного присутствия в них 18:2n-6 и 18:3n-3, характеризуются наличием длинноцепочечных насыщенных ЖК с чётным числом атомов углерода, а именно 20:0, 22:0, 24:0, 26:0, которые представляют собой соединения воска кутикулы (Makhutova и др., 2022).

С повышением трофического уровня отслеживать маркёры консументов становится сложнее, ввиду поступления необходимых жирных кислот из рациона и снижением собственного синтеза. Среди консументов маркёрными ЖК обладают лишь беспозвоночные. Морские копеподы (веслоногие ракообразные) из отряда Calanoida обладают специфическими маркёрными ЖК: 20:1n-11, 20:1n-9, 22:1n-11, 22:1n-9 (до 10–15% от общего количества ЖК). *Limnocalanus macrurus* (из отряда Calanoida) содержит значительные количества необычных ДЦ-ВНЖК, таких как 24:4n-3, 24:5n-3, 24:6n-3, 26:4n-3 и 26:5n-3. Моллюски обладают специфическими неметилен-прерванными ЖК, а также редким изомером 20:1 (20:1n-13). Насекомые характеризуются наличием короткоцепочечных ПНЖК (12:2, 12:3, 14:2, 14:3). Помимо членистоногих и моллюсков, своими характерными маркёрами обладают некоторые таксоны червей. Пиявки (Hirudinea) содержат достаточно высокий уровень (5 %) 20:2n-6. Некоторые пресноводные виды семейства Planariidae (Platyhelminthes) содержат очень высокий уровень 22:5n-3 (9%), что необычно для беспозвоночных (Makhutova и др., 2022).

### **Экологические маркёры**

Недостаток ПНЖК в пище рыб вызывает изменение в синтезе ЖК, что приводит к появлению специфических ЖК в тканях рыб, которые могут служить маркёрами дефицита ПНЖК. Одной из таких кислот является  $20:3n-9$  (Махутова и Гладышев, 2020). Биохимический механизм производства  $20:3n-9$  основан на экспрессии и жирно-кислотной специфичности  $\Delta 6$  десатуразы, которые находятся в порядке  $18:3n-3 > 18:2n-6 > 18:1n-9$ . Только при отсутствии  $18:2n-6$  и  $18:3n-3$ ,  $18:1n-9$  может служить субстратом для  $\Delta 6$  десатурации до  $18:2n-9$ , затем удлинённым до  $20:2n-9$  и снова десатурации  $\Delta 5$  до  $20:3n-9$  (Рисунок 3) (Tocher, 2010). Однако, так как в рыбе даже при дефиците незаменимых ПНЖК в небольших количествах они все равно присутствуют, то было предложено маркёром дефицита ПНЖК использовать соотношение  $20:3n-9$ /ДГК. Например, при значениях соотношения = 0.4 в фосфолипидах радужной форели, рыба испытывала дефицит в n-3 ПНЖК. В липидах печени полярной рыбы *Coregonus lavaretus maraena* при сильном недостатке ПНЖК в корме соотношение  $20:3n-9$ /ДГК достигало 2.6. Этот маркёр применяется только в отношении пресноводных рыб, у которых активны  $\Delta 5$  и  $\Delta 6$  десатуразы (Махутова и Гладышев, 2020).

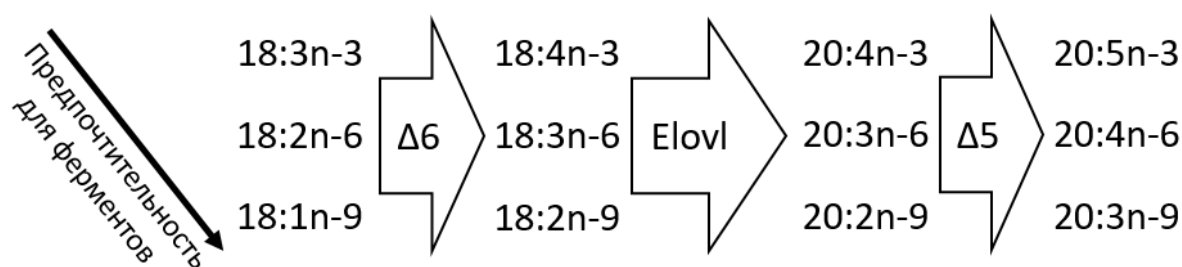


Рисунок 3 – Специфичность ферментов (модифицировано с Makhutova (2022))

Основным источником n-3 ЖК принято считать водоёмы. Безусловно, наземная растительность также обладает n-3 ЖК, но в значительно меньших количествах. Ситуация с n-6 ЖК противоположная. Таким образом, в водных пищевых сетях отношение  $n-3/n-6 > 1$ , а в наземных пищевых сетях  $< 1$ . Соотношение  $n-3/n-6$  в водоёмах рассматривают как соотношение автохтонного (водного) и аллохтонного (наземного) вещества и

предполагается в качестве маркёра влияния аллохтонной органики (Kainz и др., 2009). Чем меньше это соотношение, тем выше влияние наземного вещества и меньше производство внутренней продукции.

### 1.3. Источник ПНЖК для человека

В соответствии с рекомендуемыми уровнями потребления пищевых и биологически активных веществ уровень потребления n-3 для человека составляет 0.25-1.0 г в сутки.

Основные n-6 ПНЖК рациона человека — это АРК, главным источником которой служит мясо животных и линолевая кислота (ЛК), поступающая к нам из растительных масел, семян и орехов. Среди ПНЖК семейства n-3 в рационе человека доминируют ЭПК, ДГК и альфа-линоленовая кислота (АЛК). Основным источником ЭПК и ДГК для человека служит рыба и морепродукты (Махутова и Гладышев, 2020). Сосудистые растения не способны синтезировать ЭПК и ДГК, они производят лишь короткоцепочечную альфа-линоленовую кислоту, являющуюся основным компонентом фотосинтетических мембран хлоропластов (Гладышев, 2021).

С мировыми уловами человек ежегодно получает  $180 \times 10^6$  кг ЭПК+ДГК. Второй по значимости пищевой источник ПНЖК – печень сельскохозяйственных животных (коров, свиней и кур) – даёт человеку лишь  $\sim 4 \times 10^6$  кг ЭПК+ДГК в год, при этом доля n-6 кислот в печени перечисленных животных намного выше, чем в рыбе (Гладышев, 2021).

С развитием фармакологии, появлением на прилавках чистых витаминов, биологически активных добавок (БАД) и прочего, важным источником омега-3 ПНЖК, особенно в засушливых регионах, стали капсульные добавки рыбьего жира, названные «витамином F» (устаревшее

название комплекса физиологически ценных ПНЖК предложенное Гербертом Эвансом ещё в 1928 году, сейчас принятое некорректным). Такие пищевые добавки рыбьего жира не лишены проблем: зачастую содержат существенно меньше необходимых n-3 ПНЖК, чем заявлено в их описании, занижая тем самым их суточное потребление; содержимое этих капсул неустойчиво к окислению. По словам М. И. Гладышева (2018): приём ПНЖК человеком в виде рыбьего жира даёт худший результат по сравнению с потреблением рыбы.

Считается, что соотношение n-6/n-3 в пище человека не должно превышать 3 : 1. (Махутова и Гладышев, 2020). Однако это соотношение стало резко меняться со второй половины XX века в связи с индустриализацией сельского хозяйства и преобладанием в рационе мясной продукции, выращиваемой на кормах, богатых зерном с высоким содержанием n-6 кислот. В настоящее время в индустриально развитых странах с диетой “западного типа” соотношение n-6/n-3 ПНЖК в пище составляет 20 : 1. Глобальное соотношение n-6/n-3 ПНЖК в потребляемом человеком масле и жире составляет 24 : 1. (Гладышев, 2021)

## **1.4. Биосинтез жирных кислот**

### **1.4.1. Общий синтез ЖК**

Жирные кислоты в организме животного могут возникать из двух источников: синтез *de novo* из нелипидных источников углерода в организме животного или непосредственно из пищевых липидов и поступление готовых ЖК из пищи (Henderson, 1996).

Во всех организмах длинные углеродные цепи жирных кислот формируются в результате циклически повторяющихся четырёх стадий (рисунок 4), катализируемые системой, которую в совокупности называют

синтазой жирных кислот. Насыщенная ацильная группа, образующаяся в результате каждой четырехступенчатой серии реакций, становится субстратом для последующей конденсации с активированной малониловой группой. При каждом прохождении цикла жирная ацильная цепь удлиняется на два атома углерода (Henderson, 1996).

Существует два основных варианта синтазы жирных кислот: синтаза жирных кислот I (СЖК I), обнаруженная у позвоночных, беспозвоночных и грибов, и синтаза жирных кислот II (СЖК II), обнаруженная у растений и бактерий. СЖК I, обнаруженный у позвоночных, состоит из одной многофункциональной полипептидной цепи. Семь активных центров для различных реакций лежат в отдельных доменах. Несколько иная СЖК I обнаружена у дрожжей и других грибов и состоит из двух многофункциональных полипептидов, которые образуют комплекс с архитектурой, отличной от систем позвоночных. Три из семи необходимых активных сайтов находятся на одной субъединице и четыре на другой субъединице. СЖК II у растений и бактерий представляет собой диссоциированную систему; каждая стадия синтеза катализируется отдельным и свободно диффундирующим ферментом (Nelson и Cox, 2012).

Множественные домены СЖК I млекопитающих функционируют как отдельные, но связанные ферменты. Активный центр каждого фермента находится в отдельном домене внутри более крупного полипептида. На протяжении всего процесса синтеза жирных кислот промежуточные продукты остаются ковалентно присоединенными в виде сложных тиоэфиров к одной из двух тиоловых групп (SH-группы). Одной точкой присоединения является -SH-группа остатка Cys в одном из доменов синтазы (-кетоацил-АПБ-синтаза; КС); другой представляет собой -SH-группу ацил-переносящего белка, отдельного домена того же полипептида. Ацил-переносящий белок (АПБ) — это челнок, обеспечивающий взаимодействие

доменов и ацильной цепи, тем самым удерживающий систему вместе (Nelson и Cox, 2012).

Прежде чем начнётся 4-стадийный цикл, в результате которого образуется цепь жирной кислоты, необходимо приготовить ацильные группы. Первая ацильная группа находится в ацетильной группе ацетил-КоА, который переносится на АПБ в ходе реакции, катализируемой доменом малонил/ацетил-КоА-АПБ-трансферазы (МАТ) многофункционального полипептида (Nelson и Cox, 2012). Затем ацетильную группу переносят на Cys-SH группу -кетоацил-АПБ-синтазы (КС). Главным источником ацетил-КоА являются белки. Под действием комплексного фермента ацетил-КоА-карбоксилазы ацетил-КоА карбоксилируется, образуя малонил-КоА, который является субстратом для синтазы жирных кислот (Henderson, 1996). Вторая ацильная группа находится в малонильной группе малонил-КоА, который также переносится на -SH-группу АПБ в реакции, также катализируемой малонил/ацетил-КоА-АПБ-трансферазой. В таком, подсоединённом к синтазному комплексу, виде ацетильная и малонильная группы готовы к процессу удлинения цепи (Nelson и Cox, 2012). Рассмотрим первые четыре шага этого процесса более подробно на примере СЖК I млекопитающих (рисунок 4).

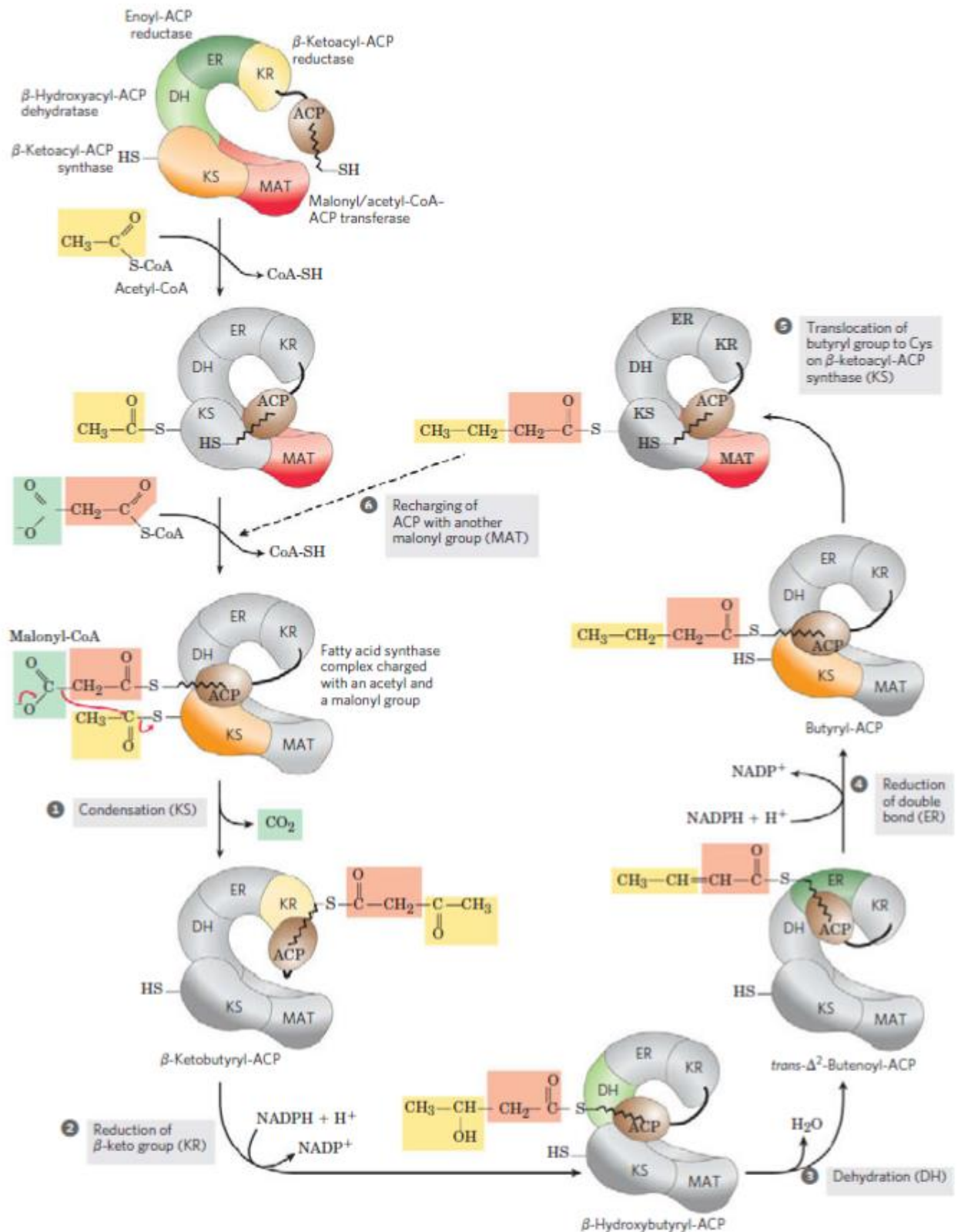


Рисунок 4 - Схема синтеза жирной кислоты на примере СЖК I (Nelson и Cox, 2012): ACP – АПБ (ацил-переносящий белок), KR – КР ( $\beta$ -кетоацил-АПБ-редуктаза), ER – ЕР (еноил-АПБ-редуктаза), DH – ГД ( $\beta$ -гидроксиацил-АПБ-дегидратаза), MAT – МАТ (малонил/ацетил-КоА-АПБ-трансфераза), KS – КС ( $\beta$ -кетоацил-АПБ-синтаза), NADP – НАДФ (Никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат), CoA – КоА (коэнзим/кофермент А)

### **Шаг 1. Конденсация**

Первой реакцией образования цепи жирной кислоты является конденсация Клайзена с участием ацетильной и малонильной групп с образованием ацетоацетил-АПБ, ацетоацетильной группы, связанной с АПБ через фосфопантетеин-SH-группу; одновременно образуется молекула  $\text{CO}_2$ . В этой реакции, катализируемой кетоацил-АПБ-синтазой (КС), ацетильная группа переносится с цис -SH группы фермента на малонильную группу к -SH АПБ, становясь метил-концевым двухуглеродным звеном новой ацетоацетильной группы. Субстратом для дальнейшего удлинения является молекула малонил-КоА. Использование малонильных групп, а не ацетильных, делает реакцию конденсации термодинамически выгодной.

