РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА Том 106, № 5, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

От редактора специального выпуска К 120-летию со дня рождения Евгения Михайловича Крепса (1899-1985) Р. Г. Парнова 535 Обзорные и проблемные статьи по липидологии Lipid Rafts and Amyloid Metabolism: Role in Pathogenesis of Alzheimer's Disease N. N. Nalivaeva and A. J. Turner 539 Ганглиозиды мозга и их функции как природных адаптогенов Н. Ф. Аврова 563 GPR40/FFA1-рецепторы свободных жирных кислот и их функциональная роль Р. Г. Парнова 584 Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты в физиологии и метаболизме рыб и человека: значение, потребности, источники О. Н. Махутова, М. И. Гладышев 601 Экспериментальные статьи по липидологии Влияние фотопериода на липидный спектр молоди атлантического лосося Salmo salar L. Н. Н. Немова, З. А. Нефедова, С. Н. Пеккоева, В. П. Воронин, Т. Р. Руоколайнен, С. А. Мурзина 622 Сравнительная характеристика липидного состава и морфофункциональных показателей ядерных и безъядерных эритроцитов в условиях гипоксии

В. В. Ревин, Н. В. Громова, Э. С. Ревина, И. П. Грунюшкин, Т. П. Кузьменко, Т. О. Ошкина, С. С. Бочкарева

631

Экспериментальные статьи

Двигательная активность и уровни экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43	
у крыс со спонтанной гипертензией	654
А. С. Альдекеева, С. Я. Резник, Ю. С. Крайнова, Н. З. Клюева	

CONTENTS

Editorials

To 120 Years Since Evgeny Mikhailovich Kreps's Birth (1899–1985) R. G. Parnova	535
Lipidology: Reviews and Topical Articles	
Lipid Rafts and Amyloid Metabolism: Role in Pathogenesis of Alzheimer's Disease N. N. Nalivaeva and A. J. Turner	539
Brain Gangliosides and Their Function as Natural Adaptogens N. F. Avrova	563
Free Fatty Acid Receptor GPR40/FFA1 and Its Functional Role <i>R. G. Parnova</i>	584
Essential PUFA in Physiology and Metabolism of Fish and Human: Functions, Needs, Sources O. N. Makhutova and M. I. Gladyshev	601
Lipidology: Experimental Articles	
Effect of the Photoperiod on Lipid Spectrum of Young Atlantic Salmon Salmo salar L. N. N. Nemova, Z. A. Nefedova, S. N. Pekkoeva, V. P. Voronin, T. R. Ruokolainen, and S. A. Murzina	622
Comparative Characteristics of the Lipid Composition and Morphofunctional Indicators of Nuclear and Non-Nuclear Erythrocytes under Conditions of Hypoxia V. V. Revin, N. V. Gromova, E. S. Revina, I. P. Grunyushkin, T. P. Kuzmenko, T. O. Oshkina, and S. S. Bochkareva	631
Experimental Articles	
Locomotor Activity and Expression Levels of mRNA of NAP-22 and GAP-43 Proteins in Rats With Spontaneous Hypertension	(51
A. S. Alaekeeva, S. Ia. Keznik, IU. S. Kraynova, and N. Z. Klyueva	654

-

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 5, с. 535-538

ОТ РЕДАКТОРА СПЕЦИАЛЬНОГО ВЫПУСКА

К 120-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЕВГЕНИЯ МИХАЙЛОВИЧА КРЕПСА (1899–1985)

DOI: 10.31857/S0869813920050076

1 мая 2019 г. исполнилось 120 лет со дня рождения Евгения Михайловича Крепса, академика, выдающегося и яркого ученого, одного из основоположников сравнительной и эволюционной физиологии и биохимии, подводной физиологии и медицины, ученика Ивана Петровича Павлова и ближайшего соратника и ученика Леона Абгаровича Орбели. С 1960 по 1975 годы Е.М. Крепс был директором Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова АН СССР, с 1967 по 1975 годы возглавлял Отделение физиологии Академии наук СССР, на протяжении многих лет был членом Президиума АН СССР. Его научный авторитет был огромен, а заслуги в развитии советской науки были отмечены присуждением ему высших наград СССР – звания Героя Социалистического труда, трех ор-



Рис. 1. Евгений Михайлович Крепс у памятника Л.А. Орбели перед зданием Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Ленинград, 1985 г.

денов Ленина, ордена Трудового Красного Знамени. Он был удостоен премии Л.А. Орбели, золотой медали им. И.П. Павлова, Государственной премии СССР за научные исследования. По инициативе Е.М. Крепса с 1965 г. стал выходить "Журнал эволюционной биохимии и физиологии", который до сих пор является одним ведущих научных периодических изданий в области сравнительной и эволюционной физиологии. Е.М. Крепс входил в состав редколлегий двух международных научных журналов – "Journal of Neurochemistry" и "Comparative Biochemistry and Physiology".

Прошло много лет с момента ухода из жизни этого замечательного человека, но до сих пор не потеряли актуальность результаты его исследований, а его яркая жизнь, которая прошла в эпоху драматических событий истории нашей страны 20 века, до сих пор привлекает внимание многочисленных биографов. С его научной судьбой неразрывно связаны основные вехи истории отечественной физиологии – эпоха И.П. Павлова, Военно-медицинская академия, Мурманская морская биологическая станция, экспедиция подводных работ особого назначения (ЭПРОН), Институт экспериментальной медицины, Институт физиологии им. И.П. Павлова, XV Физиологический конгресс, Объединенная сессия двух Академий, гонения на Л.А. Орбели и его школу, последующая реабилитация и преобразование лаборатории эволюционной физиологии, руководимой Л.А.Орбели, в Институт эволюционной физиологии им. И.М. Сеченова. Всю свою необыкновенную энергию, широту интересов, научную интуицию, силу характера, страстность натуры, сочетающуюся с прекрасными человеческими качествами Евгений Михайлович Крепс вложил в развитие этого Института, которое проходило уже без Учителя. На посту директора Евгению Михайловичу за 15 лет удалось создать первоклассное научное учреждение, оснащенное современной техникой и оборудованием, привлечь лучшие научные силы страны, значительно увеличить штат научных работников, создать в коллективе необыкновенно творческую и доброжелательную атмосферу, плоды которой ощущаются по сей день.

О Евгении Михайловиче написано много – работы в строго научном стиле, такие как большой биографический очерк Ю.В. Наточина, предваряющий издание избранных трудов Е.М. Крепса [1], статья Ю.В. Наточина и Е.В. Розенгарта, посвященная 100-летию со дня рождения Е.М. Крепса [2], статья Н.Ф. Авровой в книге, посвященной 60-летию Института эволюционной физиологии и биохимии [3]. В более свободном жанре – статья А.Н. Островского в журнале "Природа" [4]. Опубликованы очень теплые и интересные воспоминания В.В. Меншуткина и Л.Н. Абрамовой о Е.М. Крепсе [5, 6]. В 2019 г. в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова начал работу открытый научный семинар, посвященный Е.М. Крепсу. В мае 2019 г. прошло заседание семинара, приуроченное к 120-летию со дня рождения Е.М. Крепса, на котором Р.Г. Парновой был представлен доклад "Мы с тобой одной крови...", посвященный братьям Крепсам – Евгению и Герману (Герман Крепс был известным геоботаником, этнографом и зоологом, основателем Лапландского заповедника), а также со своими воспоминаниями "Уроки Крепса" выступал В.И. Говардовский. Записи этих докладов можно найти на сайте ИЭФБ (https://www.iephb.ru/populyarno-o-nashey-nauke/otkryityiy-seminar-posvyashhennyiypamyati-akademika-e-m-krepsa/). Планируется к опубликованию книга Е.Т. Захаровой, сотрудницы Института экспериментальной медицины, в которой впервые будут представлены материалы из архивов ФСБ, посвященные аресту Е.М. Крепса в 1937 г. по обвинению в участии в троцкистко-зиновьевской организации, а также обнаруженные в его деле письма Л.А. Орбели Берии, Вышинскому, Молотову в защиту Е.М. Крепса, в результате которых он был освобожден в 1940 г. из лагеря на Колыме и через какое-то время смог вернуться к работе. Да и сам Евгений Михайлович успел написать подробные воспоминания о своей жизни в книге "О прожитом и пережитом" [7], передать свои впечатления о многочисленных морских путешествиях на научно-исследовательском судне "Витязь" [8, 9].

Последние 25 лет жизни Евгений Михайлович посвятил исследованиям липидов мозга, результатом которых явилась изданная в 1981 г. монография "Липиды клеточных мембран" с подзаголовком "Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов" [10]. Свойственный Евгению Михайловичу дар научного предвидения в высшей степени успешно предопределил выбор научного пути. По прошествии многих лет стало совершенно очевидно, что липидный состав мембран играет критичную роль в реализации любых мембранно-связанных клеточных процессов, а разнообразие липидов и их жирных кислот связано с тонкими механизмами участия липидов в огромном многообразии регуляторных процессов, обеспечивающих жизнь клетки. В возглавляемой Е.М. Крепсом лаборатории сравнительной нейрохимии проводились исследования состава липидов в нервной системе животных различного уровня организации – от примитивных беспозвоночных до человека. Исследовались основные липиды нервной ткани – фосфолипиды, цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды и состав их жирных кислот, изучались разные отделы мозга, субклеточные фракции, различные этапы эмбрионального развития. Было установлено удивительное сходство как в качественном, так и в количественном соотношении состава фосфолипидов у представителей чрезвычайно далеких таксонов и выявлены липиды, такие как ганглиозиды, сфингомиелин, цереброзиды, содержание которых в мозгу резко возрастает в эволюции по мере дифференцировки и усложнения организации центральной нервной системы. Сотрудниками лаборатории был собран и проанализирован огромный материал по составу липидов и их жирных кислот у представителей более чем 130 видов рыб, обитающих при различных температурах и давлении, что позволило сформулировать представления об адаптивных функциях липидов и их роли в механизмах приспособления организмов к условиям внешней среды.

За последние 30—40 лет наука липидология прошла беспрецедентный путь своего развития. Первоначальные представления о липидах как пассивных структурных компонентах биологических мембран реформировались в огромную науку о регуляторной роли фосфолипидов, жирных кислот и их многочисленных производных в обеспечении важнейших физиологических процессов, сигнальной роли фосфоинозитидов, эндоканнабиноидов, сфингозин-содержащих липидов в опосредовании действия гормонов и других биологически активных веществ, существовании липид-регулируемых рецепторов. Огромный объем накопленных данных свидетельствует о том, что практически любой патологический процесс, протекающий в клетке или в целом организме, связан с изменением метаболизма отдельных классов липидов. В соответствии с этим стремительными темпами развивается наука о связи состава потребляемых липидов со здоровьем человека.

К 120-летию со дня рождения Евгения Михайловича Крепса, одного из основоположников эволюционной и сравнительной нейрохимии, редакцией Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова было принято решение о специальном выпуске журнала, посвященном различным разделам современной липидологии. В этот выпуск вошли обзорные и экспериментальные статьи, авторами которых являются как ученики Е.М. Крепса (Н.Ф. Аврова, Н.Н. Наливаева, Р.Г. Парнова), так и сотрудники различных российских научных коллективов, занимающиеся исследованиями липидов.

ПАРНОВА

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Наточин Ю.В. Слово о выдающемся физиологе и биохимике Евгении Михайловиче Крепсе. В кн.: "Я прожил интересную жизнь" (Избранные труды Е.М. Крепса). Санкт-Петербург. Наука. 5–19. 2007.
- 2. Наточин Ю.В., Розенгарт Е.В. Фундамент фундаментальности. (К 100-летию со дня рождения академика Е.М. Крепса). Вестн. РАН. 69. 337–343. 1999.
- Аврова Н.Ф. Евгений Михайлович Крепс. В кн.: "Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук. Страницы истории". Изд-во Политехнического университета. Санкт-Петербург. 414–426. 2016.
- 4. Островский А.Н. "Непотопляемый: жизнь Евгения Михайловича Крепса". Природа. 59-68. 2009.
- Меншуткин В.В. Евгений Михайлович Крепс человек и эволюционист. В кн.: "Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук. Страницы истории". Изд-во Политехнического университета. Санкт-Петербург. 637–648. 2016.
- Абрамова Л.Н. Я помню... В кн.: "Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук. Страницы истории". Изд-во Политехнического университета. Санкт-Петербург. 629–636. 2016.
- 7. Крепс Е.М. О прожитом и пережитом. Москва. Наука. 1989.
- 8. Крепс Е.М. На "Витязе" к островам Тихого океана. Москва. Географгиз. 1959.
- 9. Крепс Е.М. Последняя экспедиция "Витязя". Москва. Мысль. 1983.
- 10. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Ленинград. Наука. 1981.

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 5, с. 539-562

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ ПО ЛИПИДОЛОГИИ

LIPID RAFTS AND AMYLOID METABOLISM: ROLE IN PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

© 2020 N. N. Nalivaeva^{1, 2, *} and A. J. Turner²

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia ²School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, UK *E-mail: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk

> Received March 11, 2020 Revised March 15, 2020 Accepted March 17, 2020

Brain lipids play an important role not only as ubiquitous structural membrane components providing the scaffolding and compartmentalisation outside and within the cells but also participating in various signalling processes either by facilitating them or by acting as signal molecules. Membrane lipids form highly specialised domains, called lipid rafts, which are more ordered structures than the rest of the membrane and are enriched in cholesterol and sphingolipids. These domains provide a platform for specific and targeted protein-lipid and protein-protein interactions and as such facilitate binding and/or enzymatic processes on the surface and within the membranes. These lipid-protein interactions are important for various signalling events and proper cell functioning. When normal structure and functions of lipid rafts is disturbed due to the changes in lipid metabolism, caused by various internal and environmental factors, it results in a cascade of pathological events. Among proteins whose metabolic pathways depend on the lipid raft structure and integrity is amyloid precursor protein (APP) - the protein highly implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Proteolytic processing of APP by a aspartic proteinase called β -secretase (BACE1) and a multiprotein complex called γ -secretase results in production of the amyloid β peptide (A β) - one of the key molecules leading to development of AD. These events take place in the lipid rafts. Some lipid components of the rafts, including ganglioside GM1, facilitate A β aggregation and formation of its toxic oligomers. Understanding the mechanisms regulating lipid-protein interactions in the rafts might result in new therapeutic strategies and treatments. In this review we discuss the implications of lipids in APP processing and A β metabolism and possible therapeutic avenues derived from studying lipid raft structure and functions in normal and AD brain.

Keywords : Alzheimer's disease, amyloid β peptide (A β), amyloid precursor protein (APP), APP intracellular domain (AICD), BACE1, cholesterol, gangliosides, sphingolipids **DOI**: 10.31857/S0869813920050052

The amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease (AD) [1] has, since its formulation, shaped the course of research into the molecular mechanisms of the disease during almost three decades accumulating a substantial amount of data which, unfortunately, has failed to result in the design of any effective treatment. Although the hypothesis has proven itself correct based on the genetic early-onset forms of the disease [2], the late-onset forms of AD appears to be multifaceted and more difficult to tackle [3].

From the clinical point of view, the disease is characterised by global cognitive decline, associated with brain pathology involving accumulation of extracellular amyloid aggregates

(also known as senile plaques) of amyloid β peptide (A β) and intracellular neurofibrillary tangles of hyper-phosphorylated tau protein (for review see [4]). According to the amyloid cascade hypothesis, it is the A β which is principally responsible for many of the pathological features of the disease [1, 5] with A β oligomers representing the most toxic species [6, 7]. Accumulation of amyloid plaques is accompanied by astrogliosis and microgliosis [8, 9] and the most affected brain areas are the neocortex and hippocampus [10]. Although there are strong genetic links, including amyloid precursor protein (APP) and presenilin mutations in familiar early-onset form on AD [11], the majority of AD cases are sporadic, lateonset forms [12]. From this point of view the predominance of AD research based on the mechanisms of early-onset disease versus the broader spectrum of the factors leading to the sporadic form might be one of the reasons for the failure of the majority of therapeutic trials and lack of any preventive measures 20 years since the amyloid hypothesis has been proposed.

One of the important cellular events underlying production of the A β peptide is proteolytic processing of APP initiated by its cleavage by β -secretase (BACE1) (for the most recent review see [13]) with the subsequent cleavage of the formed membrane-bound C-terminal APP fragment by a protein complex called γ -secretase [14]. This process, called the amyloidogenic APP pathway, is believed to take place in a specific membrane compartment – the lipid rafts [15, 16]. Only about 10% of all APP is cleaved by this pathway and the major part of APP molecules is processed in the non-raft compartments of cellular membranes starting with APP cleavage by a proteinase from the ADAM family called α -secretase [17]. To understand how APP is targeted to the lipid rafts for its amyloidogenic processing and how lipid composition of the rafts can affect A β production is very important for understanding not only the physiological significance of the whole cellular machinery of amyloidogenic APP processing in neuronal cells but also how and why it leads to pathogenic events underlying development of AD.

This review is mainly focused on the links between lipid rafts and AD pathology not only because AD-related amyloid precursor protein and production of A β peptide depends on the lipid rafts but also because A β signalling itself involves interactions of proteins resident to lipid rafts. Since we published an extensive review on this topic in 2012 [18] there have been important developments in this area of research which we shall cover in this paper. One of the aspects of the studies is related to modulation of lipid rafts with the aim to halt amyloidogenic processing of APP and A β production which still failed to translate into any successful drug [19]. While statin treatment is still considered beneficial [20], there are some meta-analysis studies raising concerns on their effectiveness [21]. In assessing the literature data it is important to bear in mind that the pathology and aetiology of AD is complex and the involvement of lipids in its pathogenesis has to be analysed in a more generic way, taking into account various aspects of lipid metabolism and its changes with ageing and under pathological conditions predisposing to AD.