### **Шаг 2. Восстановление карбонильной группы**

Ацетоацетил-АПБ, образовавшийся на стадии конденсации, теперь подвергается восстановлению карбонильной группы в положении С3 с образованием  $\beta$ -гидроксibuтирил-АПБ. Эта реакция катализируется - кетоацил-АСР-редуктазой (КР), а донором электронов является НАДФН.

### **Шаг 3. Отщепление молекулы воды**

Происходит удаление воды из С2-С3 положения  $\beta$ -гидроксibuтирил- АПБ с образованием двойной связи в продукте, транс- $\Delta^2$ -бутеноил- АПБ. Фермент, который катализирует эту дегидратацию, представляет собой гидроксиацил-АПБ-дегидратазу (ГД).

### **Шаг 4. Восстановление двойной связи**

Наконец, двойная связь транс- $\Delta^2$ -бутеноил-АПБ восстанавливается с образованием бутирил-АПБ под действием эноил- АПБ -редуктазы (ЕР), где донором электронов является НАДФН.

В системах СЖК I синтез жирных кислот приводит к единственному продукту, и никакие промежуточные продукты не высвобождаются. Когда



длина цепи достигает 16 атомов углерода, этот продукт (пальмитат, 16:0) покидает цикл. Система СЖК II генерирует множество продуктов, включая насыщенные жирные кислоты различной длины, а также ненасыщенные, разветвленные и гидроксигирные кислоты (Nelson и Cox, 2012). Конечным продуктом у большинства бактерий является пентадекановая кислота (15:0), у растений пальмитиновая (16:0) и стеариновая (18:0) кислоты (Nelson и Cox, 2012).

Дальнейший синтез ПНЖК предполагает 2 чередующихся между собой процесса: десатурация и элонгация. Десатурация жирных кислот представляет собой аэробную реакцию образования двойной связи путем удаления двух атомов водорода от соседних атомов углерода с использованием активного кислорода, катализируемую терминальной оксигеназой («десатуразой») (Bell и Tocher, 2009). Удлинение (элонгация) в эндоплазматическом ретикулуме идёт по такому же механизму, что и синтез пальмитата, в четыре этапа, но задействованы иные ферментативные системы («элонгазы»), и переносчиком ацильной группы в реакции является кофермент А, а не АПБ (Nelson и Cox, 2012). По итогу биосинтез ДЦ-ПНЖК основан на 2 группах ферментов: десатуразы (Fads), вводящие двойные связи в жирно-кислотные ацильные цепи, и элонгазы (Elovl), отвечающие за реакцию конденсации, приводящую к образованию 2-углеродного удлинение ранее существовавшей цепи (Monroig и др., 2011). Для этих ферментов характерна региоселективность (вставка двойной связи или этильной группы в определенное положение в жирной ацильной цепи) (Monroig и др., 2018).

Конечный продукт работы синтазы жирных кислот (СЖК) у животных и некоторых растений это пальмитиновая кислота (16:0), у других растений это стеариновая кислота (18:0). Введение первой ненасыщенности в 16:0 или 18:0, приводящее к образованию пальмитолеиновой кислоты (16:1n-7) и олеиновой кислоты (18:1n-9), соответственно, катализируется десатуразами, именуемыми как «первые десатуразы». Как правило, первые

десатуразы обладают  $\Delta 9$ -десатуразной активностью, вставляя двойную связь к девятому атому углерода в цепи, считаемому от карбоксильного (-COOH) конца молекулы, образуя мононенасыщенные жирные кислоты. Греческая буква ( $\Delta$ ) используется для обозначения положения двойной связи, созданной десатуразой в углеводородной цепи. Как и СЖК,  $\Delta 9$ -десатуразы широко распространены и встречаются практически у всех животных. Далее десатураза с  $\Delta 12$ -десатуразной активностью обеспечивает биоконверсию  $18:1n-9$  в  $18:2n-6$  (ЛК), а затем десатураза с  $\Delta 15$ -активностью десатурирует ЛК до  $18:3n-3$  (АЛК). Образуются два основных семейства жирных кислот:  $\omega-6$  ( $n-6$ ) и  $\omega-3$  ( $n-3$ ) ПНЖК. Десатуразы  $\Delta 12$  и  $\Delta 15$  называются «метил-концевыми десатуразами», так как они представляют собой мембраносвязанные ферменты со способностью вводить новые двойные связи между существующей двойной связью и метильной группой (-CH<sub>3</sub>) на конце цепи ЖК. Было широко признано, что, в отличие от микроорганизмов и растений, у животных отсутствуют метил-концевые десатуразы, пока первая метил-концевая десатураза не была обнаружена у нематоды *Caenorhabditis elegans*, а затем и у белокрылки *Bemisia argentifolii*, перелётной саранчи *Locusta migratoria*, коллемболы *Sminthurus viridis*, и морских видов, таких как *Nereis diversicolor* и *Tigriopus californicus*, и других беспозвоночных (Mongoiг и др., 2022). Интересно, что ферменты с  $\Delta 15$ -активностью часто также обладают  $\Delta 17$ - и  $\Delta 19$ -десатуразной активностью, способной превращать различные  $n-6$  ПНЖК (C18, C20 и C22) в соответствующие  $n-3$  ПНЖК. По этой причине эти ферменты обычно называют « $\omega 3$ -десатуразами» или просто « $\omega x$ -десатуразами» (Kabeya и др., 2020).

Гены  $\omega x$ -десатуразы широко распространены среди беспозвоночных, поскольку в общей сложности 121 последовательность  $\omega x$ -десатуразы была обнаружена у 80 видов Cnidaria, Nematoda, Annelida, Mollusca, Rotifera и Arthropoda. Интересно, что распределение генов  $\omega x$ -десатуразы в

определенных таксономических группах довольно загадочно. Так у ракообразных гены  $\omega$ -десатуразы были обнаружены исключительно у определенных отрядов веслоногих, а именно Siphonostomatoida, Cyclopoida и Harpacticoida, но не у копепод Calanoida. Морская пелагическая экосистема чрезвычайно богата n-3 ПНЖК, продуцируемыми фотосинтезирующими микроводорослями, и поэтому можно предположить, что эволюционное и экологическое давление на сохранение  $\omega$ -десатураз будет низким у планктонных веслоногих (например, Calanoida) и высоким у бентосных веслоногих (например, Harpacticoida) (Monroig и Kabeya, 2018).

Как уже упоминалось ранее, животные (за исключением небольшого числа беспозвоночных) не имеют  $\Delta 12$  и  $\Delta 15$  десатураз, а поэтому не способны образовывать ЛК и АЛК, из-за чего синтезировать ПНЖК *de novo* они не способны. При этом они обладают другими ферментами биосинтеза ВНЖК. Только на основе ЛК и АЛК возможны дальнейшие преобразования (Monroig и др., 2018) в ходе процесса, известного как «трофическая модернизация» (Monroig и Kabeya, 2018). Таким образом, ЛК и АЛК считались «незаменимыми жирными кислотами» для животных (Monroig и др., 2022).

Линолевая и альфа-линоленовая кислоты сами по себе не несут в себе важной роли в жизнедеятельности большинства организмов; они лишь «ступеньки» к достижению цели. Главными конечными целевыми продуктами у семейства n-6 это АРК, у семейства n-3 это ЭПК и ДГК. Их синтез обеспечивает уже другой тип десатураз, называемый «десатуразами переднего конца», способный вставлять двойные связи между существующими двойными связями (обычно в положении  $\Delta 9$ ) и карбоксильной группой (-COOH) (Monroig и Kabeya, 2018). Тут же включается различная группа элонгаз (Elovl). Все дальнейшие реакции протекают в гладком эндоплазматическом ретикулуме с участием одних и тех же ферментов, действующих как на n-3, так и на n-6 жирные кислоты

(хотя утверждается, что сродство ферментов обычно выше для n-3-ряда) (Bell и Tocher, 2009).

Существует 2 пути биоконверсии ЛК и АЛК до АРК и ЭПК: « $\Delta 6$  путь» и « $\Delta 8$  путь» (Рисунок 5). Вкратце, «путь  $\Delta 6$ » состоит из  $\Delta 6$  десатурации ЛК или АЛК, за которой следует стадия элонгации и  $\Delta 5$ -десатурация до АРК или ЭПК соответственно, в то время как альтернативный путь («путь  $\Delta 8$ ») начинается с элонгации ЛК или АЛК, за которой следуют две последовательные стадии десатурации ( $\Delta 8$  и  $\Delta 5$ ) в сторону АРК или ЭПК (Marrero и др., 2022). Как правило, конверсия по  $\Delta 6$  пути у позвоночных происходит намного чаще, чем по пути  $\Delta 8$  (Dikić и др., 2017). Точно так же ДГК может быть биосинтезирована двумя альтернативными путями. Первый - более прямой путь, называемый «путь  $\Delta 4$ », состоящий из удлинения ЭПК до докозапентаеновой кислоты (ДПК, 22:5n-3) и последующей десатурации  $\Delta 4$  до ДГК. Второй - «путь Шпрехера», считающийся более распространенным путем биосинтеза ДГК среди позвоночных, состоит из двух последовательных элонгаций от ЭПК до тетракозапентаеновой кислоты (ТПК, 24:5n-3), за которыми следует  $\Delta 6$ -десатурация до тетракозагексаеновой кислоты (ТГК, 24:6n-3) и окончательное укорочение цепи за счет частичного  $\beta$ -окисления в пероксисомах (Marrero и др., 2022).

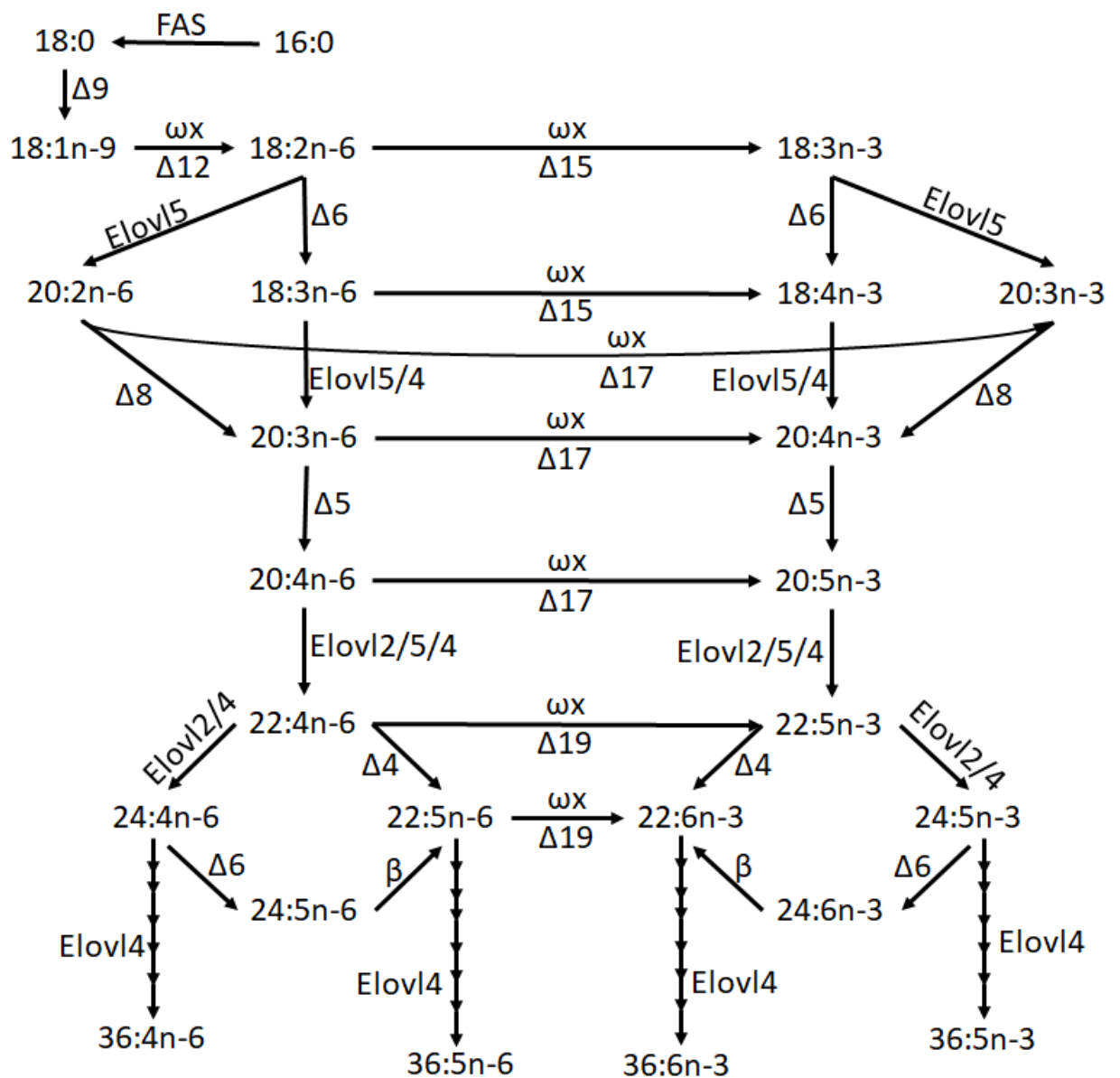


Рисунок 5 - Общая схема биоконверсии физиологически ценных ЖК у животных (модифицировано с Monroig (2011), Monroig и Kabeya (2018), Tocher (2010), Li (2010), Kabeya (2020), Galindo (2021), Vlahova (2020), Jin (2017))

Способность организмов к биосинтезу ДЦ-ПНЖК различаются в зависимости от вида и, в конечном итоге, от ферментных комплексов, необходимых в метаболическом процессе (Monroig и др., 2011).

### 1.4.2. Биоконверсионные возможности рыб

Для позвоночных существует широко распространенное стандартное форматирование символов гена/белка, которое устанавливает, что гены именуются строчными буквами и курсивом, а синтезируемые ими белки прописываются с заглавной буквы (например, «*elovl*» и «*fads*» для гена, «Elovl» и «Fads» для белка) (Monroig и др., 2022).

Существует фундаментальное различие между рыбами и млекопитающими в отношении репертуара генов, кодирующих ферменты, выполняющие десатурирующие действия, необходимые для производства биомолекул ДЦ-ПНЖК. В отличие от млекопитающих, у которых отдельные гены *fads1* и *fads2* кодируют ферменты Fads1 и Fads2 с соответствующими специфичностями Δ5 и Δ6 соответственно, у рыб ген *fads1* утрачен в ходе эволюции (Vlahova и др., 2020). Вообще, все позвоночные, включая человека, произошли от предка, который прошёл **два этапа полногеномной дупликации** (2R-WGD<sup>1</sup>). Кроме того, костистые рыбы (Teleostei) подверглись дополнительному **третьему раунду дупликации генома** (3R-WGD) (Singh и Isambert, 2020). Секвенирование и филогенетические данные показали, что ортологи *fads1* и *fads2* присутствуют в геноме арктической миноги (*Lethenteron camtschaticum*), ключевого эволюционного узла, подтверждая гипотезу о том, что *fads1* и *fads2*, скорее всего, возникли в результате тандемной дупликации генов у предка позвоночных (Рисунок 6). Кроме того, *fads1* и *fads2* также сохранились у рыб с лучевыми плавниками, таких как сенегальский бичир (*Polypterus senegalus*) и пятнистый сарган (*Lepisosteus oculatus*), которые дивергировались до 3R-WGD, характерного для Teleostei. Известно, что дегенерация и потеря являются наиболее распространенными судьбами, с которыми сталкиваются дубликаты генов, в особенности после WGD. Считается, что ген *fads1*, по-видимому, был утрачен в линиях Teleostei после 3R-WGD, за исключением Elopomorpha

---

<sup>1</sup> 2R-WGD - two rounds of whole genome duplication

(Lopes-Marques и др., 2018). Далее у некоторых костистых рыб образовался механизм для преодоления узкого места, вызванного потерей  $\Delta 5 fads1$ , поскольку в противном случае они не смогли бы конвертировать ПНЖК в ВНЖК. Таким механизмом, вероятно, была дупликация (полногеномная и/или тандемная) гена *fads2* с последующим процессом функционализации, как это наиболее вероятно имело место у лососевых и карповых, посредством чего приобретение  $\Delta 5 fads2$  произошло в одной из нескольких копий гена *fads2*. Примером может служить рыбка данио рерио (*Danio rerio*), в которой  $\Delta 6 Fads2$  приобрел способность десатурироваться в положении  $\Delta 5$ . В результате все этапы десатурации пути биосинтеза ДЦ-ПНЖК у рыб катализируются ферментами *Fads2*, проявляющими различную  $\Delta$ -активность. Потеря канонического гена *fads1* с последующей субфункционализацией *fads2*, которую костистые рыбы претерпели в ходе эволюции, объясняет более высокую пластичность, с которой рыбы производят биомолекулы ДЦ-ПНЖК по сравнению с другими позвоночными (Vlahova и др., 2020).

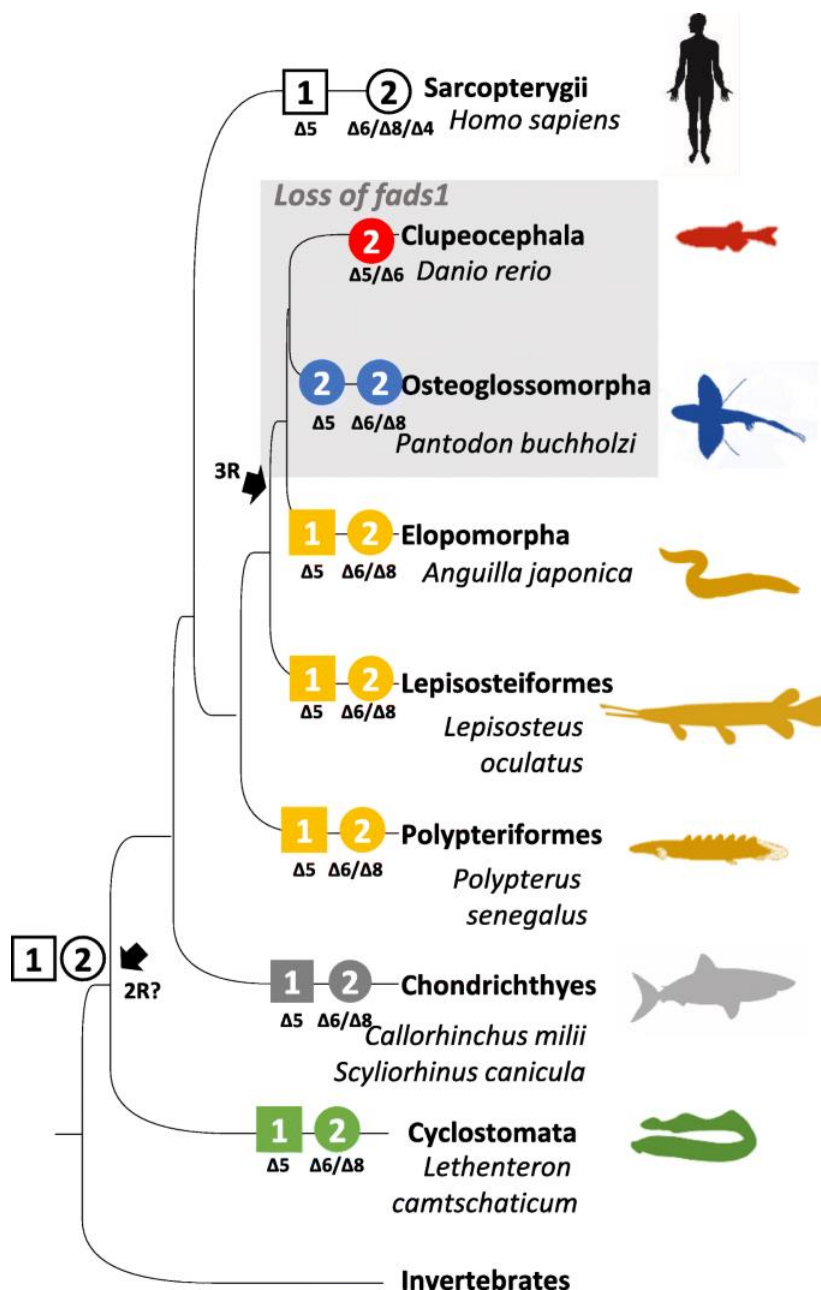


Рисунок 6 - Эволюционная история и распространение *Fads1* и *Fads2* у позвоночных в сочетании с соответствующей активностью десатураз. Квадраты соответствуют *fads1*, кружки — *fads2*, черные стрелки указывают приблизительное время дупликации всего генома у предковых позвоночных (2R) и специфичной дупликации костистых рыб (3R), серым квадратом выделены линии, в которых отсутствуют *fads1* (Lopes-Marques и др., 2018)

ДНК десатуразы рыб кодируют белки из 444–454 аминокислот (кДНК десатуразы рыбок данио и карпа кодируют белки из 444 аминокислот, аналогичные десатуразам млекопитающих, тогда как белки десатуразы морских рыб содержат 1–3 дополнительные аминокислоты, а лососевые –



еще 8–10 аминокислот). Белковые последовательности десатураз рыб обладают всеми характерными чертами микросомальных десатураз жирных кислот, включая три гистидиновых бокса, две трансмембранные области и цитохрома b5 – подобный домен на N-конце, содержащий мотив связывания гема HPGG (His-Pro-Gly-Gly). Таким образом, десатуразы рыб представляют собой гибридные белки, предположительно содержащие как десатуразу, так и цитохром b5 (Bell и Tocher, 2009). Слияние цитохром b5 - подобного домена с основным доменом белка десатуразы позволяет НАДН-цитохром b5 редуктазе напрямую переносить электроны к каталитическому сайту Fads2 через цитохром b5 - подобный домен без необходимости наличия независимого цитохрома b5. Однако были получены убедительные доказательства того, что цитохром b5-подобный домен Fads2 и микросомальный цитохром b5 необходимы для полной экспрессии десатуразной активности. Три гистидиновых бокса образуют каталитический центр за счет координации негемовых центров железа, и все эти остатки гистидина и остаток глутамина необходимы для ферментативной активности. Субстратная специфичность и региоселективность мембраносвязанных десатураз определяются электрическим зарядом и полярностью определенных аминокислот десатуразы, которые влияют на их сродство к ацильной цепи и несущей части субстрата, а также структурной пригодностью (т.е. глубиной и углом введения субстрата в карман) (Watanabe и др., 2016). Из публикации Watanabe с коллегами (2016) можно сделать следующий вывод: одна единственная аминокислота в ферменте десатуразы  $\Delta 6$  Fads2 при изменении может переключать специфичность в сторону субстратов. Это соответствовало результатам исследований половых феромонов у мотыльков, где аналогичным образом изменение всего лишь одной аминокислоты в ферменте десатуразе жирных кислот было достаточным для изменения ферментативной функции всего фермента. Согласно полученным ими данным, ген десатуразы MsexD2 у *Manduca sexta* в ходе эволюции дублировался, в результате одна копия

приобрела одну аминокислотную замену. Затем, в процессе неофункционализации, этот новый ген приобрел способность вводить еще одну двойную связь (Busek и др., 2015).

В отличие от млекопитающих, у костистых рыб может быть различное количество генов *fads2*: один (например, « $\Delta 6/\Delta 5$ » у рыбки данио (*Danio rerio*), африканского сома (*Clarias gariepinus*) и серебряного барбуса (*Barbonomus gonionotus*)), два (например, « $\Delta 5$  и  $\Delta 6$ » у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), или « $\Delta 6/\Delta 5$  и  $\Delta 4$ » у рыбы-кролика (*Siganus canaliculatus*), щуки серебристой (*Chirostoma estor*) и полосатого змееголова (*Channa striata*)), три (например, « $\Delta 6/\Delta 5$ ,  $\Delta 4$  и  $\Delta$ -неизвестная» у нильской тиляпии *Oreochromis niloticus*) или даже четыре (например, «три  $\Delta 6$  и одна  $\Delta 5$ » у атлантического лосося *Salmo salar*), в то время как другие виды, такие как бурый скалозуб (*Takifugu rubripes*) и зелёный тетрадон (*Tetraodon nigroviridis*) не имеют генов *fads* (Xie и др., 2021).

До недавнего времени считалось, что биосинтетическая способность каждого вида к биосинтезу ДЦ-ПНЖК зависит от среды обитания вида (пресноводная или морская); при этом морские виды, если и имеют, то явно ограниченную способность преобразовывать С 18 ПНЖК в ДЦ-ПНЖК, тогда как пресноводные/проходные рыбы имеют полноценную способность удлинять и десатурировать предшественники С18 (Galindo и др., 2021; Monroig и др., 2018; Zhang и др., 2020). Предполагается, что это эволюционная адаптация к наличию жирных кислот в различных средах. Морской фитопланктон вырабатывает высокие уровни n-3 ДЦ-ПНЖК (такие как ЭПК и ДГК), тогда как в пресной воде фитопланктон характеризуется более высокими уровнями ЛК и АЛК, средним уровнем ЭПК и обычно очень низким содержанием ДГК. Таким образом, морские рыбы населяют среду, богатую ДЦ-ПНЖК, а потому в собственном энергозатратном синтезе нет нужды. Природа стремится к минимизации, всё что не нужно постепенно

исчезает. ДЦ-ПНЖК необходимы рыбам, их недостаток в пресноводной среде оказывает эволюционное давление на рыб, чтобы сохранить способность эндогенно производить их для поддержания оптимального существования (Tocher, 2010). Морских колючепёрых рыб (надотряд *Acanthopterygii*), как правило, обладают только двумя ферментами, а именно *Fads2*, который обладает  $\Delta 6/\Delta 8$ -десатуразной активностью (с практически полным отсутствием активности  $\Delta 6$ -десатуразы по отношению к  $24:5n-3$ ), и *Elovl5*. Отсутствие  $\Delta 5$ -десатуразы и *Elovl2* не позволяет таким морским рыбам, как например, морской лещ (*Pagrus major*) и японская камбала (*Paralichthys olivaceus*), синтезировать ЭПК или ДГК (Nyunoуа и др., 2021). Такое обобщение о неспособности морских рыб синтезировать ПНЖК было поставлено под сомнение, когда появились сведения о наличии у морской травоядной рыбы *Siganus canaliculatus* бифункциональной  $\Delta 4/\Delta 5$  *Fads2* и бифункциональный  $\Delta 5/\Delta 6$  *Fads2* (Li и др., 2010). Существует потенциальный барьер (помимо осмотического), который должны преодолеть морские рыбы для перемещения в пресноводную среду: разрыв между физиологической потребностью и поступлением ДГК (с пищей или через эндогенный синтез). Таким образом, успешная колонизация в пресноводную среду требует преодоления ограничения низкого уровня ДГК в рационе за счёт качественных изменение ферментов (*Fads* и *Elovl*), с приобретением способности к биосинтезу ДГК из АЛК. Так было описано появление *Fads2* с трифункциональной  $\Delta 6/\Delta 5/\Delta 4$ -десатуразой у пресноводных проходных камбал *Trinectes maculatus*, *Apionichthys finis* (Matsushita и др., 2020).

$\Delta 6$ -десатураза – это основной и широко распространённый фермент биосинтеза ПНЖК у костистых рыб. Отдельные гены  $\Delta 6$  *Fads* были выделены из всех изученных на сегодняшний день видов рыб (Li и др., 2010). Морские рыбы также содержат  $\Delta 6$ -десатуразы, хотя и на примере морского окуня и трески было показано, что активность  $\Delta 6$ -десатуразы по отношению к ЛК и АЛК в гепатоцитах и энтероцитах морских рыб очень низка. Долгое

время функция  $\Delta 6$ -десатуразы у видов, которые с трудом превращают АЛК в ЭПК, была непонятна. С точки зрения эволюции тот факт, что функциональный ген  $\Delta 6$ -десатуразы сохранился, подразумевает биологически значимую функцию. Предполагается, что поскольку та же  $\Delta 6$ -десатураза, вероятно, также действует на пути от ЭПК к ДГК, то возможно, что функциональная  $\Delta 6$  была сохранена, чтобы можно было манипулировать и «тонко настраивать» мембранные соотношения ЭПК/ДГК у рыб, таких как морские виды, которые хоть и могут получать обе жирные кислоты из рациона, но не всегда в оптимальных соотношениях. В особенности это важно для нервных тканей, где ДГК играет ключевую роль. Так у морской трески самая высокая экспрессия  $\Delta 6$ -десатуразы была зафиксирована в головном мозге, где экспрессия превышала экспрессию в печени более чем в 50 раз. Таким образом, вероятно, основная роль  $\Delta 6$ -десатуразы в морской рыбе может заключаться в поддержании оптимального уровня ДГК в мозге и нервной ткани путем преобразования диетической ЭПК (Bell и Tocher, 2009).