LIPID RAFT COMPOSITION AND PROPERTIES

With more than 20 years since the concept of the proteolytic shedding of integral membrane proteins such as APP [22] and the establishment of the "lipid raft" concept by Simons and Ikonen [23], research of these membrane-clustering compartments has attracted significant amount of efforts as extensively reviewed in [18, 24–26]. Despite the initial controversy regarding lipid raft size and precise protein and lipid composition due to the methodologies used for their isolation and analysis, it is now clear that cholesterol, sphingolipids and glycolipids represent the central components defining the structural and functional properties of the lipid rafts [25]. The lipid raft model postulates that lipids and proteins in the cellular membranes are segregated in different phases: liquid ordered (Lo) and disordered (Ld) phases. While cholesterol and sphingolipids are promoting Lo, non-saturated phospholipids maintain the Ld phases. This allows certain proteins to cluster together in the Lo phase to fulfil their functions [27].

Caveolae were the first described type of organised cholesterol-enriched microdomains which contained oligomerized caveolin protein whose composition was determined in the early 1990's [28]. However, apart from cholesterol being the major determinant of the caveolae integrity, the role of other lipids in these domains is still unknown. While the concept of lipids rafts has been developed from lipid-enriched microdomains [29] and detergentresistant membranes (DRMs) [30] to the currently established cholesterol-sphingomyelin rafts with the Lo phase and the Ld non-raft regions of cellular membranes, a third type of microdomains termed ceramide-rich platforms (CRPs) with a gel-like structure has also been identified [31]. It is also important to mention other cholesterol and ganglioside enriched membrane domains, which share some similarity but are physically and functionally distinct from the lipid rafts, the tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). They represent functional platforms for the regulation of key cellular processes such as release of surface protein ectodomains ("shedding") or regulated intramembrane proteolysis ("RIPping") [32] and are involved in a whole range of cellular processes, from cell division and motility to gene regulation and signalling pathways [33], as well as dendritic spine maturation [34].

In relation to AD, another intracellular lipid raft-like structure involved in cholesterol and phospholipid lipid metabolism, calcium homeostasis and mitochondrial function, so-called mitochondria-associated ER membranes (MAM), are of particular significance [35]. They contain PS1 and PS2 with γ -secretase activity and process APP generating A β [36]. MAM and their communication with the mitochondria are important for phospholipid metabolism and transport which are altered in AD [37].

One of the important roles of lipid rafts is synaptic vesicle release [38] although more recently they have been shown to participate in intracellular lipid and protein trafficking from the endoplasmic reticulum, Golgi bodies and endosomes to the plasma membrane and production of extracellular vesicles (EVs) [39]. These nanovesicles (30–150 nm) contain proteins, RNAs and lipids, and their internalization by neighbouring cells can change their normal functions [40]. Lipid rafts may also represent the platforms for inclusion/exclusion of membrane lipids and proteins into microvesicles (MVs) which could originate from distinct domains during physiological processes and disease evolution [41].

Among the best characterised raft proteins are lipid-modified proteins, such as GPI-anchored proteins [42, 43], doubly acylated proteins, such as Src family kinases and the α subunits of heterotrimeric G proteins [44]. The 31 kDa integral membrane protein stomatin and GPI-anchored proteins were shown to be linked through lipid rafts and undergo the same cell-sorting events [45]. Another lipid raft marker, flotillin, can function as a molecular link between lipid rafts and a multimeric signaling complex at the actin cytoskeleton [46]. The flotillins are palmitoylated and myristoylated proteins, anchored to the plasma membrane [47]. They belong to a larger class of integral membrane proteins that have an evolutionarily conserved domain called the prohibitin homology domain (PHB) which determines the affinity of proteins to the lipid rafts [48].

Many other physiologically important proteins have been investigated for their possible raft localisations, including key proteins involved in AD pathogenesis, such as APP [49] and its processing enzymes: β -site APP cleaving enzyme (BACE1) [15, 50], the γ -secretase complex [51, 52] and ADAM10 – a disentegrin and metalloprotease possessing α -secretase activity [53]. Another member of the ADAMs family – the tumor necrosis factor-alpha (TNF) converting enzyme (TACE, ADAM17) responsible for the cleavage of several biologically active transmembrane proteins, including α -secretase cleavage of APP, was also shown to be targeted to lipid rafts [54]. The prion protein (PrP^c) conversion to its infectious form (PrP^{Sc}) takes place in the lipid rafts [55].

Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptors [56] and functioning of α 7 nicotinic acetylcholine receptor depends on the lipid composition of the plasma membrane [57]. Moreover, it was shown that soluble form of A β peptide potentiates the activity of the presynaptic α 7 nicotinic acetylcholine receptor and this event depends on the lipid raft integrity [58]. It has also been demonstrated that acetylcholinesterase (AChE) is targeted to lipid rafts [59] and in neurones this involved the proline rich membrane anchor (PRiMA) [60].

Lipid rafts play a critical role in viral infections facilitating virus entry, replication, assembly and budding [61]. Raft components are involved in cholera toxin entry via GM1 ganglioside [62]. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry into the cells also requires GM1 and gp120 protein localised in the lipid rafts [63]. The entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) to the cells via its receptor angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) also depends on the integrity of lipid rafts in the infected cell membrane and is disrupted by methyl- β -cyclodextrin [64]. It is likely that the newly described coronavirus (SARS-CoV-2) causing the serious epidemic COVID-19, which also uses ACE2 as its receptor, also requires lipid rafts for cell entry [65].

The mature form of the major $A\beta$ -degrading enzyme, neprilysin (NEP) was also found to be localised in lipid rafts [66, 67]. Although the list of lipid raft-associated proteins is fast growing, it is still far from being completed, and future research will undoubtedly reveal new members of this family.

In general, lipid rafts represent signalling platforms that bring together various components of the biological membranes determining cell specificity and functions. They include receptors, channels, recognition molecules, coupling factors and enzymes, facilitating their interaction and supporting cell signalling. Lipid rafts have been implicated in a variety of physiological and pathological processes. Among the beneficial processes in the nervous system it is important to name axonal growth and branching [68], which underlie neuronal plasticity. As demonstrated in cell models, raft disruption impedes axonogenesis [69]. Lipid rafts are also involved in the stabilisation and normal functioning of synapses [70]. Disruption of these important processes are observed in AD pathogenesis and normalization of brain lipid homeostasis with formation of functional lipid raft domains might represent a therapeutic avenue in AD prevention.

AMYLOID PRECURSOR PROTEIN PROCESSING

APP is a type I integral membrane protein which exists in three isoforms (APP₆₉₅, APP₇₅₁ and APP₇₇₀), generated from differential splicing of exons 7 and 8 of the *APP* gene (for review see [71]). Exon 7 is homologous to the Kunitz type protease inhibitors (KPI domain) [72], while exon 8 is related to the thymocyte MRC OX-2 antigen [73]. APP₆₉₅ lacks both KPI and OX-2 domains, while APP₇₅₁ only lacks the OX-2 domain. In terms of distribution, APP mRNA is expressed in almost every tissue, where only the isoform ratio different. The ratio of different APP isoform mRNAs in human cortex is approx APP770/APP751/APP695 = 1 : 10 : 20, although there are regional differences [74] which alter in the AD brains [75, 76]. In the neurones the APP₆₉₅ isoform predominates [77].

The amyloidogenic APP processing (Fig. 1) which results in production of A β peptides of different length involves sequential cleavage of APP by β - and γ -secretases (for review see [78]). APP cleavage by β -secretase at two alternative sites (at Asp1 or at Glu11 of the A β sequence) leads to formation of either a 99 amino acid C-terminal fragment (CTF, C99) or a 89 amino acid CTF (C89) which can further be processed by γ -secretase. It also releases a large soluble ectodomain, sAPP β , which possesses important physiological properties [79]. The predominant, non-amyloidogenic, pathway regulated by α -secretase cleavage within the A β domain of the APP molecule prevents formation of A β but produces the large, soluble ectodomain sAPP α possessing neuroprotective properties [79, 80] and



Fig. 1. Schematic representation of APP processing in the cell membrane and lipid rafts.

The proteolytic processing of APP occurs in two distinct membrane domains. The non-amyloidogenic pathway initiated by α -secretase within the A β sequence of APP takes place in the phospholipid domain (light blue) while the amyloidogenic pathway (the A β region in APP is shown in maroon) takes place in lipid rafts which are enriched in glycosphingolipids, sphingomyelin (red) and cholesterol (black). The lipid raft is shown as part of the plasma membrane. While α -secretase is not raft-associated, the β - and γ - secretases predominate in rafts. The cell surface is shown for clarity, although β -cleavage predominantly occurs in endosomes. In the amyloidogenic pathway cleavage of APP by β -secretase releases a soluble neuroprotective ectodomain (sAPP β) and the C-terminal fragment CTF99. This, in turn, is cleaved by the γ -secretase complex, generating the transcriptional regulator APP intracellular domain (AICD), and the A β peptide. In the non-amyloidogenic pathway α -secretase cleavage produces a soluble ectodomain sAPP α and the C-terminal fragment CTF83. Proteolytic cleavage of CTF83 by γ -secretase releases AICD and the p3 fragment whose functions are still unknown. The AICD fragment produced in the amyloidogenic pathway can act as a transcription factor regulating expression of a variety of genes, including the A β -degrading enzyme neprilysin (NEP) and a transport protein, transthyretin (TTR), which are involved in A β clearance and are neuroprotective. AICD produced in the non-amyloidogenic pathways is likely to be enzymatically cleared in the cytoplasm.

a 83 amino acid CTF (C83) which in turn undergoes proteolytic cleavage within the plasma membrane by the γ -secretase complex. Cleavage of CTFs by γ -secretase releases the APP C-terminal domain, AICD, and either A β (in the amyloidogenic pathway) or a shorter 3 kDa p3 fragment (in the non-amyloidogenic pathway). These p3 peptides are nonamyloidogenic but were found within diffuse plaques in AD brains [81]. Whether p3 has any functional role is still unclear. However, it was demonstrated that γ -secretase produces A β at a higher ratio than p3 peptides suggesting that β -CTFs and α -CTFs are differentially processed by γ -secretase [82]. APP can also undergo ε -cleavage producing a large N-terminal fragment which behaves as a type I protein and undergoes α -, β - and γ -secretase cleavages and forms the APP intracellular domain C50 [83]. This ε -cleavage resembles the S3 Notch cleavage generating Notch intracellular domain NICD which has important gene regulatory functions [84]. Lipid raft composition plays an important role in regulating APP processing by all secretases, including the ε -cleavage [85].

APP LOCALISATION IN THE RAFTS

The data suggesting that APP processing is linked to the lipid rafts have been available for many years and were previously reviewed [86, 87]. Although APP itself is not generally a raft protein, a small proportion can be detected in lipid rafts [49]. Regulation of APP raft localisation has been suggested to involve an interaction between the C-terminus of APP and flotillin-1 [88] and flotillin-2 [47] although APP can also directly bind cholesterol in the rafts [89]. It has even been proposed that one of the physiological functions of APP and A β is to control cholesterol transport [90]. There are data suggesting that the adaptor protein Disabled1 (Dab1) regulates APP processing together with the glycoprotein reelin which promotes interaction of APP and Dab1 in lipid rafts and that this process involves phosphorylation by Fyn kinase [91]. On the contrary, binding of the F-box and leucine rich repeat protein2 (FBL2) – a component of the E3 ubiquitin ligase complex which regulates APP metabolism through APP ubiquitination, specifically to the C-terminal fragment of APP, decreased APP protein localization in lipid rafts [92].

APP trafficking to the lipid rafts can also be regulated by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) which promotes the BACE1-APP interaction [93]. Another member of the low-density lipoprotein receptor family (LDL-R), namely ApoR2, stimulates A β production by shifting the proportion of APP from the non-rafts to the raft membrane domains, promoting its amyloidogenic processing [94]. It was also reported that 8–10% of APP can be palmitoylated at Cys186 and Cys187 in the E1-ectodomain which increases its preference for β -cleavage in lipid rafts [19]. Moreover, APP palmitoylation promotes its dimerization resulting in elevated BACE1-mediated cleavage [95].

Several cytoskeletal components and their binding partners together with the enzymes that regulate the cytoskeleton are localized to the lipid rafts promoting lateral diffusion of membrane lipids and proteins, including APP, in response to various extracellular signals (receptor activation, electrical conductance, oxygen and nutrient deprivation etc.) (for review see [96]).

LOCALISATION OF APP SECRETASES IN THE LIPID RAFTS

Taking into account the existence of two different pathways of APP processing (amyloidogenic and non-amyloidogenic) it was logical to suggest that APP can have two distinct pools in plasma membranes and that amyloidogenic processing might take place in the lipid rafts [15, 89]. Indeed, it was shown that the integrity and composition of lipid rafts, especially the presence of gangliosides, are crucial for A β production, aggregation and oligomerization [97–99]. Furthermore, the precise protein/lipid composition of the rafts was shown to influence the A β 40/A β 42 ratio [100].

With regard to the enzymes processing APP via the amyloidogenic pathway it was shown that BACE1 can be palmitoylated at four C-terminal cysteine residues, which facilitates its raft localisation [101, 102]. On the contrary, treatment of cells with the BACE1 inhibitor KMI-574 resulted in relocation of BACE1 from lipid rafts to the non-raft membrane area. Moreover, proteolytically inactive mutants of BACE1 defective in glycosylation were also shifted from the lipid rafts to the non-raft areas, while a double mutant (D93A/D289A) localized exclusively in the non-raft membranes [103]. When BACE1 was specifically targeted to lipid rafts via GPI-anchoring the production of A β was increased which testified to enhanced amyloidogenic APP processing [16]. Later it was confirmed that wild type BACE1 cleaves APP at two sites (β and β ' sites) producing full length and N-terminally truncated A β whereas GPI-anchorage of the enzyme increases production of the full length A β [104].

It is important to mention that one of the lipid-raft associated proteins, namely the GPI-anchored prion protein (PrP^c) plays an important role in APP processing via inhibiting BACE1 activity [105]. Interaction of the N-terminal region of PrP^{C} with glycosaminoglycans in the rafts results in decreased BACE1 presence at the cell surface and in endosomes where it preferentially cleaves wild type APP but increased in the Golgi where it preferentially cleaves APP with the Swedish mutation (APP_{Swe}) responsible for the earlyonset AD [105]. Because there was no effect of PrP^{c} deficit on processing of APP_{Swe} it was suggested that PrP^{c} may be a key protective player against sporadic AD [106].

Apart from β -secretase, lipid rafts also harbour the main subunits of the γ -secretase complex, namely PS1-derived fragments, mature nicastrin, APH-1 and PEN-2 [51, 107]. S-palmitoylation of nicastrin and APH-1 plays an important role in localization and stability of the γ -secretase complex within the rafts although not modulating its activity [108]. On the contrary, caveolin-1 was shown to be an important regulator of γ -secretase distribution and activity [109]. However, γ -secretase activity and AB generation in the membranes to a great extent depends on the cholesterol levels in rafts since treating cells with AY9944, which blocks the last step of cholesterol biosynthesis, reduced γ -secretase activity and A β generation [110]. Interestingly, PS1 was shown to induce lipid raft formation since brain membranes from mice expressing human wild-type PS1 were less fluid and contained higher cholesterol and sphingomyelin levels [111]. Genome-wide functional analysis has identified a novel modulator of γ -secretase, named OCIAD2 (ovarian cancer immunoreactive antigen domain containing 2), that stimulates A β production via facilitating the formation of an active γ -secretase complex and enhancing its localization to lipid rafts [112]. Although the functional role of such regulatory molecules in APP homeostasis is as yet unknown, it clearly demonstrates that cells might possess a variety of mechanisms affecting γ -secretase activity in relation to lipid rafts.

Unlike β - and γ -secretases which are clearly linked to lipid rafts, the enzymes possessing α -secretase activity, mainly ADAM10 and ADAM17, are believed to be located in non-raft membrane compartments where they participate in shedding of various membrane proteins [17]. However, targeting ADAM10 to lipid rafts by expressing its GPI-anchored variant was found to reduce APP processing by β -secretases clearly indicating that the two opposing enzymes might compete for the APP molecules within the rafts [53]. On the other hand, ADAM10 is regulated by tetraspanins. In particular, TSPAN12 is associated with ADAM10 but not with ADAM17 and overexpression of TSPAN12 in SH-SY5Y cells was shown to enhance non-amyloidogenic processing of APP [113]. More recently it was confirmed that ADAM10 interacts directly with all members of the TspanC8 subgroup of tetraspanins which all regulate ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum, but differentially regulate its subsequent trafficking and activity [114]. However, tetraspanins also regulate γ -secretase activity [115] and as such the fate of APP metabolism might depend on a very intricate balance in the localisation of the enzymes and substrate in the cellular membranes.