Долгое время в прошлом веке существование десатуразы  $\Delta 4$  подвергалось сомнению (Henderson, 1996). Ряд исследований не выявляли активности Fads2 по отношению к  $22:5n-3$  и  $22:4n-6$ , указывая на то, что этот фермент не обладает способностью к  $\Delta 4$  десатуразе, а биосинтез ДГК идёт исключительно по пути Шпрехера. Так  $\Delta 4$  Fads2 не была идентифицирована у ряда карповых, как например, белого амура (*Stenopharyngodon idella*) (Marrero и др., 2022) и т.д. Позже всё же у некоторых рыб, как например морская рыба *Siganus canaliculatus* (Li и др., 2010), пресноводная рыба *Chirostoma estor* (Fonseca-Madrigal и др., 2014) и др., в некоторых копиях Fads2 была замечена  $\Delta 4$ -десатуразная активность. По поводу карповых было предположено, что такая  $\Delta 4$  ферментативная способность в эволюционном плане появилась не так уж и давно, а поэтому отсутствует у рано появившихся линий костистых рыб, таких как карповые (Marrero и др., 2022).  $\Delta 4$ -десатураза играет ключевую роль в прямом синтезе ДГК. Исследование

на основе серебристой щуки говорит, что в присутствии более прямого и эффективного механизма, такого как «путь  $\Delta 4$ », «путь Шпрехера» не работает, либо сильно ограничен (Fonseca-Madrigal и др., 2014).

Наряду с активностью  $\Delta 6$ -десатуразы одновременно может существовать  $\Delta 8$ -десатураза, как например у *Stenopharyngodon idella*. Но эта активность заметно различается среди видов даже в пределах одного семейства. Так другие карповые, такие как *Tinca tinca* и *Cyprinus carpio* имеют  $\Delta 6$ , но без активности  $\Delta 8$ -десатуразы (Marrero и др., 2022). Fads2 морских рыб в целом демонстрировали более высокую  $\Delta 8$ -десатуразную активность по сравнению с Fads2 пресноводных / диадромных рыб (Monroig и др., 2018; Fonseca-Madrigal и др., 2014).

Сообщается, что активность как  $\Delta 6$ -, так и  $\Delta 5$ -десатуразы находится под пищевым контролем у животных. При кормлении рыбы растительными кормами обычно наблюдается повышенная экспрессия и активность десатураз и элонгаз (Bell и Tocher, 2009). Важно отметить, что, хотя путь биосинтеза ДЦ-ПНЖК активируется кормлением пищей на основе растительных масел, полученные уровни n-3 ДЦ-ПНЖК в тканях будут ниже, чем у рыб, получавших рационы на основе рыбьего жира (Monroig и др., 2018).

ДНК элонгазы кодируют белки из 288–294 аминокислот, которые высоко консервативны среди видов рыб. Все элонгазы имеют общие характерные черты: единственный мотив окислительно-восстановительного центра гистидинового бокса, канонический сигнал удержания ER (сигнал нацеливания на карбокси-концевой дилизин), множество трансмембранных областей. Большинство элонгаз рыб, как правило, проявляют разную активность в отношении ПНЖК в порядке  $C18 > C20 > C22$ , хотя бывают исключения, например, элонгазы тилапии и палтуса имеют одинаковую активность в отношении 18:4n-3 и 20:5n-3. Элонгазы рыб обычно проявляют большую или одинаковую активность в отношении n-3, чем в случае

гомологов n-6, за исключением ферментов трески, которые были более активны в отношении n-6 жирных кислот. У рыбок *Danio rerio* обнаружена всего одна элонгаза, обладающая способностью удлинять ПНЖК с длиной цепи от C18 до C22, а также мононенасыщенные, но не насыщенные жирные кислоты. Таким образом, предполагается, что у этих рыб один ген элонгазы ПНЖК - это все, что требуется для выполнения всех элонгаций, необходимых для полного функционирования пути синтеза от АЛК до ДГК (Bell и Tocher, 2009).

Семь членов семейства Elovl (Elovl1-7) были идентифицированы у млекопитающих на основании последовательностей их белковых мотивов и субстратной специфичности. Как правило, Elovl1, Elovl3, Elovl6 и Elovl7 обладают способностью удлинять насыщенные жирные кислоты (НЖК) и мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК), в то время как предпочтительными субстратами Elovl2, Elovl4 и Elovl5 являются ПНЖК (Xie и др., 2021). Именно эти элонгазы (Elovl2, Elovl4 и Elovl5) и играют ключевую роль в биосинтезе ДЦ-ПНЖК (Monroig и Kabeya, 2018).

Elovl5 присутствует практически у всех костистых рыб и отвечает за удлинение, в первую очередь, субстратов C18 и C20 ПНЖК. У некоторых из эвригалинных травоядных видов, включая рыбу-кролика, пятнистого аргуса (*Scatophagus argus*), сарпу (*Sarpa salpa*) и хищных рыб, китайского окуня (*Siniperca chuatsi*) и песчаную камбалу (*Pegusa lascaris*), Elovl5 обладала способностью к удлинению C22 ПНЖК (Marrero и др., 2022), но, как правило, с заметно более низкой эффективностью (Monroig и Kabeya, 2018). По данным некоторых авторов, Elovl5 рыб, в отличие от млекопитающих, обладает способностью удлинять мононенасыщенные жирные кислоты 18:1n-7 и 18:1n-9 до 20:1n-7 и 20:1n-9 соответственно. Некоторые рыбы, в том числе обыкновенный серебристый горбыль (*Argyrosomus regius*) и химера мицукури (*Hydrolagus mitsukurii*), обладают Elovl5 со способностью удлинить гексадекатриеновую кислота (16:3n-3) (Monroig и др., 2018).

Elov12 обладает большим сродством к C20 и C22 ПНЖК и некоторой остаточной способностью удлинять C18 ПНЖК (Хие и др., 2021). В отличие от Elov15, Elov12 присутствует не у всех костистых рыб. Экспансия костистых рыб в ходе эволюции сопровождалась потерей гена *elov12* в недавно возникших линиях, таких как *Acanthopterygii*, филогенетической группы, в которую входит подавляющее большинство наиболее важных разводимых в неволе морских рыб. Виды же из более ранних линий костистых рыб, такие как карповые, силуриды, серрасалмиды, клюпеиды и лососевые обладают функциональными ферментами Elov12. (Marrero и др., 2022). Этот фермент был обнаружен у пресноводных рыб: данио, африканского сома (*Clarias gariepinus*), линя (*Tinca tinca*), белого амура (*Stenopharyngodon idella*), лососевых *Salmo salar* и *Oncorhynchus mykiss*, катадромного японского угря (*Anguilla japonica*). Было высказано предположение, что такая потеря способности к удлинению дополнительно объясняет ограниченную способность морских рыб к биосинтезу ДЦ-ПНЖК, упомянутую выше. Хотя этот аргумент по-прежнему актуален для большинства морских рыб, включая многие выращиваемые виды, в недавнем исследовании сообщалось о наличии функционального Elov12 у морской европейской сардины (*Sardina pilchardus*) (Хие и др., 2021).

В отличие от других позвоночных, костистые рыбы обладают двумя различными типами Elov14, Elov14a и Elov14b, с различной способностью к удлинению C18-C22 ЖК (Jin и др., 2017), из которых они могут производить так называемые ПНЖК с очень длинной цепью (> C24), вплоть до 36 атомов углерода. Было высказано предположение, что такая способность фермента Elov14 к удлинению компенсирует отсутствие Elov12 у многих видов морских костистых рыб (Хие и др., 2021). Известно, что у некоторых рыб Elov14 способна обеспечивать синтез ДГК через удлинение ЭПК и ДПК (ключевого промежуточного соединения «пути Шпрехера»), обладая Elov12-подобной активностью (Monroig и др., 2011). При этом, было обнаружено, что

изоформа Elov14b демонстрирует удлинение НЖК и ПНЖК до C36 у всех рыб (у кого она есть), а изоформа Elov14a имеет субстрато-специфичность в зависимости от вида. Так Elov14a рыб данио способны удлинять только насыщенные кислоты (Monroig и др., 2011); в то время как Elov14a африканского сома (*Clarias gariepinus*) и черного морского леща (*Acanthopagrus schlegelii*) продемонстрировала способность удлинять ещё и ПНЖК (Monroig и др., 2018; Jin и др., 2017). Самый высокий уровень транскриптов *elov14* - подобных последовательностей был обнаружен в глазах (сетчатке), шишковидной железе и мозге (Jin и др., 2017). Изоформы Elov14 по-разному распределены в тканях: *elov14a* в основном экспрессируется в тканях головного мозга, тогда как *elov14b* локализован в основном в сетчатке и половых железах (Torres и др., 2020).

Недавно открытая элонгаза с предполагаемой ролью в биосинтезе ДЦ-ПНЖК является Elov18, два гена которой, *elov18a* и *elov18b*, существуют у костистых рыб. Было показано, что эта новая элонгаза, по-видимому, отсутствующая у млекопитающих, обладает активностью элонгации по отношению к C18 и C20 ПНЖК у костистых рыб, что продемонстрировано функциональными анализами ферментов Elov18 африканских сомов и рыб-кроликов (Xie и др., 2021).

Стоит упомянуть и о других элонгазах рыб. Рыбы данио обладают двумя генами *elov11*: *elov11a* и *elov11b*. Elov11 удлиняет C14 до C20 НЖК, МНЖК и ПНЖК у эмбрионов этих рыб (Xie и др., 2021). Однако у человека Elov11 обладает высокой активностью только в отношении C20 и C22 НЖК и МНЖК (Ohno, 2010). Elov16 у выюна показывает удлинение с 16:0 и 16:1 до 18:0 и 18:1 соответственно, аналогично млекопитающим. В то время как Elov13 и Elov17 еще не были обнаружены у рыб (Xie и др., 2021).

Было подтверждено наличие транскриптов (мРНК) десатураз ( $\Delta 6$  и  $\Delta 5$  Fads2) и элонгаз (Elov12, Elov15, Elov14a и Elov14b) у ряда рыб (например,



*Danio rerio*, *Rachycentron canadum*, *Solea senegalensis*, *Cyprinus carpio*) на всем протяжении эмбриогенеза и личиночной стадии, с активацией, происходящей через 24 часа после оплодотворения, когда уже наблюдается истощение запасённой ДЦ-ПНЖК, в особенности ДГК, в икре (Monroig и др., 2018; Torres и др., 2020).

Филогенетическая принадлежность костистых рыб имеет решающее значение для определения его состава и, в некоторой степени, функции ключевых ферментов *Fads* и *Elovl*, участвующих в путях биосинтеза ДЦ-ПНЖК (Marrero и др., 2022). Кроме того, способность рыб к биосинтезу ДЦ-ПНЖК регулируется не только на геномном уровне и зависит от наличия генов десатураз и элонгаз и активности соответствующих ферментов, но и на уровне экспрессии генов как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях (Xie и др., 2021). Так в одном исследовании сообщалось, что несмотря на увеличение содержания ЛК и АЛК и снижение процентного содержания АРК, ЭПК и ДГК в рационе лосося, экспрессия генов удлинения (*elovl5*) и десатурации ( $\Delta 5$  *fads2* и  $\Delta 6$  *fads2*) была подавлена. Это было связано с подавлением генов *srebp1*, которые являются основными факторами транскрипции для эндогенной продукции ДЦ-ПНЖК у лосося. Эти результаты противоречат общепринятому заключению о том, что пищевые растительные масла стимулируют экспрессию генов удлинения и десатурации у рыб (Xu и др., 2020). При исследовании морского желтого горбыля (*Larimichthys crocea*) и пресноводной радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) Li с соавторами (2022) обнаружили, что, не смотря на подтверждённое присутствие генов *elovl5* у обоих видов, их экспрессия значительно различалась (абсолютная транскрипционная экспрессия *elovl5* в печени была значительно выше у радужной форели, чем у желтого горбыля, независимо от рациона, которым питались оба вида). Среди важных факторов, влияющих на экспрессию генов, выявили: доступность хроматина, промоторная активность и регуляция транскрипционными факторами

регуляторных областей гена. Данные свидетельствуют о том, что естественный отбор мог вызвать эволюционные изменения в регуляторных областях гена, а не в области, кодирующей белок, что согласуется с теорией кооптации генов: «Гены могут быть кооптированы (т.е. могут приобрести новую функцию) для создания эволюционных и физиологических новшеств путем изменения их паттернов регуляции, за счёт изменений в цис-регуляторных элементах или энхансерах» (Li и др., 2022).

## 1.5. ПНЖК в водных экосистемах

### 1.5.1. Жирнокислотный состав продуцентов и их роль в трофических цепях водных экосистем

Важно понимать, что формирование важных органических веществ происходит на уровне продуцентов. Дальнейшее продвижение по пищевой цепи сопровождается их переработкой или достраиванием (усложнением). И жирные кислоты не исключение. Как нам уже известно, синтез жирных кислот доступен всем организмам, но только до определённой степени; дальше всех *de novo* прошли автотрофные организмы (продуценты), образуя таким образом так называемые **незаменимые жирные кислоты** (ЛЖК и АЛЖК). Разные организмы обладают разными биосинтетическими возможностями, давая тем самым разные «стартовые точки» для пищевых цепей, влияющие на конечного потребителя. Так в одном исследовании было замечено, что снижение пищевой ценности перифитона (пониженное содержание ДЦ-ПНЖК) приводит к уменьшению ДЦ-ПНЖК в мышечных тканях донных рыб (например, донного бычка и рыбадной кумжи), тем самым наблюдается прямая связь продуцентов с вторичными консументами (Guo и др., 2022). Вот

почему важно иметь представления об жирно-кислотном составе первичных продуцентов.

Традиционно считается, что пресноводные водоросли обычно содержат более низкие уровни n-3 ДЦ-ПНЖК, особенно ДГК, чем морские (Makhutova и Stoyanov, 2021). Водоросли из рек умеренного пояса имели больше ЭПК по сравнению с водорослями из субтропических рек. Такая разница в основе ручьевых пищевых сетей может быть связана с тем, что ЭПК преимущественно синтезируется некоторыми таксонами водорослей, чтобы выдерживать более низкие температуры (Guo и др., 2017). Кроме того, профиль ЖК первичных продуцентов также различается между бентосными водорослями и пелагическим фитопланктоном, поскольку бентосные водоросли, как правило, бедны длинноцепочечными ПНЖК по сравнению с пелагическими водорослями и, как правило, более богаты n-6 ПНЖК (Kainz и др., 2017).

В пресноводных водоемах преобладают в основном три таксона фотосинтезирующих организмов — сине-зелёные и зелёные водоросли и диатомовые водоросли. Другие таксоны доминируют на короткое время или в небольшом числе экосистем (Makhutova и др., 2022). Цианобактерии (сине-зелёные водоросли) содержат ЖК с углеродными цепями не более 18 атомов. Наиболее характерными для них ЖК являются 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6 (Сушик, 2008). Зелёные водоросли (Chlorophyta) синтезируют ЖК семейств n-3 и n-6, преимущественно с 16 и 18 атомами углерода. У большинства видов среди ПНЖК преобладают 18:3n-3, 18:2n-6 и 16:4n-3, а также 16:2n-6, 16:3n-3, 16:4n-3; значимым уровнем обладают и моноены 16:1n-9, 16:1n-13 (Makhutova и др., 2022; Сушик, 2008). Диатомовые водоросли (Bacillariophyta) характеризуются повышенным содержанием 14:0, 16:1n-7, а также специфическими С16 ПНЖК семейств n-7, n-4, n-1. С18 ПНЖК наблюдаются в очень низких количествах, тогда как уровень ЭПК

может достигать до 30% от суммы ЖК. Присутствуют и другие ДЦ-ПНЖК (ДГК и АРК), но в гораздо меньшем объёме (Сущик, 2008; Guo и др., 2017).

Живая наземная листовая масса сосудистых растений обычно характеризуется относительно высокими уровнями С18 ПНЖК (т.е. ЛК и АЛК) и длинноцепочечными насыщенными кислотами, но не определяемыми ДЦ-ПНЖК. В частности, за наземной растительностью не был замечен синтез ЭПК и ДГК (Guo и др., 2022).

В ручьях и реках для первичных консументов основной источник пропитания - это перифитон (биоплёнки, обрастатели), который растёт на ручьевых субстратах. На субстратах (камни, скалы и т.д.) различают 2 типа биоплёнок: светлую (основу которой составляют фотосинтезирующие микроводоросли) и тёмную (сообщество грибов и бактерий). Большинство активно плавающих (личинки подёнок и веснянок) и пассивных (личинки ручейников) организмов передвигаются ночью, а днём пережидают под камнями, где и располагаются тёмные биоплёнки. Тем самым тёмные биоплёнки являются возможным источником жирных кислот (Guo и др., 2021). Бактерии обладают большим разнообразием групп ЖК: насыщенные, мононенасыщенные, разветвлённые (изо- и антеизо-кислоты), циклопропановые и гидроксикислоты с углеродными цепями от 10 до 19 атомов. Как правило, их углеродные цепи имеют нечётное количество атомов, а у моноенов двойная связь находится в положении  $\Delta 11$ . Бактерии по большей части не способны синтезировать ПНЖК, за исключением небольшой группы обитателей экстремальных систем (барофильные и психрофильные виды), либо симбионты пойкилотермных животных (Сущик, 2008). Исследования наземных и водных грибов показали, что 16:0, 18:0, 18:1n-9 и ЛК являются наиболее распространёнными ЖК у грибов. Синтез ДЦ-ПНЖК не замечен (Guo и др., 2016).

Условия окружающей среды могут изменять видовой состав сообществ перифитона и, в меньшей степени, биохимический состав внутри таксонов водорослей (Guo и др., 2022). Интенсивность света, доступность питательных веществ, а также температура являются наиболее важными факторами окружающей среды, влияющими на содержание ПНЖК водорослей. Кроме того, повышенный уровень CO<sub>2</sub>, pH-стресс и загрязнители окружающей среды также воздействовали на ПНЖК водорослей (Guo и др., 2016).

- Водоросли адаптируются к низкой температуре за счет увеличения степени ненасыщенности, что приводит к увеличению содержания ПНЖК, которые включаются в липиды мембран и способствуют поддержанию их текучести.
- Свет может стимулировать синтез жирных кислот водорослей, рост и образование мембран (особенно хлоропластов). Синтез жирных кислот *de novo* в значительной степени зависит от NADPH, который образуется в результате световой реакции фотосинтеза. В целом слабое освещение приводит к увеличению относительного содержания ПНЖК, в то время как высокая интенсивность света необходима для синтеза насыщенных жирных кислот.
- Ограничение питательных веществ приводит к неуклонному снижению скорости деления клеток, что, в свою очередь, замедляет рост водорослей и обычно приводит к увеличению клеточной продукции ТАГ и снижению содержания ПНЖК у большинства водорослей, в то время как более высокие уровни питательных веществ в водной среде вызывают увеличение содержания галактолипидов, богатых ПНЖК.
- Повышенный уровень CO<sub>2</sub> обычно приводит к снижению степени ненасыщенности ЖК водорослей, но не у всех. У *Nannochloropsis* повышенное содержание CO<sub>2</sub> значительно увеличило содержание ЭПК.
- Было обнаружено, что щелочной pH-стресс приводит к накоплению ТАГ и снижению содержания мембранных липидов у *Chlorella*. Однако

при культивировании *Chlamydomonas* при среднем значении pH относительный процент ТАГ в общем содержании липидов был выше, чем при более высоких значениях pH.

- Воздействие Cd имело положительную корреляцию с ТАГ, вызывая повышение степени насыщения и снижение содержания ПНЖК. Обработка микроводорослей (например, *Chlamydomonas*) увеличивала содержание моноенов, одновременно уменьшая содержание ПНЖК.

Прогнозируется, что повышение температуры воды в результате глобального потепления приведет к снижению глобального производства ЭПК и ДГК в водорослях; ЭПК может быть снижена на 8,2%, а ДГК на 27,8% при повышении температуры воды на 2,5°C. Глобальное потепление, растущие объёмы выбросов загрязняющих веществ, учащающаяся эвтрофикация – всё это угрожает производству ДЦ-ПНЖК водорослями в ручьях и реках, что негативно скажется на пресноводных и наземных потребителях (Guo и др., 2017).

### 1.5.2. Первичные консументы

Было замечено, что на низких трофических уровнях, несмотря на одинаковые стратегии питания (потребление одинакового вида пищи и/или пропорции), отдельные популяции одного и того же вида могут демонстрировать разный состав ПНЖК, отражающий разные способности к метаболизму ЖК. Из этого выходит, что речные беспозвоночные являются не простыми «сборщиками», а скорее «избирательными удерживателями» диетических ЖК (Guo и др., 2016). Кроме того, в недавнем исследовании McInerney, проведенное в реках низменностей Австралии, можно было увидеть способность беспозвоночных к биоконверсии ПНЖК. Так, несмотря на явные различия в качестве питания водорослей между поймами и руслами

рек, профили ЖК у зообентоса и зоопланктона были сходны между этими местообитаниями (McInerney и др., 2020). Таким образом, первичные консументы способны значительно модифицировать ЖК, сохраняя или даже повышая ценность ЖК продуцентов, что подчёркивает важность изучения всех ступеней пищевой пирамиды.

На основании литературных данных можно выявить некоторые общие закономерности ЖК беспозвоночных. В целом, 16:0 является наиболее доминирующей насыщенной жирной кислотой, за ней следуют 18:0 и 14:0. 18:1n-9, 16:1n-7, 16:1n-9 и 18:1n-7 являются наиболее распространенными МНЖК. Среди ПНЖК ЭПК является наиболее распространенной n-3 ПНЖК у большинства водных беспозвоночных, за которой следует АЛК, а ЛК является наиболее распространенной n-6 ПНЖК, за которой следует АРК. Содержание ДГК сильно варьирует между таксонами (Guo и др., 2022). Так личинки насекомых в ручьях не накапливают ДГК, но нуждаются в ЭПК и АРК для своего соматического роста и размножения. Функция ДГК для правильного развития нервной ткани и ткани сетчатки, вероятно, выполняется у насекомых с помощью ЭПК (Guo и др., 2017; Zhang и др., 2020). Однако есть и исключения. Некоторые личинки амфибионтных насекомых помимо ЭПК, накапливают ДГК в значительных количествах, например, личинки из семейства Chaoboridae (Makhutova и др., 2022).

Среди ракообразных Cladocera и Copepoda, являются наиболее доминирующими таксонами планктона во внутренних водах. Они содержат важные уровни 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3 и 20:5n-3 (Makhutova и др., 2022). Известно, что кладоцеры содержат большое количество ЭПК, меньшее количество АРК и незначительное количество ДГК, тогда как копеподы содержат в основном ДГК с относительно меньшим количеством ЭПК и АРК (Taipale и др., 2011). Высокие концентрации ДГК у копепод могут быть предпосылкой для более развитой нервной системы по сравнению с кладоцерами. Веслоногие ракообразные имеют множество

хемотрецепторов и механорецепторов на их антеннах и ротовых отростках, которые необходимы для их способности избирательно питаться, выслеживать жертв, обнаруживать хищников и убегать от них. В дополнение к этим филогенетическим различиям на содержание ПНЖК в зоопланктоне влияет рацион питания. Например, содержание ПНЖК у хищного зоопланктона, питавшегося богатой ПНЖК диетой, было выше, чем у фильтрующего зоопланктона с диетой с низким содержанием ПНЖК (Kainz и др., 2009).

Арахидоновая кислота, по-видимому, является ключевой ПНЖК для дафний и зоопланктона в целом. АРК имеет решающее значение для мембран зоопланктона, поскольку эта  $n-6$  ПНЖК в высокой степени сохраняется при голодании, а также при питании зоопланктоном (Taipale и др., 2011). Было также показано, что АРК участвует в линьке, поддерживает соматический рост и размножение хирономид и эфемерид (Guo и др., 2016), а её эйкозаноиды участвуют в процессах яйцекладки у насекомых (Kainz и др., 2009). Поскольку АРК синтезируется очень небольшим количеством фитопланктона, зоопланктону необходимо биоконвертировать эту молекулу путем удлинения и десатурации предшественников, таких как ЛК, или, альтернативно, путем ретроконверсии  $22:5n-6$  (ДПК). При том, дафниям предпочтительнее ретроконвертировать АРК из ДПК, а не удлинять и десатурировать эту молекулу из более коротких предшественников. Тем самым криптофиты, которые обычно имеют очень высокое соотношение  $n-3/n-6$  и не имеют АРК, являются гораздо лучшим источником АРК в системе с дафниями, чем зеленые водоросли, из-за большего количества ДПК (Taipale и др., 2011). При всём при этом, нельзя не сказать о важности ЭПК для зоопланктона. В последние годы вышло немало доказательств, что ЭПК (и другие  $n-3$  ПНЖК) могут лимитировать рост и размножение нехищного зоопланктона (Сущик, 2008).



Бентосные Ostracoda и Amphipoda богаты ЭПК и ДГК. Однако высокие уровни 22:6n-3 у пресноводных и морских амфипод является следствием хищничества (Makhutova и др., 2022).

Моллюски синтезируют специфические ЖК – метилден-разделённые (НМР ЖК), играющие структурную и антиоксидантную (защитную) роль в клеточных мембранах. Например, бентические моллюски синтезируют метилден-разделённые ЖК с двумя или тремя двойными связями из МНЖК, что рассматривается как адаптация к их специфическим местам обитания или дефициту физиологически важных ЭПК и ДГК в их рационе. Помимо НМР ЖК, моллюски богаты 20:1n-13. Gastropoda обычно содержат значительные количества n-6 ДЦ-ПНЖК, а именно 20:4n-6 и 22:4n-6 (Makhutova и др., 2022).

Помимо перечисленных выше таксонов беспозвоночных, в пресноводных экосистемах широко распространены Annelida (особенно Oligochaeta и Hirudinea) и Platyhelminthes. Олигохеты содержат множество ЖК, в том числе ПНЖК. Уровень 20:5n-3 может достигать 22% от общего количества ЖК, тогда как уровень 22:6n-3 обычно низкий. Некоторые пресноводные виды семейства Planariidae (Platyhelminthes) содержат очень высокий уровень 22:5n-3 (9%) (Makhutova и др., 2022).

Жирнокислотный состав консументов, отчасти, изменчивая характеристика, на которую влияют множество факторов. Экосистема водных объектов сложна и содержит множество экологических ниш. Каждая ниша обладает своими особыми характеристиками, вплоть до жирнокислотного состава продуцентов и консументов, зависящего от видового состава. Как правило считается, что сходные организмы, относящиеся к одному роду или даже семейству, обладают сходным жирнокислотным составом. Однако географические барьеры и изменения условий среды под действием эволюции способны менять организмы, вплоть

до биохимического состава. С возникновением фотосинтеза свет стал главным фактором классических экосистем (основанных на фотосинтезирующих организмах). Соответственно свет играет ключевую роль в пространственном распределении любой растительности, которая, в свою очередь, влияет на распределение её поедателей. В глубоководных водоёмах фитопланктон и большая часть перифитонных водорослей располагаются в прибрежной световой зоне, в литорали. Собственно, при изучении семейства хирономид (комары-звонцы), было выявлено, что виды рода *Chironomus*, населяющие глубоководные части водоёма, обладают низким содержанием ПНЖК, тогда как *Glyptotendipes barbipes*, обитающие на литорали, более богаты ПНЖК (Махутова и др., 2017). Состав и содержание ЖК непостоянны и изменяются в ходе жизненного цикла. Обычно содержание ПНЖК у имаго превышает таковое у личинок (Борисова и др., 2016). Как известно наша планета шарообразная и температура на ней зависит от расстояния от солнца, вследствие чего возникает высотная поясность с разным температурным режимом (климатом). Предполагалось, что на содержание ПНЖК у водных беспозвоночных с разных широт может влиять температурная адаптация. Ряд работ подтверждают гипотезу температурной адаптации, демонстрируя увеличение концентрации ПНЖК у большого числа видов зоопланктона (ветвистоусых рачков) при понижении температуры (Masclaux и др., 2012). Однако есть ряд исследований с противоположными результатами, в которых не было обнаружено существенных различий в содержании ПНЖК между беспозвоночными из тепловодных и холодноводных областей и широт. (Махутова и др., 2014; Guo и др., 2017; Kattner и Hagen, 2009). Иная теория гласила, что влияние температуры воды на содержание ПНЖК в пресноводном зоопланктоне проявляется не столько на уровне индивидуальной физиологической реакции отдельных видов, сколько в основном за счет изменения таксономической структуры зоопланктонного сообщества; тем самым с потеплением климата

увеличивается доля богатых ДГК кладоцер в пресноводном зоопланктонном сообществе (Gladyshev и др., 2011; Hampton и др., 2008).

### 1.5.3. ЖК состав рыб

Содержание суммы ЭПК и ДГК в биомассе рыбы из природных местообитаний в значительной мере определяется её таксономической принадлежностью. Представители отрядов карпообразных (Cypriniformes) и силуриобразных (Siluriformes) имеют сравнительно низкие средние значения содержания ЭПК и ДГК, окунеобразные (Perciformes) чуть больше, тогда как лососеобразные (Salmoniformes) и сельдеобразные (Clupeiformes) отличаются высоким содержанием этих кислот (Гладышев, 2021; Gladyshev и др., 2018; Guo и др., 2017). В целом, наибольшее значение для содержания ЭПК и ДГК имеет взаимодействие филогенетических и экологических факторов (Gladyshev и др., 2018). Обычно для видов из отряда Salmoniformes характерно содержание суммы ЭПК и ДГК в мышцах в интервале приблизительно от 2 до 6 мг/г сырой массы (Гладышев и др., 2018). Содержание ДГК у лососеобразных, сельдеобразных и окунеобразных выше, чем у карпообразных и силуриобразных. Это может быть связано с различиями в питании, поскольку лососевые, сельдеобразные и окунеобразные обитают в основном в поверхностных водах открытых морей и океанов, поэтому они приспособлены к быстрому непрерывному плаванию во время дальних миграций в поисках зон продуктивности планктона, чему и способствует содержание ДЦ-ПНЖК в мышечной ткани. Кроме того, более высокое содержание ДГК у лососевых и окунеобразных может быть связано с различиями в температурных требованиях каждого таксона рыб. Лососевые в основном встречаются в местах обитания с температурой воды не превышающей 20°C, и эти рыбы часто встречаются в ручьях, где средняя температура воды зимой составляет 0°C, подобно окунеобразным, в то время как карп и сом обычно обитают при высоких температурах. Кроме того, лососеобразные и окунеобразные часто обитают в местах, где ЭПК

водорослей в изобилии, и преобразование ЭПК в ДГК может быть более эффективным, чем для других таксонов рыб. Напротив, карпообразным и силуруобразным, которые обычно обитают в теплых водах и там, где у водорослей низкое содержание ЭПК, требуется больше энергии для преобразования диетической АЛК в ЭПК, а затем в ДГК, что очень затратно и менее эффективно (Guo и др., 2017).