APP processing in the lipid rafts not only facilitates interactions between APP and BACE1 but also promotes APP endocytosis. This process is APP isoform-dependent and the neuronal APP₆₉₅ isoform is mostly processed via the β -secretase pathway while APP₇₅₁ and APP₇₇₀ mainly undergo α -secretase cleavage [116]. There is an alternative trafficking route by which APP can bypass endosomes and be transported directly to the lysosomes. This, though, does not occur with either APP_{Swe} or APP_{London} variants suggesting that these mutations increase the chance of the molecules being processed in the lipid rafts [117]. Regulation of APP intracellular trafficking also depends on its interaction with sortilin both at the N- and C-terminal regions. In sortilin knockout mice APP has decreased lysosomal distribution and is increased in lipid rafts [118]. Interestingly, defects in phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) synthesis due to disruption of its synthesizing enzyme PI 3-kinase Vps34 impairs not only autophagy, lysosomal degradation and lipid metabolism but also

results in secretion of unique exosomes enriched with APP-CTFs, specific sphingolipids and phospholipid bis(monoacylglycero)phosphate, which normally reside in endolysosomes [119]. Moreover, it was shown that in AD-mice purified exosomes were enriched in APP-CTFs as compared to control brains. Furthermore, γ -secretase inhibition resulted in APP-CTF oligomerization by preventing C99 proteolysis and led to accumulation of exosomes containing oligomeric APP-CTFs [120]. Future studies should evaluate whether these disease-associated APP-CTFs- or A β -enriched exosomes can be related to the progression and spreading of AD pathology [121].

LIPID RAFTS AND THE AMYLOID PRECURSOR PROTEIN INTRACELLULAR DOMAIN (AICD)

In recent years studies of the physiological role of the C-terminal fragments of APP have received significant attention due to the fact that the peptide released from APP by γ -secretase, namely called AICD, can act as a transcription factor (for review see [122]). The initial controversy in AICD studies, which was due to the utilisation of different cell types expressing different APP isoforms and to the very short half-life of the peptide, have been overcome when several groups have demonstrated that AICD can upregulate expression of the amyloid-degrading enzyme neprilysin (NEP) [123, 124]. This process is APP isoformand neuronal cell-specific and depends on the integrity of lipid rafts. Moreover, transcriptionally active AICD is formed only in the amyloidogenic APP processing pathway which suggests an intrinsic feed-back mechanism for A β removal [116]. It was later shown that AICD regulates transcription of several target genes [125, 126] including a transport protein transthyretin [127]. Moreover, there are data that AICD can also regulate APP and BACE 1 [128] and lipid metabolism [129]. In particular, AICD regulates expression of serine-palmitoyl transferase and sphingolipid synthesis and, in turn, controls lipid raft composition and APP processing [130]. AICD suppresses the expression of the major lipoprotein receptor LRP1 gene and as such affects apoE/cholesterol metabolism [131].

Importantly, NEP can also be associated with lipid rafts, e.g. in ectopeptidase-rich membrane microdomains in human synoviocytes [66]. Sato and colleagues have suggested that cholesterol and other lipids regulate translocation of NEP to the rafts where its substrate A β accumulates. However, this does not modulate the protease activity of NEP itself [67]. However, only the mature, fully glycosylated form of NEP preferentially in dimerised form and in association with phosphatidylserine was observed in the lipid rafts [132]. Studying subcellular distribution and amyloid-degrading activity of NEP these authors also suggested that localisation of the enzyme in different intracellular compartments may provide overall neuronal clearance of A β . Another A β -degrading enzyme, namely insulin-degrading enzyme (IDE), although primarily a cytosolic protein, can also be associated with lipid rafts increasing the capacity of the cells to catabolize A β [133].

LIPIDS RAFTS IN THE AD BRAIN

Apart from A β production and clearance, lipid rafts underlie many cellular processes which can be disrupted due to impaired lipid metabolism. Lipid composition and properties are changing in response to various factors including environmental conditions (temperature, air pressure, oxygen content), nutritional changes, infections, gut microbiota, etc. In this regard it is important to commemorate works of the late academician Eugene M. Kreps (1899–1985) who was the pioneer and one of the founders of lipid research in Russia and who, using an evolutionary and comparative approach, has significantly enriched our knowledge of brain lipids and their functions especially the changes they undergo under pathological conditions (for review see [134]).

The data on the role of lipid rafts in AD pathogenesis accumulated over more than two decades provide strong indication that changes in lipid metabolism have an underlying role

546

in the disease pathogenesis. A recent mathematical modelling study has shown a correlation between the changes in lipid composition and physicochemical properties of raft-like membranes. The authors have indicated that the size of the rafts and lipid mobility in the non-raft membrane increases during age and these are accelerated in the transgenic mouse model of AD [135]. These changes in lipid composition can lead to aberrant protein aggregation resulting in accumulation of toxic peptide species, including A β , and neurodegeneration (for review see [136]). Recent studies have demonstrated that perturbations in sphingolipid metabolism are consistently associated with preclinical and prodromal forms of AD and that sphingolipids might serve as biomarkers for early AD [137]. Below we discuss how the changes in the major lipid raft components can result in AD pathogenesis.

Sphingomyelin

Sphingomyelin (SM) is one the major components of lipid rafts with SM-SM hydrogen bonds contributing to the formation of ordered membrane regions, which stabilize the temporal clusters of signalling proteins and their signalling pathways [138]. SM with its metabolites themselves act as important second messengers in various signal transduction events during cell differentiation, development, the immune response and adaptation of the organism [139–141]. SM is important for the activity of various types of receptors, e.g. α 7 nicotinic receptor, NMDA receptors, neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2, serotonin_{1A} receptor, the urokinase receptor (uPAR) (for review see [18]). Moreover, A β and PrP have a common SM-recognition site which supports an important role of lipid rafts in the pathogenesis of AD, HIV-1 and prion disease [142].

There are well documented studies that lipid metabolism, and in particular that of sphingolipids, undergoes significant changes both in the normally ageing brain and especially in AD pathology, By comparing levels of over 800 lipid species in AD brains by shotgun lipidomics it was demonstrated that levels of SM were decreased, and ceramide levels increased, in the affected brains which might be explained by the AD-related activation of SMase which results in increased SM hydrolysis and ceramide production [143]. Activation of SMase was shown to depend on accumulation of A β , and especially of its most toxic form, $A\beta_{42}$ [144], or its fibrils [145]. Because SMase-related changes in SM metabolism takes please early in AD it can lead to disruption of protein-lipid interaction and downstream signalling pathways [146]. In particular, changes in the balance of the activity of the major enzymes of SM synthesis and degradation can result in perturbation of the levels of ceramide, which is involved in the processes of cell proliferation and apoptosis and as such lead to the compromised homeostasis in the brain which is observed in AD [147]. Elevated levels of SM synthase 1 and SM in AD brains have been reported to increase BACE1 activity while inhibition or knockdown of this enzyme resulted in lysosomal degradation of BACE1 attenuating AD-like pathology in mice [148]. Another enzyme of SM metabolism, namely neutral sphingomyelinase smpd3, which has mostly neuronal expression in the brain but still not with clear function, was shown to play an important role in lipid bilayer remodelling. Its deficiency results in accumulation of the neurotoxic A β and phosphorylated tau with accompanying neuropathology and cognitive deficit characteristic to the AD pathology [149].

The contents of ceramide, SM and sulfatide were found to correlate with age in the hippocampus of males, while sphingosine and sphingosine-1-phosphate correlated inversely with age in females. This supports the existence of gender-specific differences in sphingolipid metabolism in the ageing human brain and explains the increased risk of AD development in women since S1P levels contribute significantly to neurodegeneration in the ageing brain [150].

Gangliosides

The role of gangliosides, sialic acid containing glycosphingolipids, in lipid rafts and brain functions have been recently extensively reviewed in [26]. Knockout of various classes of gangliosides was shown to lead to accelerated neurodegeneration and AD-like pathology [151]. With ageing, and especially in AD, the content of ganglioside decreases significantly in different brain structures, and particularly in the areas of AD pathology [152, 153]. With regard to the ganglioside composition, the aged brain had lower levels of gangliosides of the ganglio-series (GT1b, GD1b, GD1a, GM1) with the statistically significant decrease mainly in the frontal cortex, temporal cortex and white matter [154]. However, in the aged frontal and parietal cortex elevated levels of simple gangliosides (GM2, GM3, GM4, GD3) have been reported [154]. In the AD brain the decreased content of gangliosides of the ganglio-series correlated with degeneration of cortical neurons while elevation of simple gangliosides in the frontal and parietal cortex might be related to accelerated degradation of gangliosides during neuronal death [154]. More recent analysis of lipid rafts from the frontal cortex (representing early stages) and the temporal cortex (representing later stages of AD pathology) has revealed that AD brains contained a significantly higher level of GM1 and GM2 in lipid rafts than matching age controls [155]. Gangliosides were also shown to accumulate in the senile plaques in AD brains [156]. Lipidomic analysis by chromatography-mass spectrometry has revealed elevated levels of diacylglycerol and sphingolipids in the prefrontal cortex of AD patients. Moreover, in the AD entorhinal cortex there were increased levels of lysobisphosphatidic acid, sphingomyelin, GM3 and cholesterol esters [157]. Recently, fluorescent probes allowing analysis of the dynamic behaviour of gangliosides in living cells have been developed and their use has revealed that GPI-anchored receptors and gangliosides interact in a cholesterol-dependent manner [158]. This approach will allow researchers to extend the analysis of ganglioside dynamics in AD-affected membranes.

The link of gangliosides with AD pathology has been mostly related to their role in GM1-induced aggregation of A β peptide (for review see [159]). A β shows high affinity for GM1 and its N-terminal region interacts with GM1 membrane clusters through hydrogen bonds and electrostatic interactions [160]. It was also suggested that cholesterol may facilitate GM1 clustering in the membranes [161] although depletion of cholesterol by M β CD did not have an effect on A β oligomerisation [110]. Analysis of the role of lipid raft proteins in A β aggregation has confirmed that they do not play a significant role in this process since treatment with proteinase K or SDS did not affect the capacity of lipid rafts to facilitate aggregation of A β [110]. However, lipid rafts from ganglioside-rich cells were able to induce A β aggregation more potently than ganglioside-poor cells [110] (Fig. 2).

GM1 also affects APP processing in cell cultures by inhibiting α -secretase cleavage [162]. Moreover, A β_{1-40} oligomers were shown to activate APP amyloidogenic processing by complexing with GM1 ganglioside and stimulating their own production [163]. Age-and AD-dependent increase in GM1 in the lipid rafts was shown to be more pronounced in the brain of transgenic mice overexpressing ApoE4 [164].

The mechanisms linking gangliosides with AD was shown to involve inhibition of GD3synthase (GD3S, the key-enzyme converting *a*-series to major brain *b*-series gangliosides) by A β and down-regulation of GD3S expression by AICD [165]. The authors suggested that changes in the properties of lipid rafts containing different amounts of GM3 or GD3 gangliosides might modulate activity of the amyloidogenic β - and γ -secretases leading to increased production of A β .

Because different species of gangliosides have different impact on the integrity and properties of neuronal membranes, designing any strategy to prevent AD by altering their metabolism needs to be treated with a certain degree of caution. Despite the established role in A β toxicity, treatment of AD patients with GM1 was shown to halt progression of cognitive decline and improve motor performance [166]. Various studies have demonstrat-



Fig. 2. Role of ganglioside GM1 and lipid rafts in A β oligomer formation.

Due to its very high ability for aggregation, $A\beta$ forms dimers, trimers and oligomers of higher levels which are toxic to cells and cause neuronal death leading to AD pathology. Formation of amyloid plaques from $A\beta$ aggregates in complex with other proteins is a hallmark of AD. Formation of toxic amyloid oligomers is initiated in the plasma membrane and depends on the ratio of $A\beta/GM1$.

ed a potential of GM1 administration in reducing A β load in AD patients [153] either by activation of its clearance by autophagy [167] or by promoting A β elimination by microglia via intracerebrally administered exosomes carrying surface gangliosides [168]. Peripheral administration of GM1 for prevention of A β aggregation in the brain via reducing peripheral/brain dynamics of A β was also shown to be effective [169]. However, such strategies need to take into account the antigenic properties of gangliosides which might provoke some side-effects of GM1 administration [170]. Although clinical application of gangliosides, and especially of GM1, in AD (for review see [171]) is still far from being well substantiated further studies in the field might find some appropriate therapeutic venues for these multifunctional natural compounds.

Cholesterol

The role of cholesterol and its metabolism in lipid rafts and AD has been extensively studied and reviewed in [136, 172]. The levels of cholesterol and its precursors were found to be elevated in AD patients although other groups reported lower levels of cholesterol in AD brains [173]. Familial AD-associated PS1 Δ E9 mutation was shown to upregulate total cholesterol levels and increase localization of APP in lipid rafts [174]. However, quantification of global cholesterol levels in the brain does not necessarily correlate with the amount and distribution of lipid rafts in neuronal cells [175].

High cholesterol levels were found to increase lipid raft abundance and A β formation [15] while low cholesterol levels resulted in up-regulation of the α -secretase activity [176]. Because cholesterol is integral for lipid raft formation, its depletion subsequently leads to raft disruption and reduction in A β production [16, 110]. Cholesterol has been shown to bind the C99 fragment of APP promoting A β production [89] and increased levels of A β , in turn, can change cholesterol homeostasis in the Golgi and plasma membrane [177]. And, as already discussed above, A β aggregation was shown to be cholesterol dependent [161]. From the biophysical point of view, increased cholesterol content in the membrane facilitates insertion of A β into the plasma membrane distorting membrane integrity [178]. A β can, as a component of lipoprotein complexes, affect cholesterol transport [179]. It was also shown to inhibit the key enzyme of cholesterol biosynthesis, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase [146]. Following this, the APP intracellular domain AICD was found to regulate cholesterol levels via LRP1 [180].

Despite a significant amount of data on the links between cholesterol levels and AD pathogenesis they are still rather inconclusive for using cholesterol as a marker of cognitive decline in AD [181].

LIPID-RAFT RELATED THERAPEUTIC APPROACHES IN AD

The most developed drugs based on cholesterol metabolism are statins which inhibit HMG CoA reductase, a key enzyme of cholesterol biosynthesis. The current state of the field and problems have been recently discussed and the role of statins has been reviewed [21]. The authors point out that despite high scientific quality of the studies the overall results did not reveal significant efficacy between statins and placebo treatment for AD. This might be because physiological effects of statins are not solely related to inhibition of cholesterol biosynthesis but include perturbation of other mevalonate-dependent pathways such as protein prenylation which plays a certain role in AD pathogenesis [182]. On the other hand, cholesterol metabolic pathways in the brain are autonomous from the systemic ones and the blood-brain barrier penetration of different statins might vary [183]. Unlike cholesterol, oxidized cholesterol metabolites, namely oxysterols, can cross the blood brain barrier from the circulation. These oxysterols and their metabolising enzymes are altered in AD brains which opens new avenues for designing disease modifying therapeutic approaches [20].

Nevertheless, a significant number of *in vitro* and *in vivo* studies have shown positive effects of statins on AD pathogenetic mechanisms. Thus, treatment of brain capillary endothelial cells with simvastatin markedly reduced A β uptake and cell-associated A β oligomers [184]. Fluvastatin was shown to increase lysosomal degradation of APP C-terminal fragments and facilitate A β clearance [185], while lovastatin increased α -secretase cleavage of APP [176]. In AD transgenic mice bryostatin-1 was shown to significantly increase levels of sAPP α and reduce A β peptide levels resulting in improved cognitive behaviour [186, 187]. Another statin, rosuvastatin, was found to alter gene expression of the γ -secretase complex without affecting its enzyme activity [188]. These experimental data clearly demonstrate a potential therapeutic value of statins in preventing AD pathogenesis, but further studies are required to ratify their efficacy in humans.

With regard to designing therapeutic strategies based on utilisation of sphingolipid compounds, the application of nanoparticles based on GM1-rHDL, which have high binding affinity to A β , was shown to facilitate A β degradation by microglia with subsequent increased A β efflux across the blood-brain barrier [189].

Taking into account that lipid rafts are an integral part of the plasma membrane consisting of a phospholipid moiety, it is important to bear in mind that this class of lipids have significant variability of molecular species allowing them to maintain membrane fluidity due to the changeable fatty acid composition [190]. Manipulating lipid membrane components with diet, including unsaturated fatty acids, is one of the approaches to prevent AD pathology [191]. There is convincing evidence that supplementation of docosahexaenoic acid could prevent disturbances in membrane structure with ageing and prevent cognitive decline [192]. An alternative approach for maintaining healthy cholesterol levels and reducing A β generation might be physical exercise as shown in treadmill experiments in AD transgenic mice [193].

Concluding remarks

Future progress in lipid research especially with development of clinical lipidomic approaches and technologies [143] will bring new extension to lipid raft research by characterizing lipid profiles, pathways and networks in isolated cells, tissue biopsy or body fluids of patients [194]. Combined with clinical proteomic and genomic data this will reveal further the role of lipid metabolism in AD pathogenesis in relation to amyloid-induced membrane damage [195]. The discovery of the role of lipid rafts in production of the functionally active transcriptional regulator AICD, which regulates expression of a variety of neuronal genes [124, 127, 165], suggests that any new therapeutic approaches aimed at modification of lipid raft components should be treated with caution. The multifunctional role of lipids, their structural variability and adaptive potential are of great importance for normal functions of cells and organisms and any advance in their research will be beneficial not only for clinical application but mostly for general science. The view on the fundamental role of lipids in cellular membranes and brain functions advocated by academician Eugene M. Kreps in the second half of the last century has reached new horizons and opened new perspectives in our current research.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Russian Foundation for Basic Research (RFBR-19-015-00232) and Russian state budget (assignment AAAA-A18-118012290373-7).