Мышечная ткань – это то, что в первую очередь интересует конечного потребителя (человека). Многочисленные результаты анализов тканей спинных мышц показывают, что ДГК была наиболее удерживаемой ПНЖК во всех рыбах всех экосистем (Heissenberger и др., 2010). И это не удивительно, ведь ДГК считают «стимуляторов» метаболизма клеток животных. В скелетной мускулатуре была обнаружена сильная положительная корреляция между содержанием ДГК в фосфолипидах клеточных мембран и скоростью метаболизма. Как говорилось ранее (см. «Роль липидов в организме»), высокое содержание ДГК в мембранных фосфолипидах обеспечивает более высокую активность фермента – натрий-калиевого насоса ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - АТФазы), что особенно важно для обеспечения потенциала действия в возбудимых клетках, в том числе мышечных клетках или волокнах. Кроме того, считается, что ДГК усиливает активность связанных с мембраной ферментов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ); следовательно, наиболее активные (высокочастотные сокращения) мышцы, обеспечивающие высокую частоту дыхания, имеют более высокие концентрации ДГК по сравнению с менее активными мышцами (Gladyshev и др., 2018). ЭПК в рыбах естественных местообитаний является второй по содержанию ПНЖК (Heissenberger и др., 2010). Наблюдается значительное количество пищевых ЖК маркёров, что объясняется высокими энергетическими потребностями этой ткани (Makhutova и Stoyanov, 2021).

Считалось, что ЖК спектр печени рыб отражает ЖК спектр их рациона, так как одной из её функций является накопление запасных липидов. ЖК

состав печень, безусловно, содержит пищевые ЖК маркёры. Однако лишь у некоторых рыб (например, у трески) печень – депо липидов. Печень служит основным местом метаболизма ЖК, включая синтез ЖК. В результате это может быть частично ответственно за «затемнение зеркального эффекта» между диетой и ЖК ткани печени. Наблюдается высокое содержание ДЦ-ПНЖК (АРК, ЭПК, ДГК) (Ху и др., 2020).

Глаза и, в частности, ткани головного мозга имеют специфические функциональные потребности или метаболизм ЖК, и, таким образом, их состав ЖК находится под строгим физиологическим контролем и, следовательно, менее репрезентативен для ЖК, поступающих с пищей. При наблюдении за профилем ЖК ткани головного мозга наиболее отличительной характеристикой было четкое селективное исключение 18:2n-6, за которым следовало селективное отложение 18:0 и ДГК (Ху и др., 2020). В целом, головной мозг имеет самый низкий уровень n-6 ПНЖК среди других тканей, от чего отношение n-3/n-6 в головном мозге самое высокое (Makhutova и Stoyanov, 2021). ДГК играет важную роль в зрительной и нервной системе многих видов рыб. Накопление 18:0 в мозгу рыб свидетельствует о четкой функции этой ЖК в нервной системе рыб. Экзогенная 18:0 у млекопитающих играет критическую роль в мембранном синтезе нейронов и астроцитов и активации временного рецепторного потенциала A1 сенсорного рецептора в нейронах. Кроме того, 18:0 является наиболее распространённой ЖК в фосфатидилсерине (ФС), который играет ключевую роль в когнитивной деятельности, когнитивном старении и сохранении когнитивных функциональных способностей в мозге млекопитающих. У рыб в настоящее время имеется пока мало информации о роли и функциях 18:0 в нервной системе. Исследование на палтусе показало, что фосфатидилэтанолламин (ФЭ) в головном мозге имеет более высокое содержание 18:0 по сравнению с фосфатидилхолин (ФХ). В недавнем исследовании сообщается о высоком уровне экспрессии гена элонгазы

Elovl6, которая способствует удлинению от 16:0 до 18:0 в мозге большого желтого горбыля (*Larmichthys crocea*). Это говорит о том, что относительно высокие уровни 18:0 в мозговой ткани рыб могут быть результатом избирательного отложения или, в некоторых случаях, биосинтеза *de novo*. Тем не менее, оба процесса свидетельствуют о критической функции этой ЖК в нервной системе рыб. В отличие от 18:0 в головном мозге рыб среднее содержание 18:2n-6 и 18:3n-3 было значительно ниже по сравнению с другими тканями. Это указывает на то, что и 18:2n-6, и 18:3n-3 избирательно и активно исключались из отложений и, вероятно, использовались для катаболических целей и производства энергии, что вполне могло быть их основной функцией в тканях мозга рыб (Ху и др., 2020). Сообщается также об исключительном присутствии в мозге 24:1n-9, играющая важную роль в процессе миелинизации нервных волокон (Makhutova и Stoyanov, 2021).

Внутрибрюшинный жир является в первую очередь органом хранения с ограниченным активным метаболизмом и избирательной задержкой липидов. По сравнению с мышцами внутрибрюшинный жир имеет более низкое содержание ДГК, 22:5n-3, ЭПК, АРК, 16:0 и 18:0, но более высокие уровни 18:3n-3, 18:2n-6, 18:1n-9, 16:1n-7 и 14:0 (Ху и др., 2020). В целом, исходя из основной функции, жировая ткань обладает наибольшим содержанием пищевых ЖК маркёров и наибольшим суммарным содержанием ЖК среди всех тканей (Makhutova и Stoyanov, 2021). Предполагается, что внутрибрюшинный жир может также играть важную роль в иммунной функции, включая воспалительные и противовоспалительные процессы. Таким образом, относительно более высокое содержание ЭПК во внутрибрюшинном жире может быть ответом на баланс АРК где обе жирные кислоты участвуют в производстве эйкозаноидов. 18:1n-9 является основным субстратом для синтеза ТАГ и обычно используется для накопления энергии, а потому был

зарегистрирован в относительно высоких концентрациях во внутрибрюшинном жире (Ху и др., 2020).

Кишечные отделы рыб являются важным местом биосинтеза ДЦ-ПНЖК. У атлантической трески, например, хотя общая способность к биосинтезу ДЦ-ПНЖК обычно считается низкой, биосинтез в энтероцитах был в 7 раз выше, чем в гепатоцитах. Содержание ДЦ-ПНЖК в кишечнике схоже с мышечной тканью. При этом среднее содержание 18:1n-9 ниже чем в печени и жировой ткани. Это подтверждает мнение о том, что кишечный тракт рыб, вероятно, является активным местом для целевого метаболизма липидов в дополнение к его роли в качестве ключевого места для поглощения питательных веществ (Ху и др., 2020).

Профили жирных кислот в коже более точно отражают профили пищевых ЖК по сравнению с мышечной тканью и печенью. Ткани сердца демонстрируют большие различия в профиле жирных кислот по отношению к диете. Содержание 16:0, 18:0 и АРК значительно выше, а 18:3n-3 значительно ниже по сравнению с мышечной тканью, что согласуется с высоким содержанием ФЛ в сердце. Что касается функциональности АРК у млекопитающих, сообщалось, что неэтерифицированная свободная АРК влияет на возбудимость нейронов и синаптическую передачу, тем самым способствуя регуляции электрической активности возбудимых тканей, таких как мозг, сердце и мышцы. АРК также может играть важную роль в модулировании проницаемости мембраны митохондрий сердца и является хорошо известным предшественником продукции эйкозаноидов, что имеет решающее значение для функции сердца (Ху и др., 2020).

## **1.6. Факторы, влияющие на ЖК состав рыб**

### **1.6.1. Роль питания в формировании ЖК состава**

Рыбы не способны синтезировать ПНЖК *de novo*, поэтому питание играет ключевую роль в их жирнокислотном профиле. В целом, эффективность усвоения ЖК из пищи соответствует последовательности: ПНЖК > МНЖК > НЖК. Для НЖК и МНЖК степень всасывания снижается с увеличением длины цепи (Johnsen и др., 2000). Однако в большинстве исследований усвояемость различных ЖК обычно высока (> 90%), и очевидны лишь незначительные различия между отдельными ЖК. Несмотря на это, было показано, что на эффективность транспорта липидов и, соответственно, на усвояемость ЖК может влиять содержание фосфолипидов и холестерина (Ху и др., 2020). Сравнение составов диетических и тканевых жирных кислот показало, что чем выше концентрация жирной кислоты в рационе, тем ниже ее относительное удерживание (Mougoig и др., 2018).

Потребности рыб в ПНЖК сильно варьируют. Достаточным считается содержание ~1% (0.4–2.0%) незаменимых ПНЖК от сухой массы пищи (Махутова и Гладышев, 2020). При этом потребность в ДЦ-ПНЖК обычно у мальков выше, чем у молодежи или взрослых стадий (Jin и др., 2018).

Изменение ЖК состава корма приводит к подобному изменению и потребителя. В целом, скорость изменения жирнокислотного состава после кормления растительными маслами по сравнению с рыбьими жирами у сеголетков выше, чем у молодежи. Это говорит о том, что сеголетки имеют меньший метаболический регуляторный контроль при кормлении растительной диетой, чем молодежь (Jin и др., 2018).

Влияние питания на ЖК состав рыбы имеет свою специфичность. Так в работе Guo с соавторами (2022) можно увидеть, что пока в мышечных тканях одной рыбы (*Salmo trutta*) содержание ДГК оставалось стабильным и не соответствовало изменениям ЖК перифитона, что свидетельствует о сильной регуляции ДГК у этого вида, не зависящей от водных источников пищи;



содержание ДГК и ЭПК в мышцах другой рыбы (*Cottus gobio*) значительно снижалось при снижении качества перифитона, что отражает сильное влияние качества питания перифитона на состав ЖК этой рыбы.

Интенсивность синтеза ЭПК и ДГК из АЛК зависит от рациона рыб: ферменты синтеза длинноцепочечных ПНЖК, десатуразы и элонгазы, активируются при недостатке ЭПК и ДГК и ингибируются при их избытке. Кроме того, синтез длинноцепочечных ПНЖК является субстратзависимым: при увеличении количества субстрата – пищевой АЛК – валовая продукция ЭПК и ДГК в биомассе рыбы возрастает. Замена рыбьего жира, содержащего ЭПК и ДГК, растительным маслом, содержащим только АЛК, стимулирует собственный синтез ЭПК и ДГК из АЛК, который не способен поддерживать их содержание в биомассе на столь же высоком уровне, как у рыб, питающихся кормом на основе рыбьего жира (Bell и Tocher, 2009). То есть рыбы, выращенные на корме без рыбьего жира, имеют относительно низкое содержание ЭПК и ДГК. Фактически собственный синтез ЭПК и ДГК направлен лишь на поддержание сравнительно небольших нормальных физиологических потребностей и эволюционно не приспособлен для обеспечения запасов этих ПНЖК в резервных липидах, таких как триацилглицериды (ТАГ) (Гладышев, 2021).

Эксперименты с выращиванием рыб на кормах, с разным составом и содержанием ПНЖК показали негативное влияние диет с дефицитом ДЦ-ПНЖК на скорость роста рыб, что может быть связано с затратами на метаболизм, связанным с превращением предшественников АЛК и ЛК в ЭПК, ДГК и АРК (Ebm и др., 2021).

Ряд данных указывают на то, что с повышением трофического положения консументов содержание n-3 и n-6 ПНЖК у пресноводных рыб уменьшается (Kainz и др., 2017). Недавно было продемонстрировано, что способность вида к синтезу ДЦ-ПНЖК коррелирует с трофическим

уровнем рыбы; при этом рыбы, занимающие более низкие трофические уровни (т. е. трофический уровень  $< 3$ ), способны к синтезу ДЦ-ПНЖК, в то время как те, более высокие трофические уровни (т.е. трофический уровень  $> 4$ ) неспособны или обладают ограниченной способностью синтезировать ДЦ-ПНЖК из предшественников С18 ПНЖК. В подтверждение этого указывают, что с повышением трофического уровня ЖК мышц в большей степени отражают ЖК рациона (Хи и др., 2020). Однако результаты исследований Garrido (2019) и Galindo с соавторами (2021), полученные на четырёх и трех видах соответственно рыб с разным трофическим уровнем, показали, что этот фактор не может быть хорошим индикатором биосинтеза ДЦ-ПНЖК. Трофическая специализация не отражает функционализацию (диверсификацию) Fads2 костистых рыб (Garrido и др., 2019).

Смена кормовой базы на более богатую ДЦ-ПНЖК, в особенности ДГК, у рыб с активной способностью к биосинтезу ДЦ-ПНЖК, обеспечивающей её физиологические потребности, не приводит к повышению качества рыбы для потребителя. Так как ДГК может иметь относительно низкое удерживание при употреблении высокой концентрации (Tocher, 2010). Хотя и предполагается, что рыбы предпочитают прямое включение диетической ДГК, поскольку это снижает более энергозатратный путь эндогенного производства (Ebm и др., 2021), сообщается и обратная ситуация. В исследовании Махутовой и Стоянова (2021) было продемонстрировано, что при смене рациона байкальского хариуса (*Thymallus baicalensis*) с обеднённого на более богатый ДГК за счёт появления интродуцентов наблюдалось накопления данной ЖК в задней кишке, что говорит об активном её выделении. Это, вероятно, происходит чтобы предотвратить подавление синтеза этой ЖК рыбами. Отсюда следует, что эндогенное поступление ПНЖК более приоритетнее, чем экзогенное.

### 1.6.2. Другие факторы

Безусловно, как и другие пищевые питательные вещества, ЖК в тканях рыб сильно зависят от рациона, однако говорить, что рыба – всего лишь продукт её рациона, опуская роль других факторов, формирующих её особый жирнокислотный профиль и потребности, совершенно неправильно. Содержание и состав ЖК в тканях рыб в большей степени подвержены влиянию множества других, часто взаимосвязанных факторов (Хи и др., 2020).

Включение ЖК в ткани модулируется различными метаболическими факторами такими как, селективное включение,  $\beta$ -окисление, липогенная активность, процессы удлинения и десатурации ЖК. Взаимосвязанные факторы, такие как окружающая среда, размер, возраст и физиологическое состояние рыбы, дополнительно модулируют и влияют на эти метаболические процессы. Следовательно, окончательный состав ЖК в тканях рыбы зависит от начального содержания ЖК, кумулятивного нетто-потребления, усвояемости пищевых ЖК, скорости роста, временного периода, размера рыбы, физиологического статуса и условий окружающей среды (Хи и др., 2020).

Ограниченное питание (голодание) приводит к избирательному удержанию одних ЖК и, наоборот, к преимущественной энергетической мобилизации других, запасных ЖК (Хи и др., 2020). В качестве компонентов триацилглицерина (ТАГ) и других запасных липидов (например, эфиры парафина), ПНЖК могут действовать как резерв энергии, с её получением через  $\beta$ -окисление жирных кислот в митохондриях (Monroig и др., 2018). На основании относительной скорости окисления, измеренной *in vitro*, выявлен общий приоритет мобилизации ЖК для  $\beta$ -окисления: МНЖК и НЖК > ДЦ-ПНЖК, причем n-6 ПНЖК окисляются лучше, чем n-3 ПНЖК (Henderson, 1996). У многих видов рыб наиболее предпочтительными могут быть 18:1n-9, 16:1n-7 и 16:0. Сообщалось, что достаточное количество 18:1n-9, который

является основным субстратом ЖК для мобилизации энергии, может уберечь ПНЖК в рыбьем жире от  $\beta$ -окисления (Ху и др., 2020). А вообще, степень, в которой любая жирная кислота, используется для получения энергии, в значительной степени зависит от его концентрации в рационе (Tocher, 2010). Несмотря на хорошо известное физиологическое значение ЭПК и ДГК в тканях рыб, обе они чувствительны к  $\beta$ -окислению, когда поступают с пищей в избытке (Ху и др., 2020).

Как уже не раз упоминалось, способность к трофической модернизации сильно отличается у морских и пресноводных рыб. Помимо разного рациона и филогении, нельзя забывать и о климате. Экофизиология тепловой адаптации к сезонным колебаниям температуры внутренних вод может влиять на накопление липидов в большей степени, чем в термически стабильной морской среде. Такую температурную адаптацию называют ещё «гомеовязкостной адаптацией». Различия в общем содержании липидов и профиле различных типов липидов характерны для адаптации рыб и других позвоночных к холоду (Dikić и др., 2017). Воздействие на рыбу более низких температур часто ведёт к повышенной ненасыщенности липидов клеточных мембран (например, фосфолипидов) для поддержания текучести мембраны за счет высокого удержания и активации биосинтеза МНЖК и ПНЖК (Monroig и др., 2018). Текучесть ненасыщенных жирных кислот основана на физических свойствах этих молекул. В насыщенных жирных кислотах свободное вращение вокруг каждой углерод-углеродной связи придает углеводородной цепи большую гибкость; наиболее устойчивой конформацией является полностью вытянутая форма. Эти молекулы могут плотно упаковываться в почти кристаллические массивы, при этом атомы по всей их длине находятся в ван-дер-ваальсовом контакте с атомами соседних молекул. В ненасыщенных жирных кислотах двойная цис-связь создает изгиб в углеводородной цепи. Жирные кислоты с одним или несколькими такими перегибами не могут упаковываться вместе так же плотно, как полностью

насыщенные жирные кислоты, и поэтому их взаимодействие друг с другом слабее, что и придаёт текучесть мембранам (Nelson и Cox, 2012). Так ДГК действует как «антифризоподобное» соединение в мембранных фосфолипидах, увеличивая гибкость мембраны, а благодаря большому количеству двойных связей, оказывает большее влияние на текучесть мембраны, чем другие ПНЖК (Guo и др., 2017).

Такое изменение липидного состава происходит не только в ответ на более низкую температуру, но и давление. Действительно, сравнение двух близкородственных видов морских нематод, а именно *Halomonhystera disjuncta*, обитающих в приливной зоне, и *Halomonhystera hermesii* из глубоководных местообитаний, показало, что путь удлинения ЖК был более заметным у *H. hermesii*, предполагая, что этот вид адаптируется к высоким давлению за счет биосинтеза ПНЖК (Monroig и Kabeya, 2018).

Солёность - еще один фактор окружающей среды, который влияет на содержание ДЦ-ПНЖК в рыбе. Считается, что воздействие на рыб разной солёности вызывает осморегуляторную реакцию, необходимую для адаптации, которая связана с преобразованием мембранных липидов для обеспечения нормальной функции мембраносвязанных белков (Monroig и Kabeya, 2018). Влияние изменения солёности на метаболизм ЖК изучено в основном у эвригалинных рыб. Увеличение содержания ДЦ-ПНЖК в ответ на более высокую солёность наблюдалось в экспериментах с атлантическим лососем (*Salmo salar*), европейским морским окунем (*Dicentrarchus labrax*), кефалью (*Mugil cephalus*), красным морским лещом (*Pagrus major*) и судаком (*Sander lucioperca*) (Xu и др., 2020).

Процессы внутренней регуляции, связанные с изменением физиологических потребностей в ПНЖК в течение онтогенеза, оказывают такое же важное влияние на состав жирных кислот рыбы, как и рацион. Сообщалось об изменениях состава ЖК в связи с репродуктивной

активностью в тканях гонад, мышц и печени (Ebm и др., 2021). Например, в процессе созревания ДЦ-ПНЖК избирательно перемещаются из мышц и включаются в гонады (Gora и др., 2022). Во время гонадогенеза в мышцах атлантической трески (*Gadus morhua*) и *Cynoglossus semilaevis* была в значительной степени мобилизована АРК, тогда как у радужной форели преимущественно мобилизовывалась ЭПК. У таких видов рыб, как европейский сом (*Siurus glanis*), дорада (*Sparus aurata*) и палтус, доля ДГК в мышечной ткани снижалась во время роста при достижении репродуктивной зрелости (Ху и др., 2020).

У рыб, достигающих репродуктивной зрелости, относительно низкое включение ДЦ-ПНЖК в мышечные ткани может быть связано с избирательным включением в гонады. Во время гонадогенеза в мышцах атлантической трески (*Gadus morhua*) и *Cynoglossus semilaevis* была в значительной степени мобилизована АРК, тогда как у радужной форели преимущественно мобилизовывалась ЭПК (Ху и др., 2020).

Плотности посадки рыб - это важный фактор для аквакультурных предприятий, влияющий на состав ЖК и уровень липидов в выращиваемой рыбе. Выращивание с более высокой плотностью посадки ( $2.3 \text{ кг/м}^2$ ) в мышцах камбалы (*Solea solea*) привело к более низкому содержанию МНЖК и более высокому содержанию НЖК по сравнению с выращиванием с более низкой плотностью посадки ( $1.3 \text{ кг/м}^2$ ). Кроме того, у дорады содержание в печени 18:1n-9, АРК и n-3 ПНЖК уменьшались с увеличением плотности посадки. Стоит отметить, что плотность посадки не влияет на профиль ЖК мышц морского окуня и дорады. Неоптимальная плотность поголовья, в частности, избыточное поголовье, может вызвать у рыб стресс, который неминуемо повлечёт за собой серьёзные энергозатраты, а значит окажет влияние на метаболизм липидов (мобилизации запасов) (Ху и др., 2020).

В поисках оптимизации использования рыбьего жира при кормлении рыб за счёт повышения его эффективности усвоения рыбами (повышения уровня омега-3 ПНЖК) исследователи задались вопросом: «влияет ли время кормления на отложение жирных кислот из рациона?». Было выявлено, что у радужной форели чередование корма, содержащего рыбий жир, и корма, содержащего масла канолы, в утреннее и дневное кормление приводит к различиям в конечном составе ЖК тканей рыб в отличие от регулярного смешенного корма. В частности, содержание 18:2n-6 и 18:3n-3 ЖК было значительно выше при после полуденного (в англоязычной литературе pm (от лат. post meridiem)) кормления маслом канолы по сравнению с аналогичным, но до полуденным (в англоязычной литературе am (от лат. ante meridiem)) или регулярным смешенным кормлением. Эти результаты указывают на существование циклических циркадных закономерностей, связанных с использованием/сохранением ЖК (Brown и др., 2010).

Другие второстепенные пищевые питательные вещества, такие как минералы, витамины и функциональные питательные вещества также способны влиять на метаболизм и удерживание ЖК. Например, L-карнитин играет ключевую роль в  $\beta$ -окислении ЖК у рыб. Было показано, что у радужной форели уровень пиридоксина (витамина B6) в рационе модулирует и положительно стимулирует активность ЖК-элонгазы и ферментов  $\Delta 6$  и  $\Delta 5$ -десатуразы. Другие витамины, в частности, рибофлавин (B2), биотин (B7) и ниацин (B3) необходимы для биоконверсии ЖК у атлантического лосося. Было показано, что диетические минералы, такие как кальций, фосфор, железо, магний, цинк, селен и марганец, влияют на метаболические процессы жирных кислот посредством различных механизмов. В связи с этим было показано, что уровень железа в пище модулирует активность ферментов - десатураз и влияет на конечное содержание n-3 ДЦ-ПНЖК в тканях радужной форели. Ресвератрол, фенольное соединение с функциональной добавкой, увеличивает содержание ДЦ-ПНЖК в радужной

форели и дораде и изменяет транскрипцию генов, связанных с  $\Delta 6$  активностью и  $\beta$ -окислением. Интересно, что пестицид хлорпирифос-метил в растительных ингредиентах значительно снижал содержание АРК в фосфолипидах печени атлантического лосося, что сопровождалось значительным повышением содержания 16:0, тогда как синтетический пептид, стимулирующий секрецию гормона роста, в рационах нильской тилляпии значительно повышало содержание n-3 ДЦ-ПНЖК как в мышцах, так и в печени (Ху и др., 2020). Кроме того, добавление в рацион холестерина индуцировало значительное увеличение экспрессии генов и активности ферментов  $\Delta 6$  Fads и Elovl *in vivo* в печени форели, которую кормили диетой на основе растительных масел (Monroig и др., 2018).

Таким образом, мы должны понимать, что формирование ЖК состава организма – это сложный процесс. Включение ЖК в ткани модулируется различными метаболическими факторами такими как, селективное включение,  $\beta$ -окисление, липогенная активность, процессы удлинения и десатурации ЖК. Взаимосвязанные факторы, такие как окружающая среда, размер, возраст и физиологическое состояние рыбы, дополнительно модулируют и влияют на эти метаболические процессы. Следовательно, окончательный состав ЖК в тканях рыбы зависит от начального содержания ЖК, кумулятивного нетто-потребления, усвояемости пищевых ЖК, скорости роста, временного масштаба, размера рыбы, физиологического статуса и условий окружающей среды (Ху и др., 2020).

## 1.7. Характеристика хариуса

Сравнительные многих межвидовые и внутривидовые исследования показали, что несколько таксономических групп и видов рыб различаются по их способности синтезировать, биохимически преобразовывать или



накапливать незаменимые ЖК. Наиболее богатыми липидами и ПНЖК среди рыб, являются лососеобразные (Dikić, 2017).

Хариус байкальский (лат. *Thymallus baicalensis*) – это представитель отряда лососеобразных (лат. Salmoniformes), семейства лососевых (лат. Salmonidae), подсемейству хариусовых. Хариус - один из важнейших промысловых видов в холодноводных пресных водоёмах в Красноярском крае (Makhutova, 2021). Характерным признаком является большой (более 17 лучей) спинной плавник, задняя часть которого у половозрелых самцов в сложенном состоянии достигает жирового, а иногда и основания хвостового плавников. Длина тела достигает 45-50 см, масса – около 1 кг (в среднем 300-500 г), редко более 2 кг. Окраска рыб варьирует в зависимости от характера грунта, освещенности и типа водоема: в горных таежных реках окраска тела темная (темнофиолетовая), в мелких речках преобладают более светлые тона. Хариус требователен к высокому содержанию кислорода в воде. Обычно обитает в реках с быстрым течением и сравнительно низкими температурами воды (Чупров, 2012).

Нерестится хариус после распаления льда (май-июнь) в реках, при температуре воды 6-11°C. На нерест мигрирует из крупных рек в мелкие, а осенью возвращается обратно. Только белый байкальский хариус не входит на нерест в реки, но весной совершает крупным стаями передвижения вдоль берегов Байкала. Плодовитость составляет от 5 до 40 тысяч икринок. Икра откладывается на галечный или каменистый грунт. Развитие икры длится около 25 дней (Чупров, 2012).

Пищей служат организмы зообентоса: личинки ручейников, веснянок, подёнок, хирономид, их имаго, гаммарусы, черви, моллюски, низшие ракообразные, а в теплое время года разнообразные воздушные насекомые. Некоторые виды хариусов могут поедать других рыб, а особо крупные особи даже мелких грызунов.

Относительное накопление ДГК в мышцах хариуса происходило весной, а также в период развития гонад и нереста. Значительная часть ДГК биомассы рыб сохраняется непосредственно из пищи, однако известно, что сибирский хариус способен в некоторой степени преобразовывать диетическую ЭПК в ДГК для поддержания её оптимального уровня (Сущик и др., 2006).

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Район и объект исследования

Для исследования в 2021 году были предоставлены 15 выловленных экземпляров хариуса байкальского (лат. *Thymallus baicalensis*) из 5 рек (Рисунок 7).

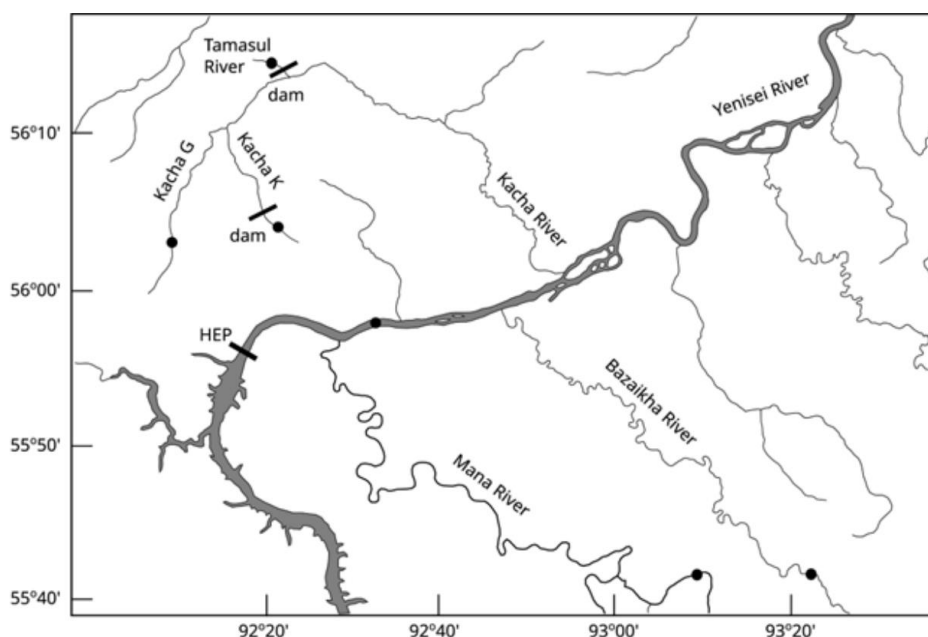


Рисунок 7 – Места вылова *Thymallus baicalensis*

5 экземпляров выловлено из реки Мана (правый приток в среднем течении Енисея), в районе посёлка Нарва (55°22' с.ш. 93°33' в.д.) в июле 2021 г.; 4 из реки Тамасул (левый приток второго порядка в среднем течении Енисея) в

районе посёлка Кедровый (56°14' с.ш. 92°19' в.д.) в июле 2021 г.; 3 из реки Базаиха (правый приток в среднем течении Енисея) в районе посёлка Верхняя Базаиха (55°41' с.ш. 23' в.д.) в июле 2021 г.; 2 из реки Крутая Кача (левый приток второго порядка в среднем течении Енисея) в районе посёлка Каменный Яр (56°06' с.ш. 92°18' в.д. ) в мае 2022 г.; и 4 из реки Гладкая Кача (левый приток второго порядка в среднем течении Енисея) в районе посёлка Кача (56°06' с.ш. 92°10' в.д.) в июле 2021 г. и мае 2022 г. Для биохимических и генетических исследований из каждой рыбы были отобраны пробы 5 органов и тканей: сердце, мозг, печень, мышечная и жировая ткани.