REFERENCES

- Hardy J.A., Higgins G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science. 256: 184–185. 1992. https://doi.org/10.1126/science.1566067
- Selkoe D.J., Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol. Med. 8: 595–608. 2016. https://doi.org/10.15252/emmm.201606210
- 3. Armstrong R.A. Risk factors for Alzheimer's disease. Folia Neuropathol. 57: 87–105. 2019. https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929
- 4. Nelson P.T., Alafuzoff I., Bigio E.H., Bouras C., Braak H., Cairns N.J., Castellani R.J., Crain B.J., Davies P., Del Tredici K., Duyckaerts C., Frosch M.P., Haroutunian V., Hof P.R., Hulette C.M., Hyman B.T., Iwatsubo T., Jellinger K.A., Jicha G.A., Kövari E., Kukull W.A., Leverenz J.B., Love S., Mackenzie I.R., Mann D.M., Masliah E., McKee A.C., Montine T.J., Morris J.C., Schneider J.A., Sonnen J.A., Thal D.R., Trojanowski J.Q., Troncoso J.C., Wisniewski T., Woltjer R.L., Beach T.G. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 71: 362–381. 2012. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7
- 5. *Sakono M., Zako T.* Amyloid oligomers: formation and toxicity of Aβ oligomers. FEBS J. 277: 1348–1358. 2010.
 - https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x
- 6. Walsh D.M., Selkoe D.J. A β oligomers a decade of discovery. J. Neurochem. 101: 1172–1184. 2007.
 - https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x
- Yang T., Li S., Xu H., Walsh D.M., Selkoe D.J. Large Soluble Oligomers of Amyloid β-Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. J. Neurosci. 37: 152–163. 2017. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1698-16.2016

- Condello C., Yuan P., Schain A., Grutzendler J. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar Aβ42 hotspots around plaques. Nat. Commun. 6: 6176. 2015. https://doi.org/10.1038/ncomms7176
- Rodríguez-Arellano J.J., Parpura V., Zorec R., Verkhratsky A. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. Neuroscience. 323: 170–182. 2016. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007
- Desikan R.S., Sabuncu M.R., Schansky N.J., Reuter M., Cabral H.J., Hess C.P., Weiner M.W., Biffi A., Anderson C.D., Rosand J., Salat D.H., Kemper T.L., Dale A.M., Sperling R.A., Fischl B. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Selective disruption of the cerebral neocortex in Alzheimer's disease. PLoS One. 5:e12853. 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012853
- Carmona S., Hardy J., Guerreiro R. The genetic landscape of Alzheimer disease. Handb. Clin. Neurol. 148: 395–408. 2018. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00026-0
- Guerreiro R.J., Gustafson D.R., Hardy J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. Neurobiol. Aging. 33: 437–456. 2012. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.025
- Hampel H., Vassar R., De Strooper B., Hardy J., Willem M., Singh N., Zhou J., Yan R., Vanmechelen E., De Vos A., Nisticò R., Corbo M., Imbimbo B.P., Streffer J., Voytyuk I., Timmers M., Tahami Monfared A.A., Irizarry M., Albala B., Koyama A., Watanabe N., Kimura T., Yarenis L., Lista S., Kramer L., Vergallo A. The β-secretase BACE1 in Alzheimer's disease. Biol. Psychiatry. 2020.

https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.02.001

- Haass C., Kaether C., Thinakaran G., Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. Cold Spring Harb Perspect Med. 2: a006270. 2012. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270
- Ehehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. J. Cell Biol. 160: 113–123. 2003. https://doi.org/10.1083/jcb.200207113
- Cordy J.M., Hussain I., Dingwall C., Hooper N.M., Turner A.J. Exclusively targeting β-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates β-site processing of the amyloid precursor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 11735–11740. 2003. https://doi.org/10.1073/pnas.1635130100
- Allinson T.M., Parkin E.T., Turner A.J., Hooper N.M. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. J. Neurosci. Res. 74: 342–352. 2003. https://doi.org/10.1002/jnr.10737
- Hicks D.A., Nalivaeva N.N., Turner A.J. Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. Front Physiol. 3: 189. 2012. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00189
- Bhattacharyya R., Barren C., Kovacs D.M. Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. J. Neurosci. 33: 11169–11183. 2013. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4704-12.2013
- Loera-Valencia R., Goikolea J., Parrado-Fernandez C., Merino-Serrais P., Maioli S. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 190: 104–114. 2019. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.003
- Mejías-Trueba M., Pérez-Moreno M.A., Fernández-Arche M.Á. Systematic review of the efficacy of statins for the treatment of Alzheimer's disease. Clin. Med. (Lond). 18: 54–61. 2018. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-1-54
- Hooper N.M., Karran E.H., Turner A.J. Membrane protein secretases. Biochem. J. 321: 265–279. 1997. https://doi.org/10.1042/bj3210265
- Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature. 387: 569–572. 1997.
 - https://doi.org/10.1038/42408
- 24. Sonnino S., Prinetti A. Membrane domains and the "lipid raft" concept. Curr. Med. Chem. 20: 4–21. 2013.
 - https://doi.org/10.2174/0929867311320010003
- 25. *Bieberich E*. Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. Chem. Phys. Lipids. 216: 114–131. 1918.
 - https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.08.003
- Grassi S., Giussani P., Mauri L., Prioni S., Sonnino S., Prinetti A. Lipid rafts and neurodegeneration: Structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases. J. Lipid. Res. pii: jlr.TR119000427. 2019. https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000427

- Morigaki K., Tanimoto Y. Evolution and development of model membranes for physicochemical and functional studies of the membrane lateral heterogeneity. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1860: 2012–2017. 2018. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.010
- Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.S., Glenney J.R., Anderson R.G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell. 68: 673–682. 1992. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90143-z
- 29. *van Meer G., Simons K.* Lipid polarity and sorting in epithelial cells. J. Cell Biochem. 36:51-58. 1988.

https://doi.org/10.1002/jcb.240360106

- Brown D.A., London E. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? Biochem. Biophys. Res. Commun. 240: 1–7. 1997. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7575
- Jiang X., Zhu Z., Qin H., Tripathi P., Zhong L., Elsherbini A., Karki S., Crivelli S.M., Zhi W., Wang G., Spassieva S.D., Bieberich E. Visualization of Ceramide-Associated Proteins in Ceramide-Rich Platforms Using a Cross-Linkable Ceramide Analog and Proximity Ligation Assays With Anti-ceramide Antibody. Front Cell Dev. Biol. 7: 166. 2019. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00166
- Yáñez-Mó M., Gutiérrez-López M.D., Cabañas C. Functional interplay between tetraspanins and proteases. Cell Mol. Life Sci. 68: 3323–3335. 2011. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0746-y
- Hemler M.E. Tetraspanin functions and associated microdomains. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 801–811. 2005. https://doi.org/10.1038/nrm1736
- Moretto E., Longatti A., Murru L., Chamma I., Sessa A., Zapata J., Hosy E., Sainlos M., Saint-Pol J., Rubinstein E., Choquet D., Broccoli V., Schiavo G., Thoumine O., Passafaro M. TSPAN5 Enriched Microdomains Provide a Platform for Dendritic Spine Maturation through Neuroligin-1 Clustering. Cell Rep. 29: 1130–1146.e8. 2019.
- https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.051
 35. Schon E.A., Area-Gomez E. Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. Mol. Cell Neurosci. 55: 26–36. 2013. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.07.011
- Pera M., Larrea D., Guardia-Laguarta C., Montesinos J., Velasco K.R., Agrawal R.R., Xu Y., Chan R.B., Di Paolo G., Mehler M.F., Perumal G.S., Macaluso F.P., Freyberg Z.Z., Acin-Perez R., Enriquez J.A., Schon E.A., Area-Gomez E. Increased localization of APP-C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. EMBO J. 36: 3356–3371. 2017. https://doi.org/10.15252/embj.201796797
- Hayashi T., Rizzuto R., Hajnoczky G., Su T.P. MAM: more than just a housekeeper. Trends Cell Biol. 19: 81–88. 2009. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.12.002
- Teixeira G., Vieira L.B., Gomez M.V., Guatimosim C. Cholesterol as a key player in the balance of evoked and spontaneous glutamate release in rat brain cortical synaptosomes. Neurochem. Int. 61: 1151–1159. 2012. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.08.008
- Ouweneel A.B., Thomas M.J., Sorci-Thomas M.G. The ins and outs of lipid rafts: Functions in intracellular cholesterol homeostasis, microparticles, and cell membranes. J. Lipid Res. pii: jlr.TR119000383. 2019. https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000383
- Pascual M., Ibáñez F., Guerri C. Exosomes as mediators of neuron-glia communication in neuroinflammation. Neural. Regen. Res. 15: 796–801. 2020. https://doi.org/10.4103/1673-5374.268893
- Pollet H., Conrard L., Cloos A.S., Tyteca D. Plasma Membrane Lipid Domains as Platforms for Vesicle Biogenesis and Shedding. Biomolecules. 8: pii: E94. 2018. https://doi.org/10.3390/biom8030094
- 42. Turner A.J. PIG-tailed membrane proteins. Essays Biochem. 28: 113–127. 1994. PMID: 7925314
- Kinoshita T., Fujita M. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling, J. Lipid. Res. 571: 6–24. 2016. https://doi.org/10.1194/jlr.R063313
- 44. Oh P., Schnitzer J.E. Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. Mol. Biol. Cell. 123: 685–698. 2001. https://doi.org/10.1091/mbc.12.3.685

- 45. Snyers L., Umlauf E., Prohaska R. Association of stomatin with lipid-protein complexes in the plasma membrane and the endocytic compartment. Eur. J. Cell Biol. 7811: 802-812. 1999. https://doi.org/10.1016/S0171-9335(99)80031-4
- 46. Liu J., Deyoung S.M., Zhang M., Dold L.H., Saltiel A.R. The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 28016: 16125-16134. 2005. https://doi.org/10.1074/jbc.M500940200
- 47. Schneider A., Rajendran L., Honsho M., Gralle M., Donnert G., Wouters F., Hell S.W., Simons M. Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. J. Neurosci. 28: 2874-2882. 2008. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008
- 48. Morrow I.C., Parton R.G. Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. Traffic. 6: 725-740. 2005. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00318.x
- 49. Parkin E.T., Turner A.J., Hooper N.M. (1999). Amyloid precursor protein, although partially detergent-insoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein. Biochem. J. 344: 23-30. 1999. PMCID: PMC1220609.
- 50. Kalvodova L., Kahya N., Schwille P., Ehehalt R., Verkade P., Drechsel D., Simons K. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. J. Biol. Chem. 280: 36815-36823. 2005. https://doi.org/10.1074/jbc.M504484200
- 51. Hur J.Y., Welander H., Behbahani H., Aoki M., Franberg J., Winblad B., Frykman S., Tjernberg L.O. Active γ -secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. FEBS J. 275: 1174-1187. 2008.

https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06278.x

- 52. Matsumura N., Takami M., Okochi M., Wada-Kakuda S., Fujiwara H., Tagami S., Funamoto S., Ihara Y., Morishima-Kawashima M. y-Secretase associated with lipid rafts: multiple interactive pathways in the stepwise processing of β -carboxyl-terminal fragment. J. Biol. Chem. 289: 5109–5121. 2014. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510131
- 53. Harris B., Pereira I., Parkin E. Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. Brain Res. 1296: 203-215. 2009.

https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.105

- 54. Tellier E., Canault M., Rebsomen L., Bonardo B., Juhan-Vague I., Nalbone G., Peiretti F. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. Exp. Cell. Res. 312: 3969–3980. 2006. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.08.027
- 55. *Pinheiro T.J.* The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. Chem. Phys. Lipids. 141: 66–71. 2006.
 - https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.02.022
- 56. Zhu D., Xiong W.C., Mei L. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. J. Neurosci. 26: 4841–4851. 2006. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2807-05.2006
- 57. Colón-Sáez J.O., Yakel J.L. The α7 nicotinic acetylcholine receptor function in hippocampal neurons is regulated by the lipid composition of the plasma membrane. J. Physiol. 589: 3163-3174. 2011. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.209494
- 58. Khan G.M., Tong M., Jhun M., Arora K., Nichols R.A. β-Amyloid activates presynaptic α7 nicotinic acetylcholine receptors reconstituted into a model nerve cell system: involvement of lipid rafts. Eur. J. Neurosci. 31: 788-796. 2010. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07116.x
- 59. Moral-Naranjo M.T., Montenegro M.F., Muñoz-Delgado E., Campoy F.J., Vidal C.J. Targeting of acetylcholinesterase to lipid rafts of muscle. Chem. Biol. Interact. 175: 312-317. 2008. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.018
- 60. Xie H.Q., Liang D., Leung K.W., Chen V.P., Zhu K.Y., Chan W.K., Choi R.C., Massoulie J., Tsim K.W. Targeting acetylcholinesterase (AChE) to membrane rafts: A function mediated by the proline rich membrane anchor (PRiMA) in neurons. J. Biol. Chem 285: 11537-11546. 2010. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.038711
- 61. Suzuki T., Suzuki Y. Virus infection and lipid rafts. Biol. Pharm. Bull. 29: 1538-1541. 2006. https://doi.org/10.1248/bpb.29.1538
- 62. Margheri G., D'Agostino R., Trigari S., Sottini S., Del Rosso M. The β-subunit of cholera toxin has a high affinity for ganglioside GM1 embedded into solid supported lipid membranes with a lipid raft-like composition. Lipids. 49: 203–206. 2014. https://doi.org/10.1007/s11745-013-3845-8
- 63. Popik W., Alce T.M., Au W.C. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. J. Virol. 76: 4709–

4722. 2002.

https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.4709-4722.2002

- Lu Y., Liu D.X., Tam J.P. Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 369: 344–349. 2008. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.023
- 65. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science. pii: eabb2762. 2020. https://doi.org/10.1126/science.abb2762
- 66. Riemann D., Hansen G.H., Niels-Christiansen L., Thorsen E., Immerdal L., Santos A.N., Kehlen A., Langner J., Danielsen E.M. Caveolae/lipid rafts in fibroblast-like synoviocytes: ectopeptidaserich membrane microdomains. Biochem. J. 354: 47–55. 2001. https://doi.org/10.1042/0264-6021:3540047
- Sato K., Tanabe C., Yonemura Y., Watahiki H., Zhao Y., Yagishita S., Ebina M., Suo S., Futai E., Murata M., Ishiura S. Localization of mature neprilysin in lipid rafts. J. Neurosci. Res. 90: 870–877. 2012. https://doi.org/10.1002/jnr.22796
- Grider M.H., Park D., Spencer D.M., Shine H.D. Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively. J. Neurosci. Res. 87: 3033–3042. 2009.
 - https://doi.org/10.1002/jnr.22140
- Petro K.A., Schengrund C.L. Membrane raft disruption promotes axonogenesis in n2a neuroblastoma cells. Neurochem. Res 34: 29–37. 2009. https://doi.org/10.1007/s11064-008-9625-9
- Willmann R., Pun S., Stallmach L., Sadasivam G., Santos A.F., Caroni P., Fuhrer C. Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. EMBO J. 25: 4050–4060. 2006. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601288
- Nalivaeva N.N., Turner A.J. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. FEBS Lett. 587: 2046–2054. 2013. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.010
- Kitaguchi N., Takahashi Y., Tokushima Y., Shiojiri S., Ito H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. Nature. 331: 530–532. https://doi.org/10.1038/331530a0
- Sandbrink R., Masters C.L., Beyreuther K. APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. Ann. NY Acad. Sci. 777: 281–287. 1996. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb34433.x
- 74. Tanaka S., Shiojiri S., Takahashi Y., Kitaguchi N., Ito H., Kameyama M., Kimura J., Nakamura S., Ueda K. Tissue-specific expression of three types of β-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1406–1414. 1989. https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)92760-5
- 75. Golde T.E., Estus S., Usiak M., Younkin L.H., Younkin S.G. Expression of β amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. Neuron. 4: 253–267. 1990. https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90100-t
- Moir R.D., Lynch T., Bush A.I., Whyte S., Henry A., Portbury S., Multhaup G., Small D.H., Tanzi R.E., Beyreuther K., Masters C.L. Relative increase in Alzheimer's disease of soluble forms of cerebral Ab amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain. J. Biol. Chem. 273: 5013–5019. 1998. https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.5013
- 77. Yamada T., Araki E., Izumi R., Goto I., Sasaki H., Sakaki Y. Expression of Alzheimer amyloid β-protein precursor gene in neuronal cells. Gerontology. 37(Suppl 1): 24–30. 1991. https://doi.org/10.1159/000213294
- Zhang H., Ma Q., Zhang Y.W., Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's β-amyloid precursor protein. J. Neurochem. 120(Suppl 1) :9–21. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x
- Chasseigneaux S., Allinquant B. Functions of Aβ, sAPPα and sAPPβ : similarities and differences. J. Neurochem. 120(Suppl 1): 99–108. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x
- Octave J.N., Pierrot N., Ferao Santos S., Nalivaeva N.N., Turner A.J. From synaptic spines to nuclear signaling: nuclear and synaptic actions of the amyloid precursor protein. J. Neurochem. 126: 183–190. 2013. https://doi.org/10.1111/jnc.12239

- Higgins L.S., Murphy G.M., Jr., Forno L.S., Catalano R., Cordell B. P3 β-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. Am. J. Pathol. 149: 585–596. 1996. PMCID: PMC1865300.
- Siegel G., Gerber H., Koch P., Bruestle O., Fraering P.C., Rajendran L. The Alzheimer's Disease γ-Secretase Generates Higher 42:40 Ratios for β-Amyloid Than for p3 Peptides. Cell. Rep. 19: 1967–1976.
 https://doi.org/10.1016/j.colrop.2017.05.024
 - https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.034
- 83. Lefranc-Jullien S., Sunyach C., Checler F. APPε, the ε-secretase-derived N-terminal product of the β-amyloid precursor protein, behaves as a type I protein and undergoes α-, β-, and γ-secretase cleavages. J. Neurochem. 97: 807–817. 2006. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03748.x
- Haupt S., Borghese L., Brüstle O., Edenhofer F. Non-genetic modulation of Notch activity by artificial delivery of Notch intracellular domain into neural stem cells. Stem. Cell. Rev. Rep. 8: 672–684. 2012. https://doi.org/10.1007/s12015-011-9335-6
- Sawamura N., Ko M., Yu W., Zou K., Hanada K., Suzuki T., Gong J.S., Yanagisawa K., Michikawa M. Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. J. Biol. Chem. 279:11984–11991. 2004. https://doi.org/10.1074/jbc.M309832200
- Cordy J.M., Hooper N.M., Turner A.J. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. Mol. Membr.Biol. 23: 111–122. 2006. https://doi.org/10.1080/09687860500496417
- 87. Vetrivel K.S., Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease β-amyloid production. Biochim. Biophys. Acta. 1801: 860–867. 2010. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.03.007
- Chen T.Y., Liu P.H., Ruan C.T., Chiu L., Kung F.L. The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 342: 266–272. 2006. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.156
- Beel A.J., Sakakura M., Barrett P.J., Sanders C.R. Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? Biochim. Biophys. Acta. 1801: 975–982. 2010. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.03.008
- Yao Z.X., Papadopoulos V. Function of β-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. FASEB J. 16: 1677–1679. 2002. https://doi.org/10.1096/fj.02-0285fje
- Minami S.S., Hoe H.S., Rebeck G.W. Fyn kinase regulates the association between amyloid precursor protein and Dab1 by promoting their localization to detergent-resistant membranes. J. Neurochem. 118: 879–890. 2011. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07296.x
- Watanabe T., Hikichi Y., Willuweit A., Shintani Y., Horiguchi T. FBL2 regulates amyloid precursor protein (APP) metabolism by promoting ubiquitination-dependent APP degradation and inhibition of APP endocytosis. J. Neurosci. 32: 3352–3365. 2012. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5659-11.2012
- Yoon I.S., Chen E., Busse T., Repetto E., Lakshmana M.K., Koo E.H., Kang D.E. Low-density lipoprotein receptor-related protein promotes amyloid precursor protein trafficking to lipid rafts in the endocytic pathway. FASEB J. 21: 2742–2752. 2007. https://doi.org/10.1096/fj.07-8114com
- 94. Fuentealba R.A., Barría M.I., Lee J., Cam J., Araya C., Escudero C.A., Inestrosa N.C., Bronfman F.C., Bu G., Marzolo M.P. ApoER2 expression increases Aβ production while decreasing Amyloid Precursor Protein (APP) endocytosis: Possible role in the partitioning of APP into lipid rafts and in the regulation of γ-secretase activity. Mol. Neurodegener. 2: 14. 2007. https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-14
- 95. Bhattacharyya R., Fenn R.H., Barren C., Tanzi R.E., Kovacs D.M. Palmitoylated APP Forms Dimers, Cleaved by BACE1. PLoS One. 11: e0166400. 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166400
- 96. Head B.P., Patel H.H., Insel P.A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. Biochim. Biophys. Acta. 1838: 532–545. 2014. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.018
- Rushworth J.V., Hooper N.M. Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-β Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. Int. J. Alzheimers Dis. 2011:603052. 2011. https://doi.org/10.4061/2011/603052
- Kim S.I., Yi J.S., Ko Y.G. Amyloid β oligomerization is induced by brain lipid rafts. J. Cell Biochem. 99: 878–889. 2006. https://doi.org/10.1002/jcb.20978

- Ikeda K., Yamaguchi T., Fukunaga S., Hoshino M., Matsuzaki K. Mechanism of amyloid β-protein aggregation mediated by GM1 ganglioside clusters. Biochemistry. 50: 6433–6440. 2011. https://doi.org/10.1021/bi200771m
- 100. Ogawa M., Tsukuda M., Yamaguchi T., Ikeda K., Okada T., Yano Y., Hoshino M., Matsuzaki K. Ganglioside-mediated aggregation of amyloid β-proteins (Aβ): comparison between Aβ-(1-42) and Aβ-(1-40). J. Neurochem. 116: 851–857. 2011. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06997.x
- Hattori C., Asai M., Onishi H., Sasagawa N., Hashimoto Y., Saido T.C., Maruyama K., Mizutani S., Ishiura S. BACE1 interacts with lipid raft proteins. J. Neurosci. Res. 84: 912–917. 2006. https://doi.org/10.1002/jnr.20981
- 102. Motoki K., Kume H., Oda A., Tamaoka A., Hosaka A., Kametani F., Araki W. Neuronal β-amyloid generation is independent of lipid raft association of β-secretase BACE1: analysis with a palmitoylation-deficient mutant. Brain Behav. 2: 270–282. 2012. https://doi.org/10.1002/brb3.52
- 103. Ebina M., Futai E., Tanabe C., Sasagawa N., Kiso Y., Ishiura S. Inhibition by KMI-574 leads to dislocalization of BACE1 from lipid rafts. J. Neurosci. Res. 87: 360–368. 2009. https://doi.org/10.1002/jnr.21858
- 104. Vetrivel K.S., Barman A., Chen Y., Nguyen P.D., Wagner S.L., Prabhakar R., Thinakaran G. Loss of cleavage at β'-site contributes to apparent increase in β-amyloid peptide (Aβ) secretion by β-secretase (BACE1)-glycosylphosphatidylinositol (GPI) processing of amyloid precursor protein. J. Biol. Chem. 286: 26166–26177. 2011. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260471
- 105. Parkin E.T., Watt N.T., Hussain I., Eckman E.A., Eckman C.B., Manson J.C., Baybutt H.N., Turner A.J., Hooper N.M. Cellular prion protein regulates β-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 11062–11067. 2007. https://doi.org/10.1073/pnas.0609621104
- 106. Griffiths H.H., Whitehouse I.J., Baybutt H., Brown D., Kellett K.A., Jackson C.D., Turner A.J., Piccardo P., Manson J.C., Hooper N.M. Prion protein interacts with BACE1 protein and differentially regulates its activity toward wild type and Swedish mutant amyloid precursor protein. J. Biol. Chem. 286: 33489–33500. 2011. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278556
- 107. Vetrivel K.S., Cheng H., Lin W., Sakurai T., Li T., Nukina N., Wong P.C., Xu H., Thinakaran G. Association of γ-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. J. Biol. Chem. 279: 44945–54. 2004. https://doi.org/10.1074/jbc.M407986200
- 108. Cheng H., Vetrivel K.S., Drisdel R.C., Meckler X., Gong P., Leem J.Y., Li T., Carter M., Chen Y., Nguyen P., Iwatsubo T., Tomita T., Wong P.C., Green W.N., Kounnas M.Z., Thinakaran G. S-palmitoylation of gamma-secretase subunits nicastrin and APH-1. J. Biol. Chem. 284: 1373–84. 2009. https://doi.org/10.1074/jbc.M806380200
- 109. Kapoor A., Hsu W.M., Wang B.J., Wu G.H., Lin T.Y., Lee S.J., Yen C.T., Liang S.M., Liao Y.F. Caveolin-1 regulates γ-secretase-mediated AβPP processing by modulating spatial distribution of γ-secretase in membrane. J. Alzheimers Dis. 22: 423–242. 2010. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100531
- Kim Y., Kim C., Jang H.Y., Mook-Jung I. Inhibition of Cholesterol Biosynthesis Reduces γ-Secretase Activity and Amyloid-β Generation. J. Alzheimers Dis. 51: 1057–1068. 2016. https://doi.org/10.3233/JAD-150982
- Eckert G.P., Müller W.E. Presenilin 1 modifies lipid raft composition of neuronal membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 382: 673–677. 2009. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.070
- 112. Han J., Jung S., Jang J., Kam T.I., Choi H., Kim B.J., Nah J., Jo D.G., Nakagawa T., Nishimura M., Jung Y.K. OCIAD2 activates γ-secretase to enhance amyloid β production by interacting with nicastrin. Cell. Mol. Life Sci. 71: 2561–2576. 2014. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1515-x
- 113. Xu D., Sharma C., Hemler M.E. Tetraspanin12 regulates ADAM10-dependent cleavage of amyloid precursor protein. FASEB J. 23:3674-3681. 2009. https://doi.org/10.1096/fj.09-133462
- 114. Seipold L., Saftig P. The Emerging Role of Tetraspanins in the Proteolytic Processing of the Amyloid Precursor Protein. Front Mol. Neurosci. 9: 149. 2016. https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00149
- 115. Seipold L., Damme M., Prox J., Rabe B., Kasparek P., Sedlacek R., Altmeppen H., Willem M., Boland B., Glatzel M., Saftig P. Tetraspanin 3: A central endocytic membrane component regulating the expression of ADAM10, presenilin and the amyloid precursor protein. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. 1864: 217–230, 2017. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.003
- 116. Belyaev N.D., Kellett K.A., Beckett C., Makova N.Z., Revett T.J., Nalivaeva N.N., Hooper N.M., Turner A.J. The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain

is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β -secretase-dependent pathway J. Biol. Chem. 285: 41443–41454, 2010. https://doi.org/10.1074/bio.M110.1041200

- https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141390
- 117. Lorenzen A., Samosh J., Vandewark K., Anborgh P.H., Seah C., Magalhaes A.C., Cregan S.P., Ferguson S.S., Pasternak S.H. Rapid and direct transport of cell surface APP to the lysosome defines a novel selective pathway. Mol. Brain 3: 11. 2010. https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-11
- 118. Yang M., Virassamy B., Vijayaraj S.L., Lim Y., Saadipour K., Wang Y.J., Han Y.C., Zhong J.H., Morales C.R., Zhou X.F. The intracellular domain of sortilin interacts with amyloid precursor protein and regulates its lysosomal and lipid raft trafficking. PLoS One. 8:e63049. 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063049
- 119. Miranda A.M., Lasiecka Z.M., Xu Y., Neufeld J., Shahriar S., Simoes S., Chan R.B., Oliveira T.G., Small S.A., Di Paolo G. Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures. Nat. Commun. 9: 291. 2018. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02533-w
- 120. Lauritzen I., Bécot A., Bourgeois A., Pardossi-Piquard R., Biferi M.G., Barkats M., Checler F. Targeting γ-secretase triggers the selective enrichment of oligomeric APP-CTFs in brain extracellular vesicles from Alzheimer cell and mouse models. Transl. Neurodegener. 8:35. 2019. https://doi.org/10.1186/s40035-019-0176-6
- 121. Rosas-Hernandez H., Cuevas E., Raymick J.B., Robinson B.L., Ali S.F., Hanig J., Sarkar S. Characterization of Serum Exosomes from a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. Curr. Alzheimer Res. 16: 388–395. 2019. https://doi.org/10.2174/1567205016666190321155422
- Beckett, Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Turner A.J. Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. Cell Signal. 24: 402–409. 2012. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.10.007
- 123. Pardossi-Piquard R., Petit A., Kawarai T., Sunyach C., Alves da Costa C., Vincent B., Ring S., D'Adamio L., Shen J., Muller U., St George Hyslop P., Checler F. Presenilin-dependent transcriptional control of the Aβ-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of βAPP and APLP. Neuron. 46: 541–554. 2005. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.008
- 124. *Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z., Turner A.J.* Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. EMBO Rep. 10: 94–100. 2009. https://doi.org/10.1038/embor.2008.222
- 125. Pardossi-Piquard R., Checler F. The physiology of the β-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. J. Neurochem. 120(Suppl 1): 109–124. 2012. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x
- 126. Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Kerridge C., Turner A.J. Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci. 6: 235. 2014. https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00235
- 127. Kerridge C., Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Turner A.J. The Aβ-clearance protein transthyretin, like neprilysin, is epigenetically regulated by the amyloid precursor protein intracellular domain. J. Neurochem. 130: 419–431. 2014. https://doi.org/10.1111/jnc.12680
- 128. von Rotz R.C., Kohli B.M., Bosset J., Meier M., Suzuki T., Nitsch R.M., Konietzko U. The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. J. Cell Sci. 117: 4435–4448. 2004. https://doi.org/10.1242/jcs.01323
- 129. Grimm M.O., Rothhaar T.L., Hartmann T. The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism. Exp. Brain Res. 217: 365–375. 2012. https://doi.org/10.1007/s00221-011-2975-6
- 130. Grimm M.O., Grösgen S., Rothhaar T.L., Burg V.K., Hundsdörfer B., Haupenthal V.J., Friess P., Müller U., Fassbender K., Riemenschneider M., Grimm H.S., Hartmann T. Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. Int. J. Alzheimers Dis. 2011: 695413. 2011. https://doi.org/10.4061/2011/695413
- 131. Liu Q., Zerbinatti C.V., Zhang J., Hoe H.S., Wang B., Cole S.L., Herz J., Muglia L., Bu G. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. Neuron. 56: 66–78. 2007. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.008
- 132. Hama E., Shirotani K., Iwata N., Saido T.C. Effects of neprilysin chimeric proteins targeted to subcellular compartments on amyloid β peptide clearance in primary neurons. J. Biol. Chem. 279: 30259–30264. 2004. https://doi.org/10.1074/jbc.M401891200

- 133. Bulloj A., Leal M.C., Surace E.I., Zhang X., Xu H., Ledesma M.D., Castaño E.M., Morelli L. Detergent resistant membrane-associated IDE in brain tissue and cultured cells: Relevance to Aβ and insulin degradation. Mol. Neurodegener. 3: 22. 2008. https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-22
- 134. Kreps E.M., Avrova N.F., Chebotarëva M.A., Chirkovskaya E.V., Levitina M.V., Pomazanskaya L.F., Pravdina N.I. Some aspects of comparative biochemistry of brain lipids in teleost and elasmobranch fish. Comp. Biochem. Physiol. B. 52: 293–299. 1975. https://doi.org/10.1016/0305-0491(75)90067-x
- 135. Santos G., Díaz M., Torres N.V. Lipid Raft Size and Lipid Mobility in Non-raft Domains Increase during Aging and Are Exacerbated in APP/PS1 Mice Model of Alzheimer's Disease. Predictions from an Agent-Based Mathematical Model. Front Physiol. 7: 90. 2016. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00090
- 136. Quinto- Marin R., Fabelo N., Fernández-Echevarría C., Canerina-Amaro A., Rodríguez-Barreto D., Alemany D., Mesa-Herrera F, Díaz M. Lipid Raft Alterations in Aged-Associated Neuropathologies. Curr. Alzheimer Res. 13: 973–984. 2016. https://doi.org/10.2174/1567205013666160314150017
- 137. Varma V.R., Oommen A.M., Varma S., Casanova R., An Y., Andrews R.M., O'Brien R., Pletnikova O., Troncoso J.C., Toledo J., Baillie R., Arnold M., Kastenmueller G., Nho K., Doraiswamy P.M., Saykin A.J., Kaddurah-Daouk R., Legido-Quigley C., Thambisetty M. Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. PLoS Med. 15: e1002482. 2018. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002482
- 138. *Kinoshita M., Suzuki K.G.N., Murata M., Matsumori N.* Evidence of lipid rafts based on the partition and dynamic behavior of sphingomyelins. Chem. Phys. Lipids. 215: 84–95. 2018. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.07.002
- 139. Herget T., Esdar C., Oehrlein S.A., Heinrich M., Schütze S., Maelicke A., van Echten-Deckert G. Production of ceramides causes apoptosis during early neural differentiation in vitro. J. Biol. Chem. 275: 30344–30354. 2000. https://doi.org/10.1074/jbc.M000714200
- 140. Nalivaeva N.N., Rybakina E.G., Pivanovich I.Yu., Kozinets I.A., Shanin S.N., Bartfai T. Activation of neutral sphingomyelinase by IL-1β requires the type 1 interleukin 1 receptor. Cytokine. 12: 229–232. 2000. https://doi.org/10.1006/arte.1000.0547
 - https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0547
- 141. Clement A.B., Gamerdinger M., Tamboli I.Y., Lütjohann D., Walter J., Greeve I., Gimpl G., Behl C. Adaptation of neuronal cells to chronic oxidative stress is associated with altered cholesterol and sphingolipid homeostasis and lysosomal function. J. Neurochem. 111: 669–682. 2009. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06360.x
- 142. Mahfoud R., Garmy N., Maresca M., Yahi N., Puigserver A., Fantini J. Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. J. Biol. Chem. 277: 11292–11296. 2002. https://doi.org/10.1074/jbc.M111679200
- 143. Han X., Rozen S., Boyle S.H., Hellegers C., Cheng H., Burke J.R., Welsh-Bohmer K.A., Doraiswamy P.M., Kaddurah-Daouk R. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. PLoS One. 6: e21643. 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021643
- 144. Grimm M.O., Grimm H.S., Pätzold A.J., Zinser E.G., Halonen R., Duering M., Tschäpe J.A., De Strooper B., Müller U., Shen J., Hartmann T. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-β and presenilin. Nat. Cell. Biol. 7: 1118–1123. 2005. https://doi.org/10.1038/ncb1313
- 145. Jana A., Pahan K. Fibrillar amyloid-β-activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. J. Neurosci. 30: 12676– 12689. 2010. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1243-10.2010
- 146. Haughey N.J., Bandaru V.V., Bae M., Mattson M.P. Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. Biochim. Biophys. Acta. 1801:878-886. 2010. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.003
- 147. Bienias K., Fiedorowicz A., Sadowska A., Prokopiuk S., Car H. Regulation of sphingomyelin metabolism. Pharmacol. Rep. 68: 570–581. 2016. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.12.008
- 148. Lu M.H., Ji W.L., Xu D.E., Yao P.P., Zhao X.Y., Wang Z.T., Fang L.P., Huang R., Lan L.J., Chen J.B., Wang T.H., Cheng L.H., Xu R.X., Liu C.F., Puglielli L., Ma Q.H. Inhibition of sphingomyelin synthase 1 ameliorates alzheimer-like pathology in APP/PS1 transgenic mice through promoting lysosomal degradation of BACE1. Exp. Neurol. 311: 67–79. 2019. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.09.012
- 149. Stoffel W., Jenke B., Schmidt-Soltau I., Binczek E., Brodesser S., Hammels I. SMPD3 deficiency perturbs neuronal proteostasis and causes progressive cognitive impairment. Cell. Death Dis.