## **2.2. Жирнокислотный анализ**

Была проведена первичная обработка проб 5 органов и тканей (сердце, мозг, печень, мышечная и жировая ткани) рыб. Пробы фиксировали в смеси растворителей хлороформ/этанол (2:1 по объему) и хранили в холодильной камере при температуре -20°C. Перед биохимической обработкой в пробы был добавлен фиксированный объём внутреннего стандарта в виде раствора метилового эфира C19:0 в хлороформе, с определённой концентрацией. Подготовка проб к хроматографическому анализу включала в себя ряд стандартных процедур.

**1. Экстракция и гомогенизация.** Ткани перетирали в фарфоровой ступке в смеси неполярных растворителей до гомогенной массы и пропускали через слой безводного Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (натрий сернокислый) - для удаления воды. Растворители выпаривали на роторном вакуумном испарителе при температуре 37 °C.

**2. Получение метиловых эфиров жирных кислот.** Полученный на первом этапе экстракт липидов подвергался метанолизу. Для этого к сухим липидам добавляли 0.9 мл щелочной смеси (8 г NaOH / 1 л CH<sub>3</sub>OH), и нагревали в

течение 10 минут при 90 °С на песчаной печи. Затем смесь остужали 1-2 минуты и добавляли 1 мл кислотной смеси (10 мл  $\text{CH}_3\text{OH}$  / 0.3 мл  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), и также нагревали течение 10 минут при 90 °С на песчаной печи для получения метиловых эфиров ЖК.

**3. Очистка липидов.** Остывшую смесь заливали 3 мл подсоленной (хлористый натрий) дистиллированной водой и 2 мл гексана. Около 2 минут интенсивно взбалтывали колбу с пробой для экстракции липидов гексаном и оставляли в холодильнике на 20 минут. В этот момент метиловые эфиры ЖК были растворены в более лёгкой неполярной фракции – в гексане, а вода с примесями находилась в нижней части колбы. С помощью делительной воронки неполярная фракция с метиловыми эфирами ЖК была отделена от полярной. Полученные растворы метиловых эфиров ЖК, растворённых в гексане, осушали пропусканием через слой безводного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Гексан выпаривали на роторном вакуумном испарителе при температуре 37 °С.

Анализ метиловых эфиров ЖК проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором (ГЖХ-МС, модель 7000 QQQ, Agilent Technologies, США). Условия анализа следующие: несущий газ - гелий, ввод с делением потока, капиллярная колонка высокой полярности HP-FFAP длиной 30 м и внутренним диаметром 0.25 мм, и фазой полиэтиленгликоля, модифицированного нитротерефталевой кислотой толщиной 0.25  $\mu\text{m}$ . Применяли следующий температурный режим: подъем от 100 до 190 °С со скоростью 3 °С/мин, затем 5 мин изотермально, второй подъем температуры от 190 до 230 °С со скоростью 10 °С/мин и 20 мин изотермально. Температура ввода (инжектора) 250 °С, температура детектора 280 °С; энергия ионизации детектора 70 эВ, сканирование в диапазоне 45-450 атомных единиц.

Идентификацию пиков жирных кислот осуществляли сравнением полученных масс-спектров с масс-спектрами, имеющимися в базах данных

Agilent (Wiley, NIST), а также сравнением времен удерживания с таковыми стандартов (Sigma, США). Относительное содержание ЖК определяли, как отношение площади пика определённой ЖК к сумме площадей всех ЖК. Абсолютное содержание ЖК рассчитывали через площадь пика C19:0, которая соответствовала известному количеству этой ЖК, добавленной перед биохимическими процедурами.

### 2.3. Генетический анализ

Активность генома в различных тканях и клетках разная, поэтому для анализа биосинтетической активности анализируется РНК. Для выделения РНК было отобрано по несколько образцов каждого типа тканей хариуса, которые использовались для биохимического анализа.

Для предотвращения загрязнения образцов РНКазми в процессе выделения РНК из тканей хариуса использовались следующие меры:

- Обработка помещения, рабочих поверхностей и оборудования (раствор RNaseZAP, Sigma);
- Обработка многоразовой посуды (щипцы, скальпель, стеклянная посуда и др.) – прокаливание в сухожаровом шкафу при 200-250°C в течение нескольких часов;
- Использование одноразовых пластиковых пробирок и наконечников с фильтрами, сертифицированных на отсутствие ДНК, РНК, ДНКаз и РНКаз;
- Использование перчаток и халата.

Выделение РНК проводили при помощи набора «**Evrogen ExtractRNA**». Следующее описание технологии выделения расписана в соответствии с используемым набором.

Заготовленные пробы с тканью в пробирках перед извлечением центрифугировали для предотвращения потерь материала при открытии

крышки пробирки. Ткани для анализа (не более 100 мг) извлекались из пробирок, измельчались скальпелем на одноразовых чашках петри и переносились в исследовательские пробирки на 2 мл, куда залили 1 мл реагента ExtractRNA (содержащего фенол гуанидин-тиоционата) для лизиса. Затем в пробирки с образцами добавляли стеклянные бусины диаметром 1 мм для дополнительного перетирания, после чего пробирки выдерживали в гомогенизаторе MiniBeadBeater-1 двукратно при 2500 об/мин в течение 2 мин (время зависит от обрабатываемой ткани и может быть увеличено до полной гомогенизации ткани), пока лизат не станет однородно однородным. После гомогенизации и лизиса пробирки с гомогенатами инкубировали при комнатной температуре (15-25°C) в течение 10-15 минут, чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов. Далее лизат центрифугировали при 12 000 g в течение 10 минут для удаления нерастворимых фрагментов, а супернатант переливали в новую пробирку, куда также добавляли 0.2 мл хлороформа (на каждый 1 мл реагента ExtractRNA) для удаления липидов, после чего перемешивали 15 секунд. Затем эту смесь инкубировали 3-5 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 12 000 g в течение 15 минут при 4°C. В ходе центрифугирования происходит разделение смеси на три фазы: нижнюю – органическую фенол-хлороформную фазу желтоватого оттенка, интерфазу белого цвета и верхнюю бесцветную водную фазу. РНК находится в водной фазе, составляющей 45-50% от общего объема смеси. Держа пробирку наклонно (под углом 45°), аккуратно отбирали водную фазу в новую пробирку, избегая касания интерфазы или органической фазы. При выделении РНК из небольшого количества образца (менее 10<sup>6</sup> клеток или 10 мг ткани) в водную фазу рекомендуется добавить 5-10 мкг соосадителя нуклеиновых кислот Satellite Red. В водную фазу добавляли 0.5 мл 100% изопропанола (на каждый 1 мл реагента, использованного для гомогенизации). Инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 10 минут, дальше центрифугировали при 12 000 g в течение 10 минут при

комнатной температуре. Получившийся супернатант убирают, оставив осадок РНК на дне пробирки, куда добавляют 1 мл 75% этанола (2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола, использованного в прошлом шаге). 75% спирт добавлялся с большим количеством воды, чтобы соли, оставшиеся после лизиса, растворились в воде и не ингибировали ферментативные процессы. Образцы центрифугировали на максимальной скорости в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего насосом выкачивали весь этанол. Затем добавляли 50 мкл воды, свободной от РНКаз, и встряхивали раствор на вортексе до полного растворения. Для улучшения растворения образец рекомендуется прогреть при 55-60°C в течение 3-5 минут.

### **Спектрофотометрия**

Оценку количества выделенной РНК проводили методом спектрофотометрии при помощи спектрофотометра NanoDrop Lite. Спектрофотометрия – физико-химический метод исследования растворов, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200 - 400 нм), видимой (400 - 760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. По разнице между поглощением света чистым растворителем и анализируемого смеси (растворитель + РНК) можно рассчитать концентрацию вещества. По тем или иным причинам выделить чистую РНК без примесей не получается. Для оценки чистоты генетического материала рассчитывается отношение поглощения света на длине волны 260 нм, вносимого нуклеотидами РНК и ДНК, к поглощению белковых загрязнителей, измеряемому на 280 нм. Примерное соотношение  $A_{260}/A_{280}$  для чистого раствора РНК составляет 1.7 – 2.0; для ДНК - >2.

### **Электрофорез**

Электрофорез РНК в агарозном геле – аналитический метод разделения фрагментов РНК, основанный на разной скорости движения фрагментов

разной длины при движении в геле под действием внешнего электрического поля. При помощи электрофореза в агарозном геле были визуализированы выделенные препараты РНК. Также по интенсивности свечения можно узнать о примерной концентрации РНК. Электрофорез тотальной РНК проводили в неденатурирующем 1% геле агарозы (буфер трис-ацетат-ЭДТА), при 100 В, 500 мА, в течение 40 минут. На 40 мл агарозы добавляли 1.5 мкл бромистого этидия (интеркалирующего красителя) для связи с РНК. Перед внесением в лунки геля препараты РНК и маркер смешивали с прилагаемым буферным раствором для их оседания на дне лунок геля и денатурировали РНК прогреванием при 90°C с формамидом в течение 2 мин для предотвращения образования шпилек. Просматривали результат электрофореза (разделённые полосы интеркалирующего красителя) на трансиллюминаторе под ультрафиолетом (254 нм).

### **Обратная транскрипция**

Обратная транскрипция — это процесс образования двуцепочечной ДНК на основании информации в одноцепочечной РНК. Для проведения обратной транскрипции РНК был использован набор реактивов 5X RT MasMix-30100 (DIALAT Ltd., Россия). Набор содержит рекомбинантную обратную транскриптазу MMuLVH, (фермент не содержит нативной РНК-азной активности) и RNAsine нативный белок, обладающий высокой специфической активностью ингибирования различных типов рибонуклеаз (РНКазы А, В, С).

Для синтеза комплементарной ДНК использовали 1 мкг тотальной РНК. Объемы вносимой РНК подбирали на основе полученных результатов спектрофотометрии. Все манипуляции проводили на льду, тщательно перемешивая добавляемые компоненты.



Для синтеза первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) были использованы праймеры Oligo(dT)16 и Random(dN)10, в концентрациях 2.5 мкМ и 5 мкМ соответственно. Обратная транскрипция была проведена согласно рекомендациям производителя (Таблица 1).

Таблица 1 - Протокол проведения обратной транскрипции.

Проведение обратной транскрипции			
Обратная транскрипция	25°C	10 мин	1X цикл
	42°C	30 мин	
Инактивирование ревертазы	85°C	5 мин	
Хранение	4°C		

Согласно рекомендациям производителя, для последующего анализа использовали не более 2 мкл полученного раствора кДНК на реакцию амплификации (в объеме 25мкл).

### **Выбор референсного гена**

Для анализа относительной экспрессии необходимо было подобрать референсный ген, уровень экспрессии которого постоянен во всех исследуемых тканях. В качестве такого гена обычно использую гены

«домашнего хозяйства»<sup>2</sup>, по типу гена цитохрома Б, участвующий в клеточном дыхании (Monroig и др., 2011).

Были проведены ПЦР в режиме реального времени со всеми образцами кДНК и с праймерами референсного гена.

### **ПЦР в режиме реального времени**

Для проведения ПЦР в режиме реального времени образцы кДНК были разведены в 5 раз.

Для проведения ПЦР был использован набор реактивов 2.5 Mas<sup>2g</sup>MIX – 2025 (DIALAT Ltd., Россия). Набор предназначен для проведения «real-time» амплификации ДНК, выделенной из различных природных источников. Набор реагентов содержит интеркалирующий флуоресцентный краситель Eva Green (не ингибирующий полимеразу), стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

Основой набора является термостабильная «hot-start» полимераза SmarTaq, позволяющая амплифицировать низкокопийные ДНК матрицы, сложные последовательности ДНК. В состав набора включены SmarTaq полимераза; дезоксинуклеотид трифосфаты dA, dT, dC, dG – 200 мкМ каждого; реакционный буфер; 2 мМ MgCl<sub>2</sub>; стабилизатор/энхансер; краситель Z – Green-1X; стерильная вода для ПЦР. Конечная концентрация каждого из праймеров составляла 0.5 мкМ. В реакционные смеси с праймерами, специфичными к референсным генам (сytB) вносили 1 мкл подготовленных образцов кДНК. В каждом эксперименте ставили отрицательный контроль, не содержащий кДНК. Температурные условия ПЦР представлены в таблице 2.

---

<sup>2</sup> Гены «домашнего хозяйства» - гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне.

Таблица 2 - Температурные условия ПЦР.

Этап амплификации	Температура	Время	Количество циклов
Начальная денатурация	94°C	2 мин	1
Денатурация	94°C	15 сек	40
Отжиг праймеров	55°C	20 сек	
Элонгация	72°C	20 сек	

ПЦР проводили в приборе MicPCR (Magnetic Induction Cycler PCR) BMS (Bio Molecular System, Australia) в объеме 10 мкл. Параллельно проводилась амплификация референсного гена во всех анализируемых образцах для последующего анализа относительной экспрессии.

### **Относительный количественный анализ**

Относительный количественный анализ позволяет анализировать различия в экспрессии генов между исследуемой группой и контрольной группой. Для выполнения количественного анализа проводили параллельные запуски референсного гена и исследуемого гена для нормализации изменений. Согласно рекомендациям производителя, для обеспечения достоверности нормализации требуются один и более эталонных гена.

Программное обеспечение MicPCR (Magnetic Induction Cycler PCR) BMS предлагает метод  $\Delta\Delta C_t$  (Livak and Schmittgen, 2001) для анализа полученных данных. Программное обеспечение позволяет использовать эффективность амплификации отдельных генов при вычислении значений относительной экспрессии.  $\Delta\Delta C_t$  –режим нормализованной экспрессии.

Метод  $\Delta\Delta C_t$  использует параметрический метод для статистической проверки. Применяется двусторонний t-критерий Стьюдента, в котором предполагается, что данные распределены нормально. Формула, представленная ниже, используется для вычисления относительного значения выражения между двумя группами:

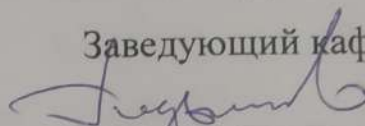
Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт

Кафедра водных и наземных экосистем  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



Подпись \_\_\_\_\_ инициалы, фамилия

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Оценка синтеза физиологически ценных жирных кислот в нескольких тканях хариуса (род *Thymallus*) на основе биохимического и генетического анализов

тема

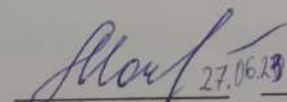
06.04.01 – «Биология»

код и наименование направления

06.04.01.04 – «Гидробиология и ихтиология»

код и наименование магистерской программы

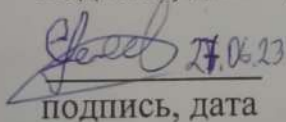
Руководитель



подпись, дата \_\_\_\_\_ проф, д.б.н.

О. Н. Кормилец  
инициалы, фамилия

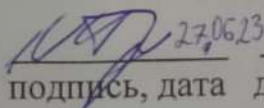
Выпускник



подпись, дата \_\_\_\_\_

Ш. А. Султонов  
инициалы, фамилия

Рецензент



подпись, дата \_\_\_\_\_ с.н.с., к.б.н.

М. Ю. Трусова  
инициалы, фамилия

Красноярск 2023