9:507.2018.

https://doi.org/10.1038/s41419-018-0560-7

- 150. Couttas T.A., Kain N., Tran C., Chatterton Z., Kwok J.B., Don A.S. Age-Dependent Changes to Sphingolipid Balance in the Human Hippocampus are Gender-Specific and May Sensitize to Neurodegeneration. J. Alzheimers Dis. 63: 503–514. 2018. https://doi.org/10.3233/JAD-171054
- 151. Furukawa K., Ohmi Y., Ohkawa Y., Tokuda N., Kondo Y., Tajima O., Furukawa K. Regulatory mechanisms of nervous systems with glycosphingolipids. Neurochem. Res. 36: 1578–1586. 2011. https://doi.org/10.1007/s11064-011-0494-2
- 152. Kracun I., Rosner H., Drnovsek V., Heffer-Lauc M., Cosović C., Lauc G. Human brain gangliosides in development, aging and disease. Int. J. Dev. Biol. 35: 289–295. 1991. PMID: .1814411
- 153. Ariga T., McDonald M.P., Yu R.K. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease – a review. J. Lipid Res. 49: 1157–1175. 2008. https://doi.org/10.1194/jlr.R800007-JLR200
- 154. Kalanj S., Kracun I., Rosner H., Cosović C. Regional distribution of brain gangliosides in Alzheimer's disease. Neurol. Croat. 40: 269–281. 1991. PMID: 1751644
- 155. Molander-Melin M., Blennow K., Bogdanovic N., Dellheden B., Månsson J.E., Fredman P. Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. J. Neurochem. 92: 171–182. 2005. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02849.x
- 156. Nishinaka T., Iwata D., Shimada S., Kosaka K., Suzuki Y. Anti-ganglioside GD1a monoclonal antibody recognizes senile plaques in the brains of patients with Alzheimer-type dementia. Neurosci. Res. 17: 171–176. 1993. https://doi.org/10.1016/0168-0102(93)90093-6
- 157. Chan R.B., Oliveira T.G., Cortes E.P., Honig L.S., Duff K.E., Small S.A., Wenk M.R., Shui G., Di Paolo G.J. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. Biol. Chem. 287: 2678–2688. 2012. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274142
- 158. Suzuki K.G.N., Ando H., Komura N., Fujiwara T., Kiso M., Kusumi A. Unraveling of Lipid Raft Organization in Cell Plasma Membranes by Single-Molecule Imaging of Ganglioside Probes. Adv. Exp. Med. Biol. 1104: 41–58. 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2158-0 3
- 159. Matsuzaki K. Aβ-ganglioside interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 3:183233. 2020. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183233
- 160. Lemkul J.A., Bevan D.R. Lipid composition influences the release of Alzheimer's amyloid β-peptide from membranes. Protein Sci. 20: 1530–1545. 2011. https://doi.org/10.1002/pro.678
- 161. Kakio A., Nishimoto S.I., Yanagisawa K., Kozutsumi Y., Matsuzaki K. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid β-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. J. Biol. Chem. 276: 24985–24990. 2001. https://doi.org/10.1074/jbc.M100252200
- 162. Zha Q., Ruan Y., Hartmann T., Beyreuther K., Zhang D. GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. Mol. Psychiatry. 9: 946–952. 2004. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001509
- 163. Peters I., Igbavboa U., Schütt T., Haidari S., Hartig U., Rosello X., Böttner S., Copanaki E., Deller T., Kögel D., Wood W.G., Müller W.E., Eckert G.P. The interaction of β-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. Biochim. Biophys. Acta. 1788: 964–972. 2009.

https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.01.012

- 164. Yamamoto N., Igbabvoa U., Shimada Y., Ohno-Iwashita Y., Kobayashi M., Wood W.G., Fujita S.C., Yanagisawa K. Accelerated Aβ aggregation in the presence of GM1-ganglioside-accumulated synaptosomes of aged apoE4-knock-in mouse brain. FEBS Lett. 569: 135–139. 2004. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.037
- 165. Grimm M.O., Zinser E.G., Grösgen S., Hundsdörfer B., Rothhaar T.L., Burg V.K., Kaestner L., Bayer T.A., Lipp P., Müller U., Grimm H.S., Hartmann T. Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. PLoS One. 7: e34095. 2012. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034095
- 166. Svennerholm L., Bråne G., Karlsson I., Lekman A., Ramström I., Wikkelsö C. Alzheimer disease effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 14: 128–136. 2002. https://doi.org/10.1159/000063604
- https://doi.org/10.1159/000063604
 167. Dai R., Zhang S., Duan W., Wei R., Chen H., Cai W., Yang L., Wang Q. Enhanced autophagy contributes to protective effects of GM1 ganglioside against Aβ1-42-induced neurotoxicity

and cognitive deficits. Neurochem. Res. 42: 2417–2426. 2017. https://doi.org/10.1007/s11064-017-2266-0

- 168. Yuyama K., Sun H., Sakai S., Mitsutake S., Okada M., Tahara H., Furukawa J., Fujitani N., Shinohara Y., Igarashi Y. Decreased amyloid-β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. J. Biol. Chem. 289: 24488–24498. 2014. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577213
- 169. Matsuoka Y., Saito M., LaFrancois J., Saito M., Gaynor K., Olm V., Wang L., Casey E., Lu Y., Shiratori C., Lemere C., Duff K. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to β-amyloid. J. Neurosci. 23: 29–33. 2003. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00029.2003
- 170. Goodfellow J.A., Willison H.J. Gangliosides and Autoimmune Peripheral Nerve Diseases. Prog Mol Biol Transl Sci. 156: 355–382. 2018. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.12.010
- 171. Magistretti P.J., Geisler F.H., Schneider J.S., Li P.A., Fiumelli H., Sipione S. Gangliosides: Treatment Avenues in Neurodegenerative Disease. Front Neurol. 10: 859. 2019. https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00859
- 172. Allinquant B., Clamagirand C., Potier M.C. Role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 17: 319–323. 2014. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000069
- 173. Eckert G.P., Hooff G.P., Strandjord D.M., Igbavboa U., Volmer D.A., Müller W.E., Wood W.G. Regulation of the brain isoprenoids farnesyl- and geranylgeranylpyrophosphate is altered in male Alzheimer patients. Neurobiol. Dis. 35: 251–257. 2009. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.005
- 174. Cho Y.Y., Kwon O.H., Park M.K., Kim T.W., Chung S. Elevated cellular cholesterol in Familial Alzheimer's presenilin 1 mutation is associated with lipid raft localization of β-amyloid precursor protein. PLoS One. 14: e0210535. 2019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210535
- Leduc V., Jasmin-Belanger S., Poirier J. APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. Trends Mol. Med. 16: 469–477. 2010. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.008
- 176. *Kojro E., Gimpl G., Lammich S., Marz W., Fahrenholz F.* Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α-secretase ADAM 10. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 5815–5820. 2001.
- 177. Igbavboa U., Sun G.Y., Weisman G.A., He Y., Wood W.G. Amyloid β-protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes. Neuroscience. 162: 328–338. 2009. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.049
- 178. Brown A.M., Bevan D.R. Influence of sequence and lipid type on membrane perturbation by human and rat amyloid β-peptide (1-42). Arch. Biochem. Biophys. 614: 1–13. 2017. https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.11.006
- 179. Koudinov A.R., Koudinova N.V., Berezov T.T. Alzheimer's peptides Aβ1-40 and Aβ1-28 inhibit the plasma cholesterol esterification rate. Biochem. Mol. Biol. Int. 38: 747–752. 1996. PMID: 8728104
- 180. Grosgen S., Grimm M.O., Friess P., Hartmann T. Role of amyloid β in lipid homeostasis. Biochim. Biophys. Acta 1801: 966–974. 2010. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.002
- 181. McFarlane O., Kędziora-Kornatowska K. Cholesterol and Dementia: A Long and Complicated Relationship. Curr. Aging Sci. 2019 Sep 17. [Epub ahead of print]. https://doi.org/10.2174/1874609812666190917155400
- 182. Jeong A., Suazo K.F., Wood W.G., Distefano M.D. Isoprenoids and protein prenylation: implications in the pathogenesis and therapeutic intervention of Alzheimer's disease. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 53: 279–310. 2018. https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1458070
- 183. Petek B., Villa-Lopez M., Loera-Valencia R., Gerenu G., Winblad B., Kramberger M.G., Ismail M., Eriksdotter M., Garcia-Ptacek S. Connecting the brain cholesterol and renin-angiotensin systems: potential role of statins and RAS-modifying medications in dementia. J. Intern. Med. 284: 620–642. 2018.
- https://doi.org/10.1111/joim.12838
- 184. Zandl-Lang M., Fanaee-Danesh E., Sun Y., Albrecher N.M., Gali C.C., Čančar I., Kober A., Tam-Amersdorfer C., Stracke A., Storck S.M., Saeed A., Stefulj J., Pietrzik C.U., Wilson M.R., Björkhem I., Panzenboeck U. Regulatory effects of simvastatin and apoJ on APP processing and amyloid-β clearance in blood-brain barrier endothelial cells. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. 1863: 40–60. 2018. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.008

- 185. Shinohara M., Sato N., Kurinami H., Takeuchi D., Takeda S., Shimamura M., Yamashita T., Uchiyama Y., Rakugi H., Morishita R. Reduction of brain Aβ by fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, through increase in degradation of APP-CTFs and Aβ clearance. J. Biol. Chem. 285: 22091–22102. 2010. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102277
- 186. Eicheberrigaray R., Tan M., Dewachter I., Kuipéri C., Van der Auwera I., Wera S., Qiao L., Bank B., Nelson T.J., Kozikowski A.P., Van Leuven F., Alkon D.L. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 11141–11146. 2004. https://doi.org/10.1073/pnas.0403921101
- 187. Sun M.K., Alkon D.L. Dual effects of bryostatin-1 on spatial memory and depression. Eur. J. Pharmacol. 512: 43–51. 2005. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.028
- 188. Crestini A., Piscopo P., Iazeolla M., Albani D., Rivabene R., Forloni G., Confaloni A. Rosuvastatin and thapsigargin modulate γ-secretase gene expression and APP processing in a human neuroglioma model. J. Mol. Neurosci. 43: 461–469. 2011. https://doi.org/10.1007/s12031-010-9465-3
- 189. Huang M., Hu M., Song Q., Song H., Huang J., Gu X., Wang X., Chen J., Kang T., Feng X., Jiang D., Zheng G., Chen H., Gao X. GM1-Modified Lipoprotein-like Nanoparticle: Multifunctional Nanoplatform for the Combination Therapy of Alzheimer's Disease. ACS Nano. 9: 10801– 10816. 2015.

https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03124

- 190. Frisardi V., Panza F., Seripa D., Farooqui T., Farooqui A.A. Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: a complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. Prog. Lipid Res. 50: 313–30. 2011. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.06.001
- 191. Diaz M., Fabelo N., Martín V., Ferrer I., Gómez T., Marín R. Biophysical alterations in lipid rafts from human cerebral cortex associate with increased BACE1/AβPP interaction in early stages of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. 43: 1185–1198. 2015. https://doi.org/10.3233/JAD-141146
- 192. Grimm M.O.W., Michaelson D.M., Hartmann T. Omega-3 fatty acids, lipids, and apoE lipidation in Alzheimer's disease: a rationale for multi-nutrient dementia prevention. J. Lipid Res. 58: 2083–2101. 2017. https://doi.org/10.1194/jlr.R076331
- 193. Zhang X.L., Zhao N., Xu B., Chen X.H., Li T.J. Treadmill exercise inhibits amyloid-β generation in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice by reducing cholesterol-mediated lipid raft formation. Neuroreport. 307: 498–503. 2019. https://doi.org/10.1097/WNR.00000000001230
- 194. Zhang L., Han X., Wang X. Is the clinical lipidomics a potential goldmine? Cell. Biol. Toxicol. 34: 421–423. 2018. https://doi.org/10.1007/s10565-018-9441-1
- 195. Hardy J., Escott-Price V. Genes, pathways and risk prediction in Alzheimer's disease. Hum. Mol. Genet. 28: 235–240. 2019. https://doi.org/10.1093/hmg/ddz163

TO CITE THIS ARTICLE:

Nalivaeva N.N., Turner A.J. Lipid rafts and amyloid metabolism: role in pathogenesis of Alzheimer's disease. Russian Journal of Physiology. 106(5): 539–562.

DOI: 10.31857/S0869813920050052

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 5, с. 563-583

_ ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ _ ПО ЛИПИДОЛОГИИ

ГАНГЛИОЗИДЫ МОЗГА И ИХ ФУНКЦИИ КАК ПРИРОДНЫХ АДАПТОГЕНОВ

© 2020 г. Н. Ф. Аврова*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: avrova@iephb.ru

Поступила в редакцию 20.12.2019 г. После доработки 13.03.2020 г. Принята к публикации 13.03.2020 г.

В обзоре охарактеризованы на примере ганглиозидов некоторые аспекты исследований липидов мозга позвоночных, проводившихся под руководством академика Е.М. Крепса и продолженных его сотрудниками. Показано, что для ганглиозидов (как и фосфолипидов) мозга холодноводных стенотермных видов костистых рыб характерно более высокое содержание моно- и полиеновых жирных кислот, чем для аналогичных липидов мозга тепловодных стенотермных видов костистых рыб. Изменения состава жирных кислот липидов мозга рыб при адаптации к жизни в холодной воде (или на больших глубинах) направлены на поддержание оптимальной степени жидкостности и микрогетереогенности мембран клеток мозга. Результаты кластерного анализа данных о составе и строении углеводного компонента ганглиозидов мозга представителей различных классов эктотермных позвоночных были использованы для построения дендрограммы. Эта дендрограмма, как оказалось, является сходной с эволюционным древом, соответствующим классической таксономии позвоночных. Выдвинуто предположение, что изменения молекулярной организации ганглиозидов в процессе эволюции позвоночных вносят вклад в процессы дифференцировки мозга и усложнения его функций в ходе их филогенетического развития. Основные ганглиозиды мозга млекопитающих (GM1, GD1a, GD1b и GT1b) защищают нейроны и клетки РС12 от действия возбуждающих аминокислот, перекиси водорода, амилоидного бета-пептида, причем их защитный эффект зависит от активации тирозинкиназы Trk-рецепторов и протеинкиназ, активирующихся после этой протеинкиназы (Akt, ERK1/2, протеинкиназы С). Другой механизм защиты используется ганглиозидами GM1 и GD1a против токсического действия бактериального липополисахарида (ЛПС). Он, очевидно, связан с изменением состава липидных рафтов плазматических мембран нервных клеток благодаря включению экзогенных ганглиозидов, что приводит к предотвращению транслокации рецепторов ЛПС TLR4 в их состав. Используя водный тест Морриса, показана способность ганглиозидов, введенных крысам с диабетом 2-го типа, предотвращать нарушения пространственной памяти. Интраназальное введение ганглиозидов применено впервые, показана его высокая эффективность.

Ключевые слова: ганглиозиды, адаптогены, поли- и моноеновые жирные кислоты, нейропротекторное действие, сигнальные пути, микрогетерогенность мембран (рафты)

DOI: 10.31857/S0869813920050027

С начала 60-х годов прошлого века в лаборатории сравнительной нейрохимии (вошедшей в 2014 г. в состав лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии) большое внимание уделялось изучению липидов нервной ткани. В выборе этой темы исследования сказался дар научного предвидения, свойственный Евгению Михайловичу Крепсу, создавшему лабораторию и долгие годы возглавлявшему ее. В 60-е годы липиды клеточных мембран привлекали мало внимания исследователей, тогда как позднее стало ясно, что их изучение необходимо для понимания биохимических механизмов реализации действия гормонов, медиаторов и других физиологически активных веществ, процессов адаптации животных к изменяющимся условиям окружающей среды, патогенеза многих заболеваний. При этом клинические испытания многих липидов могут привести к разработке новых лекарственных препаратов.

В ходе проводимых исследований липидов мозга позвоночных и беспозвоночных в лаборатории сравнительной нейрохимии изучением были охвачены основные липиды нервной ткани — фосфолипиды (их диацильная и плазмалогенная формы), холестерин, его эфиры, цереброзиды, сульфатиды и ганглиозиды [1–4].

Ганглиозиды представляют собой наиболее сложные гликолипиды животных. В состав основных четырех ганглиозидов мозга (GM1, GD1a, GD1b и GT1b) входят сфингозиновые основания, жирные кислоты (образующие церамид) и углеводная цепь из четырех углеводных остатков (глюкоза–галактоза–N-ацетилгалактозамин– галактоза), представляющая собой по структуре ганглиотетраозильную цепь, к галактоза), представляющая собой по структуре ганглиотетраозильную цепь, к галактозным остаткам которой присоединены от 1 до 3 остатков сиаловых кислот. Ганглиозиды появились на относительно поздних этапах эволюции животных как компоненты мембран клеток у вторичноротых, представленных типами иглокожих и хордовых. В процессе эволюционного развития ветви позвоночных содержание ганглиозидов в мозге увеличивается по мере усложнения его организации и увеличения степени дифференцированности [4–6], при этом основным местом локализации ганглиозидов у позвоночных являются мембраны нервных клеток, особенно синаптические [7, 8].

Цель настоящего обзора заключается в том, чтобы охарактеризовать на примере изучения ганглиозидов некоторые аспекты исследования липидов мозга позвоночных, проводившихся под руководством академика Евгения Михайловича Крепса и продолженных его учениками и сотрудниками в последующие годы.

КОМПЕНСАТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ ГАНГЛИОЗИДОВ МОЗГА ПРИ ПРИРОДНЫХ АДАПТАЦИЯХ РЫБ К ТЕМПЕРАТУРЕ ВОДЫ И ДРУГИМ ИЗМЕНЯЮЩИМСЯ УСЛОВИЯМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Сравнительно-биохимическое изучение липидов биологических мембран является плодотворным подходом к пониманию их приспособительных функций, роли в биохимических механизмах адаптации эктотермных организмов к постоянно меняющимся условиям среды и функциональной активности [1–4, 9, 10]. Состав ганглиозидов и других липидов мозга был изучен под руководством Е.М. Крепса у представителей всех классов позвоночных животных, в том числе у десятков видов костистых рыб. Среди них нами были отобраны 7 холодноводных стенотермных видов костистых рыб, обитающих при температуре $0-10^{\circ}$ C (*Bathylagus antarcticus, Lampanictus australis, Antimora rostrata, Coelorhyncus* sp., *Comeporus baicalensis, Comeporus dybowski, Cottocomeporus inermis*), и 7 тепловодных стенотермных видов костистых рыб, обитающих при температуре $23-25^{\circ}$ C (*Cheilopogon exsilience, Lepophidium profundorum, Calamus* sp., *Coryphaena hippurus, Lethrinus chrisostomus, Rhomboplites aurorubens, Sphyraena picudilla*). При сравнении состава жирных кислот ганглиозидов мозга у этих двух групп рыб между ними были выявлены очень яркие различия, об-

ладающие высокой степенью достоверности [9]. Так, тепловодные виды содержали в составе ганглиозидов мозга $83.4 \pm 1.5\%$ насыщенных жирных кислот от их общего содержания, а холодноводные виды — лишь $50.9 \pm 4.9\%$ этих кислот (рис. 1), различия достоверны (p < 0.01). У тепловодных видов доля моноеновых и полиеновых жирных кислот в составе ганглиозидов мозга составляла лишь 16.1 ± 1.6% и менее 1% от общего их содержания соответственно, а у холодноводных видов – $35.3 \pm 3.6\%$ и $13.8 \pm 4.0\%$ от общего содержания жирных кислот соответственно (различия достоверны, p < 0.01). Наиболее высокое содержание моноеновых и полиеновых жирных кислот в составе ганглиозидов мозга оказалось характерным для рыб, обитающих при низких температурах воды и на больших глубинах. Аналогичные различия в составе жирных кислот оказались характерными (рис. 1) и для отдельных фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина). При адаптации к температуре окружающей среды наиболее выраженные изменения были обнаружены в содержании жирных кислот 18:0, 22:1, 24:1 and 22:6 ω 3 в составе фосфолипидов и ганглиозидов мозга рыб, эти кислоты можно назвать "инструментами адаптации" [4, 9]. Интересно отметить, что изменения состава жирных кислот ганглиозидов при природных адаптациях костистых рыб к температуре обитания оказались более выраженными, чем аналогичные изменения в составе жирных кислот фосфолипидов мозга у тех же видов рыб (рис. 1). Возможно, это связано с тем, что основным местом локализации ганглиозидов в мозгу позвоночных являются наружные мембраны нервных клеток, в том числе синаптические, сохранение функциональной активности которых на оптимальном уровне особенно важно для организма [6-8].

У хрящевых и ганоидных рыб также наблюдаются адаптивные изменения в составе ганглиозидов мозга, обуславливающие различия в составе жирных кислот этих липидов у тепловодных и холодноводных видов. Но у этих рыб они происходят, главным образом, за счет изменения доли насыщенных и моноеновых жирных кислот. Высокое содержание полиеновых жирных кислот в составе ганглиозидов мозга оказалось характерным прежде всего для холодноводных и глубоководных видов костистых рыб, у которых содержание отдельных полиеновых жирных кислот, например, докозагексаеновой кислоты (22:6, n-3), достигает 20–30% от суммы жирных кислот [4, 9]. Интересно, что при этом у млекопитающих состав жирных кислот ганглиозидов обладает очень высокой степенью насыщенности и однородности. Так, на долю стеариновой кислоты в ганглиозидах мозга разных видов этих животных приходится 80-90% от суммы жирных кислот [5].

При сравнении данных по составу жирных кислот ганглиозидов мозга у 37 видов рыб (костистых, ганоидных и хрящевых) также показана зависимость их состава от температуры обитания вида. Так, выявлена прямая корреляционная зависимость степени насыщенности жирных кислот ганглиозидов мозга этих рыб от температуры окружающей среды и отрицательная корреляция содержания моноеновых и длинноцепочечных жирных кислот ганглиозидов мозга рыб и температуры обитания вида. Так, выявлена прямая корреляция содержания моноеновых и длинноцепочечных жирных кислот ганглиозидов мозга рыб и температуры обитания вида [11].

Следует отметить, что введение даже одной и тем более нескольких двойных связей в молекулу жирной кислоты намного уменьшает температуру ее плавления, вплоть до нескольких десятков градусов. По-видимому, отмеченные различия в составе жирных кислот ганглиозидов мозга разных видов рыб определяются идиоадаптациями этих животных к температуре их обитания, направленными на сохранение жидкокристаллического состояния клеточных мембран, на поддержание на оптимальном уровне их микровязкости, микрогетерогенности и состава аннулярных липидов, окружающих молекулы мембранных ферментов [4, 9].



Рис. 1. Состав жирных кислот холодноводных и тепловодных стенотермных видов костистых рыб. Приведены средние данные по составу жирных кислот ганглиозидов и фосфолипидов 7 холодноводных стенотермных видов костистых рыб, обитающих при температуре $0-10^{\circ}$ C (*Bathylagus antarcticus, Lampanictus australis, Antimora rostrata, Coelorhyncus* sp., *Comeporus baicalensis, Comeporus dybowski, Cottocomeporus inermis*), и 7 тепловодных стенотермных видов костистых рыб, обитающих при температуре $23-25^{\circ}$ C (*Cheilopogon exsilience, Lepophidium profundorum, Calamus* sp., *Coryphaena hippurus, Lethrinus chrisostomus, Rhomboplites aurorubens, Sphyraena picudilla*).

Fig. 1. Fatty acid composition of lipids from brain of warm-water and cold-water stenothermal species of teleost fishes.

The data are presented showing the average fatty acid composition of gangliosides and phospholipids from brain of 7 cold-water stenothermal teleost species living at water temperature of $0-10^{\circ}$ C (*Bathylagus antarcticus, Lampanictus australis, Antimora rostrata, Coelorhyncus* sp., *Comeporus baicalensis, Comeporus dybowski, Cottocomeporus inermis*) and of 7 warm-water stenothermal teleost species living at temperature of $23-25^{\circ}$ C (*Cheilopogon exsilience, Lepophidium profundorum, Calamus* sp., *Coryphaena hippurus, Lethrinus chrisostomus, Rhomboplites aurorubens, Sphyraena picudilla*).

РАЗЛИЧИЯ В СОСТАВЕ И СТРОЕНИИ УГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТА МОЛЕКУЛЫ ГАНГЛИОЗИДОВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗНЫХ КЛАССОВ ПОЗВОНОЧНЫХ

В отличие от данных по жирным кислотам нами не выявлено зависимости состава и строения углеводного компонента молекулы ганглиозидов мозга рыб от температуры окружающей среды или глубины обитания видов [4, 6, 11, 12]. Для объективной интерпретации большого по объему экспериментального материала оценки относительного сходства и различия видов на основании признаков молекулярной организации веществ, которые можно оценить количественно, может быть применен один из политетических методов кластерного анализа. Такого рода исследований в отношении липидов в литературе мы не встретили. Нами проведено построение дендрограммы, отражающей признаки организации состава и строения углеводного компонента ганглиозидов мозга. Его проводили, используя "невзвешенный" парно-групповой метод [11]. "Невзвешенный" означает, что каждому из признаков придавалось равное значение или "вес". В качестве 8 признаков молекулярной организации, которые можно оценить количественно, использовали содержание индивидуальных ганглиозидов (GP, GQ, GT1b, GD1b, GD1a, GD3, GM1) и суммарное содержание двух их минорных фракций (GM2 + GM3) в мозгу изученных нами по этим показателям 24 видов эктотермных позвоночных. Содержание отдельных ганглиозидов оценивалось в условных единицах. Так, содержание отдельных ганглиозидов обозначалось величиной 1, если оно составляло в мозгу данного вида 1–10%, величиной 2 – при его содержании 11–20%, 3 – при его содержании 21-40%, 4 – при его содержании, превышающем 40% от суммы ганглиозидов. Величина 0 присваивалась виду по данному показателю, если индивидуальный ганглиозид в мозгу данного вида находился в количествах менее 0.5% от суммы ганглиозидов. Таким образом, каждый из изученных видов эктотермных позвоночных был охарактеризован по 8 разным признакам, отражающим содержание разных ганглиозидов в мозгу данного вида. Дендрограммы затем генерировали с помощью программы РАUР версии 4.0b8 для компьютера Макинтош, используя невзвешенный парно-групповой метод средних оценок, оптимизированный согласно принципу максимальной экономии [11].

Кладограмма, построенная на основании кластерного анализа данных о составе углеводного компонента ганглиозидов мозга позвоночных (рис. 2), в значительной мере соответствует картине классической таксономии позвоночных. Хрящевые и ганоидные рыбы образуют отдельные кластеры и являются сестринскими ветвями друг для друга, виды этих рыб не образуют сестринские группы с какими-либо представителями костистых рыб, амфибий или пресмыкающихся. Все костистые рыбы находятся в пределах одной и той же отдельной ветви на кладограмме. Изученные рептилии образуют на дендрограмме отдельную ветвь. Но в отличие от классической систематики позвоночных два изученных вида земноводных (из отряда бесхвостых) не образуют отдельной ветви, а расположены среди представителей костистых рыб, что, по-видимому, связано с сохранением черт организации, присущих общим предкам.

На приведенной кладограмме высшие позвоночные представлены лишь рептилиями, но для птиц и млекопитающих так же, как и для рептилий, характерно низкое содержание полисиалоганглиозидов с 4 и 5 остатками сиаловых кислот в молекуле и увеличение доли моносиалоганглиозидов по сравнению с низшими позвоночными, у которых велико содержание полисиалоганглиозидов. Как известно, при выходе позвоночных на сушу происходили кардинальные изменения в организации животных и их отдельных органов, которые являются типичным примером ароморфоза [13]. Углеводный компонент молекулы гликолипидов и гликопротеинов играет существенную роль в процессах дифференцировки клеток и межклеточного



Рис. 2. Дендрограмма, показывающая относительное сходство различных видов эктотермных позвоночных в отношении молекулярной организации углеводного компонента ганглиозидов мозга. **Fig. 2.** The dendrogram of relative similarity of different vertebrate species according to the parameters of the molecular organization of the carbohydrate component of brain gangliosides.

взаимодействия, в том числе, клеточного узнавания и адгезии, особенно при развитии органов и тканей. При этом ганглиозиды с разным строением углеводной цепи могут различаться по своим функциям. Полученные данные позволяют предположить, что изменения состава и строения ганглиозидов мозга, связанные с появлением высших позвоночных, наряду со многими другими биохимическими из-
менениями внесли вклад в молекулярные основы ароморфоза при переходе позвоночных к сухопутному образу жизни и амниотическому развитию зародышей, сопровождавшемуся дифференцировкой и усложнением функций мозга.

В нашем исследовании ганоидные рыбы образуют единый кластер, при этом они входят в сестринскую группу с высокоорганизованными хрящевыми рыбами. Взгляды зоологов на систематическое положение ганоидных рыб противоречивы. Их рассматривают как один из надотрядов класса костных рыб. Но ряд зоологов, напротив, подчеркивает общность происхождения хрящевых ганоидов и хрящевых рыб [см., например, 14]. Наши результаты согласуются с данными этих ученых. Исследования гибридизации ДНК [15, 16] и изучение состава разных липидов (фосфолипидов, ганглиозидов, цереброзидов и сульфатидов) у разных видов рыб выявили существенное отличие ганоидных рыб как от костистых, так и от хрящевых рыб [4]. Совокупность данных, полученных при изучении молекулярной организации как ДНК, так и состава и структуры разных липидов мозга у отдельных видов рыб позволяет предполагать целесообразность выделения ганоидных рыб в таксон более высокого порядка, чем надотряд класса костных рыб, возможно, в отдельный подкласс или даже класс [4, 15, 16].

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ОСНОВНЫХ ГАНГЛИОЗИДОВ МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ (GM1, GD1A, GD1B И GT1B) НА ПЕРВИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ НЕРВНЫХ КЛЕТОК И КЛЕТКИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ РС12, МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Ганглиозиды мозга обладают функциями адаптогенов и у млекопитающих. Однако это не проявляется в сколько-нибудь существенных изменениях их жирнокислотного состава при содержании крыс при низкой температуре окружающей среды [17], а проявляется в повышении ганглиозидами жизнеспособности нейронов мозга и в улучшении функционального состояние организма при введении этих липидов животным с различными поражениями мозга. Основные ганглиозиды мозга обладают защитным действием на нервные клетки в культуре, чаще всего в опытах используется наиболее стабильный ганглиозид GM1. Найдено, что защитный эффект GM1 против токсического действия глутамата или бессывороточной среды на первичные культуры нервных клеток и клетки нейрональных линий зависит от активации этим ганглиозидом тирозинкиназы Trk-рецепторов [18–20]. Нами впервые показано, что ганглиозид GM1 повышает жизнеспособность нервных клеток и при других токсических воздействиях, таких как действие амилоидного бета-пептида [21], что было полтверждено затем другими авторами [22, 23]. либо при действии перекиси водорода [24], причем в этих случаях защитное действие GM1 также основано на активации им тирозинкиназы Trk-рецепторов.

Изучение защитного эффекта ганглиозидов на нервные клетки в культуре, как правило, ведется, используя их в микромолярных концентрациях (10–50 мкМ). Но в спинномозговой жидкости (СМЖ) и межклеточном пространстве мозга людей и животных присутствуют наномолярные концентрации ганглиозидов. Так, по данным Blennow и соавт. [25] у людей суммарное содержание четырех основных ганглиозидов мозга в СМЖ составляет в среднем 92 нМ. По-видимому, физиологическими концентрациями ганглиозидов *in vivo*, в которых они действуют извне на нервные клетки мозга, являются именно наномолярные концентрации.

Нам удалось впервые показать, что защитный эффект ганглиозидов GM1, GD1a, GD1b и GT1b против токсического действия глутамата на нейроны мозжечка (клетки-зерна), имеющие экспрессированные глутаматные рецепторы, хорошо выражен не только в микро, но и в наномолярной концентрации [20, 26]. Так, 100 мкМ глутамата увеличивало число погибших нейронов с $12 \pm 3\%$ до $47 \pm 4\%$ (n = 8). Но при преинкубации клеток с 10 нМ или 10 мкМ GM1 (рис. 3A и *B*) до действия глутамата число погибших нейронов уменьшалось до $24 \pm 4\%$ и до $20 \pm 5\%$ соответственно [24], о чем судили, определяя гибель нейронов по проценту клеток с пикнотическими ядрами (p < 0.01 во всех случаях). Достоверное и сходное повышение жизнеспособности клеток-зерен отмечалось также под влияние микро- и наномолярных концентраций ганглиозидов GD1a, GT1b и GD1b (рис. 3A), а также суммарных ганглиозидов мозга. Затем эти данные были подтверждены нами [20], используя биохимический лактатдегидрогеназный метод определения жизнеспособности нейронов мозжечка. При этом было показано, что защитный эффект зависит от активации ганглиозидом GM1 тирозинкиназы Trk-рецепторов и исчезает в присутствии ингибитора этого фермента K-252a (рис. 3*B*). Ганглиозиды GM1 и GD1a повышали и жизнеспособность клеток нейрональной линии PC12, подвергнутых действию перекиси водорода (рис. 3С), в этом случае в присутствии К-252а защитный эффект GM1 также не проявлялся [24]. Но при защите клеток PC12 от токсического действия перекиси водорода (рис. 3С) защитный эффект наномолярного ганглиозида GM1 был достоверно ниже, чем эффект микромолярного GM1 [24]. Эти результаты свидетельствуют о том, что ганглиозиды в наномолярных концентрациях, характерных для спинномозговой жидкости, наиболее эффективно защищают нервные клетки от эксайтотоксичности.

Активация ганглиозидом GM1 протеинкиназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK1/2), и протеинкиназы В (Akt) происходит после активации тирозинкиназы Trk-рецепторов. Так, в клетках PC12 в присутствии ингибитора тирозинкиназы Trk-рецепторов K-252a активации этих протеинкиназ под влиянием перекиси водорода и преинкубации с ганглиозидом GM1 практически не происходило [24]. Активность ERK1/2 после их аппликации в присутствии этого ингибитора оставалась крайне низкой, а активность Akt продолжала находиться на уровне контрольных значений [24]. Ранее было показано, что в срезах коры мозга активация ERK1/2 и Akt происходит после активации тирозинкиназы Trk-рецепторов [27].

Необходимо было оценить, важна ли активация ERK1/2 и Akt ганглиозидами для осуществления ими защитного эффекта на нервные клетки. Нами показано [24], что в присутствии ингибитора ERK1/2, или Akt, или протеинкиназы С защитный эффект GM1 против токсического действия перекиси водорода на клетки PC12 до-

Рис. 3. Влияние ганглиозидов GM1и GD1a и тирозинкиназы Trk-рецепторов K252a на жизнеспособность клеток-зерен мозжечка и клеток нейрональной линии PC12, подвергнутых действию токсинов. Данные представлены как среднее \pm SEM из трех параллельных определений в типичном опыте из 4– 5 поставленных опытов. Нейроны мозжечка (клетки-зерна) и клетки PC12 инкубировали с ингибитором K-252a (или без него) 30 мин, затем с ганглиозидами GM1 или GD1a или GD1b и GT1b в течение 1 ч, после чего подвергали действию 100 мкМ глутамата в течение 0.5 ч (*A* и *B*), а клетки PC12 – действию 1 мМ перекиси водорода в течение 2 ч (*C*). Жизнеспособность клеток определяли по выходу ЛДГ, %. Различия достоверны по сравнению: * – с контролем, *p* < 0.01, х – по сравнению с действием одного токсина (глутамата или перекиси водорода), *p* < 0.01, # – по сравнению с аналогичными пробами, не содержащими ингибитор K-252a (*B*) или по сравнению с действием того же ганглиозида в микромолярной концентрации.

Fig. 3. The effect of GM1 and GD1a gangliosides and of Trk receptor tyrosine kinase inhibitor K252a on the viability of cerebellar granule cells and PC12 cells exposed to toxins.

The data represent the mean \pm SEM of 3 parallel determinations in a typical experiment from 4–5 experiments made. Cerebellar neurons (granule cells) and PC12 cells were preincubated with the inhibitor K-252a (or without it) for 0.5 h, then with gangliosides GM1, GD1a, GD1b and GT1b for 1 h. Afterwards cerebella neurons were exposed to 100 μ M glutamate for 0.5 h (*A* and *B*) and PC12 cells to 1mM hydrogen peroxide for 2 h (*C*). The differences are significant as compared to: * – controls, p < 0.01, x – to the effect of toxin only (glutamate or hydrogen peroxide), p < 0.01, # – to the similar samples not containing K-252a (*B*) or to the effect of the same ganglioside in micromolar concentration (C).



Таблица 1.	Влияние	ингибитор	ов различ	ных г	іротеинкин	наз на дол	ю клеток	РС12, ги6	бель ко-
торых при	действии	перекиси	водорода (была	предотвраг	цена пре	инкубацие	ей с 10 мі	кМ ган-
глиозида (GM1 (доля	выживши	х клеток, 🖇	%)					

Table 1. Effect of various protein kinase inhibitors on the percent of the PC12 cells, whose death was prevented by preincubation with 10 μ M GM1 prior to cell exposure to hydrogen peroxide (rescue rates, %)

Rescue rates, %	Проба Sample	Rescue rates, %	Проба Sample
70.5 ± 3.8	Преинкубация только с GM1 Preincubation only with GM1	$56.7\pm4.6^*$	Преинкубация с LY294002 и GM1 Preincubation with LY294002 & GM1
76.2 ± 3.2	Преинкубация только с GM1 Preincubation only with GM1	65.7 ± 2.8*	Преинкубация с SL327 и GM1 Preincubation with SL327 & GM1
63.1 ± 4.1	Преинкубация только с GM1 Preincubation only with GM1	48.2 ± 3.4*	Преинкубация с GF108293X и GM1) Preincubation with SL327 & GM1
57.5 ± 5	Преинкубация только с GM1 Preincubation only with GM1	20.8 ± 7.4**	Преинкубация с SL327, LY294002, GF108293X и GM1 Preincubation with SL327, LY294002 & GM1&
61.2 ± 3.7	Преинкубация только с GM1 Preincubation only with GM1	12.4 ± 7.6**	Преинкубация с K252a и GM1 Preincubation with K252a &GM1

Данные представляют собой среднее \pm SEM из 6 опытов. Клетки PC12 выращивали в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки плодов коровы и 5% сыворотки лошади, 50 мкг/мл пенициллина и 50 ед./мл стрептомицина. Опыты проводили в среде DMEM, клетки PC12 за 24 ч до проведения опытов помещали

в 24-луночные планшеты по 2 × 10⁵ клеток в лунку. Клетки преинкубировали 0.5 ч с 10 мкМ LY294002 или с 10 мкМ SL327 или с 1 мкМ GF108293X или с тремя этими ингибторами или с 1мкМ K-252a. Затем клетки подвергали действию 10 мкМ ганглиозида GM1 в течение 1 ч, после чего воздействовали 1 мМ перекиси водорода в течение 2 ч. * и ** – различия достоверны по сравнению с данными (rescue rates), полученными при отсутствии в пробах ингибиторов, * – p < 0.05, ** – p < 0.01.

The data are presented as mean \pm SEM from 6 experiments. PC12 cells (ATCC) were cultivated in DMEM containing 10% fetal calf serum, 5% horse serum, 50 µg/ml of penicillin and 50 U/ml of streptomycin Assessment of PC12 cell viability was performed measuring lactate dehydrogenase (LDH) release. The experiments were per-

formed in DMEM, they started 24 h after the transfer of the cells to the 24-well plates (2×10^5 cells for a well). PC12 cells were preincubated with 10 µM SL327 or with 10 µM LY294002 or with 1 µM GF108293X or with these three inhibitors or with 1 µM K-252a (or without them) for 0.5h, then with 10 µM of GM1 ganglioside (or without it) for 1 h. Then PC12 cells were exposed to 1 mM hydrogen peroxide for 2 h. * and ** – the differences are significant as compared to the data (rescue rates) obtained in the absence of the inhibitors in the samples, * – p < 0.05, ** – p < 0.01.

стоверно снижается (табл. 1). Но лишь в присутствии ингибиторов всех трех этих протеинкиназ уменьшение защитного эффекта ганглиозида становится сопоставимым с эффектом ингибитора тирозинкиназы Trk-рецепторов (табл. 1). Полученные нами результаты согласуются с данными о том, что активация ERK1/2 ганглиозидом GM1 увеличивает жизнеспособность нейронов сетчатки после аксотомии оптического нерва [28].

Методом иммуноблоттинга показано, что ганглиозид GM1 активирует не только тирозинкиназу Trk-рецепторов, но и протеинкиназу B (Akt) и ERK1/2 в клетках PC12 [24]. Наши данные согласуются с данными других авторов, свидетельствующими о том, что защитный эффект микромолярного ганглиозида GM1 на нервные клетки и клетки нейрональных линий в культуре реализуется благодаря активации тирозинкиназы Trk-рецепторов [18, 19, 27, 28]. При модуляции активности ERK1/2 более выраженным в наших опытах оказался эффект микромолярного GM1. Перекись водорода сама активировала ERK1/2 и Akt. При этом преинкубация с 10 мкМ (рис. 4A и 4B) и в меньшей мере со 100 нМ GM1 еще больше увеличивала активность ERK1/2 в клетках PC12.

При действии на клетки PC12 ганглиозида GM1 происходит также активация Akt, о чем судили по увеличению фосфорилированной формы фермента – pAkt (Set⁴⁷³) в



Рис. 4. Увеличение активности ERK1/2 (уровня pERK1/2) в клетках PC12 под влиянием перекиси водорода и преинкубации с ганглиозидом GM1.

Клетки PC12 инкубировали с 10 мкМ ганглиозида GM1 в течение 1 ч, после чего подвергали действию 1 мМ перекиси водорода в течение 2 ч. A – представлен результат одного типичного опыта из 5–6 поставленных (иммуноблоты). B – данные представлены как среднее ± SEM из 5–6 опытов. На клетки PC12 действовали одной перекисью водорода (линия с треугольниками), либо перекисью водорода после преинкубации с 10 мкМ GM1 (линия с ромбами). Уровень pERK1/2 выражали в условных единицах, принимая за 1.0 уровень pERK в контрольных клетках в отсутствие в среде перекиси водорода и ганглиозидов. Его определяли через 0, 10, 20, 30, 45, 60, 80, 100 и 120 мин после аппликации перекиси водорода. Различия достоверны по сравнению с: * – контролем, p < 0.05, x – с эффектом одной перекиси водорода после методом попарных сравнений, p < 0.05.

Fig. 4. The increase of ERK1/2 activity (pERK1/2 level) in PC12 cells by cell exposure to hydrogen peroxide and preincubation with GM1 ganglioside.

PC12 cells were preincubated with 10 μ M GM1 for 1 h. Then the cells were exposed to 1 mM hydrogen peroxide for 2 h. *A* The results of one typical experiment from 5–6 experiments carried out is presented (immunoblots). *B* The data are presented as the mean ± SEM from 5–6 experiments. PC12 cells were exposed to hydrogen peroxide only (line with triangulars) or to hydrogen peroxide after preincubation with 10 μ M GM1 (line with rhombs). The results are expressed in arbitrary units, taking for 1.0 the pERK1/2 level in control cells in the absence of hydrogen peroxide or gangliosides in the incubation medium. The pERK1/2 levels were determined 10, 20, 30, 45, 60, 80, 100 and 120 min after the onset of the exposure of PC12 cells to hydrogen peroxide. The difference is significant by paired Student's *t* test as compared: * – to control value, *p* < 0.01, x – to the effect of hydrogen peroxide alone, *p* < 0.01.



Рис. 5. Ганглиозид GM1 увеличивает базальную активность Akt (уровень pAkt) в клетках PC12. A – представлен результат одного типичного опыта из 4 поставленных (иммуноблоты). Инкубация со 100 нМ и 10 мкМ GM1увеличивает уровень pAkt в клетках PC12 по сравнению с контролем (0 точка). Экспрессия Akt (общий уровень Akt) не меняется под влиянием инкубации клеток с ганглиозидом GM1. B – данные представлены как среднее \pm SEM из 4 опытов. На клетки PC12 действовали 100 нМ GM1(линия с квадратами) и 10 мкМ GM1 (линия с ромбами) в течение 1 ч. Уровень pAkt нормализовали по его уровню в контрольных клетках (в отсутствие GM1), который принимали за 1.0. Уровень pAkt (в условных единицах) измеряли через 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 и 60 мин после аппликации GM1. * – различия достоверны по *t* критерию Стьюдента методом попарных сравнений по сравнению с базальным уровнем pAkt в отсутствие GM1 (0 точка), *p* < 005.

Fig. 5. GM1 ganglioside increases the basal pAkt level in PC12 cells. Incubation with 100 nM and $10 \,\mu$ M GM1 increases the level of pAkt in PC12 cells as compared with control (0 min). Akt expression (total Akt level) was not changed as a result of incubation with ganglioside GM1.

A The results of one typical experiment from four experiments carried out (immunoblots) is presented.). *B* The data represent the mean \pm SEM from four experiments. PC12 cells were exposed to100 nM GM1 (line with squares) or to 10 μ M GM1 (line with rhombs) for 1 h. The pAkt levels are normalized to the level in control cells in the absence of GM1 (set as 1.0). The pAkt levels (arbitrary units) in the PC12 cells were measured 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 min after the exposure to GM1. * – the difference is significant by paired Students *t* test as compared to the basal pAkt level in the absence of GM1 (0 min), *p* < 0.05.

контрольных клетках PC12 (рис. 5*A* и 5*B*). Увеличение уровня pAkt (Ser⁴⁷³) было достоверным через 30 и 45 мин после аппликации как 100 нМ, так и 10 мкМ GM1, достоверных различий между эффектом разных концентраций GM1 в этом случае не выявлено.

ГАНГЛИОЗИД GM1 НОРМАЛИЗУЕТ СКОРОСТИ ДЫХАНИЯ КЛЕТОК РС12 И МИТОХОНДРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ МОЗГА КРЫСЫ, СНИЖЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЕЙСТВИЯ ПРООКСИДАНТА, ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ГАНГЛИОЗИДОВ

Как известно из данных литературы, активация Akt в клетках, в том числе в нервных, может приводить к активации фактора транскрипции CREB, к усилению экспрессии антиапоптотических белков митохондрий Bcl-2 и Bcl-xL и к уменьшению отношения про- к антиапоптотическим белкам [29, 30].

Наряду с этим активация ERK1/2 и Akt может приводить к инактивации проапоптотического белка митохондрий Bad, который в активной форме способен реагировать с антиапоптотическими белками Bcl-2 и Bcl-xL [31] и вызывать их инактивацию. Анти- и проапоптотические белки митохондрий являются важными регуляторами процесса апоптоза. Если отношение митохондриальных про- к антиапоптотическим белкам является высоким, митохондрии инициируют запрограммированную клеточную смерть, высвобождая AIF, цитохром с и другие проапоптотические факторы. Эти данные свидетельствуют о том, что активация протеинкиназ ERK1/2 и Akt под влиянием GM1 [24] и других ганглиозидов мозга может приводить к стабилизации митохондрий. Нами показано уменьшение отношения Bax/Bcl-2 в контрольных клетках PC12 под влиянием ганглиозида GM1.

Совместно с сотрудниками других лабораторий ИЭФБ РАН найдено [32], что преинкубация клеток PC12 с ганглиозидом GM1 предотвращает (или в значительной мере уменьшает) снижение скорости базального и разобщенного дыхания, вызванные воздействием перекиси водорода на эти клетки. Был выявлен также нормализующий эффект ганглиозидов GM1 и GD1a на дыхание изолированных из мозга крыс митохондрий [33], сниженное при действии такого прооксиданта, как *трет*-бутилгидропероксид (тБГП). Интересно, что защитный эффект этих ганглиозидов на изолированные митохондрии не проявлялся, если в среде присутствовал ингибитор тирозинкиназы Trk-рецепторов К-252а. В изолированных из мозга митохондриях присутствуют разные протеинкиназы, в том числе тирозинкиназа Trkрецепторов А и В [34, 35]. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, показывающими, что защитный эффект фактора роста нервов на изолированные из мозга митохондрии также не проявляется, если в среде присутствует ингибитор К-252а [35]. Эти данные позволяют предполагать, что защитный эффект ганглиозидов (как и фактора роста нервов) может быть в значительной мере обусловлен их действием на сигнальные системы митохондрий.

ГАНГЛИОЗИДЫ GM1 И GD1A ПРЕДОТВРАЩАЮТ ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА НЕРВНЫЕ КЛЕТКИ, НАРУШАЯ ПРОЦЕСС ТРАНСЛОКАЦИИ ЕГО РЕЦЕПТОРА TLR4 В ЛИПИДНЫЕ РАФТЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Интересные данные получены при изучении механизма защитного действия ганглиозидов [36, 37] против токсического действия бактериального липополисахарида (ЛПС), являющегося основным токсином, инициирующим менингоэнцефалиты у человека. Узнавание ЛПС клетками и внутриклеточная сигнализация, приводящая к реализации его токсического эффекта, инициируются связыванием ЛПС с рецепторами TLR4 клетки хозяина, что требует создание комплекса, состоящего из ЛПС, ЛПС-связывающего белка, CB14 (ко-рецептора ЛПС), TLR4 и адапторного белка – MD-2. Активированный TLR4 вовлекает в реализацию эффектов ЛПС ряд адапторных белков, которые связывают его с серин/треониновыми киназами. Эти ферменты, в свою очередь, опосредуют активацию фактора транскрипции NFkB, что приводит к транскрипции генов, кодирующих молекулы, связанные с воспалением и цитокины [38–40]. Для инициации внутриклеточного сигналинга ЛПС требуется транслокация TLR4 в липидные рафты плазматической мембраны клеток, которая обычно происходит при действии ЛПС на клетки [41, 42]. Рафты представляют собой специальные микродомены, расположенные в плазматической мембране, для которых характерно высокое содержание холестерина и сфинголипидов. Ганглиозиды (представляющие собой сложные гликосфиголипиды), наряду с холестерином, играют ключевую роль в образовании и стабилизации липидных рафтов, вносят существенный вклад в регуляцию процессов адгезии и воспаления [43–45].

В опытах нами использовался ЛПС из E. coli серотипа 0111:В4. Найдено, что ЛПС очень сильно снижает жизнеспособность клеток нейрональной линии РС12. Так, при его содержании в среде 0.25 мг/мл снижение жизнеспособности клеток происходит до крайне низких величин или даже до 0 [36, 37]. В то же время преинкубация с ганглиозидами GM1 и GD1a вызывает значительное увеличение жизнеспособности этих клеток, подвергнутых действию 0.25 или 0.125 мг ЛПС на мл (рис. 6A и 6B). Найдено, что защитный эффект GM1 и GD1a против действия ЛПС на клетки PC12 не проявляется в наномолярной концентрации и не зависит от модуляции этими ганглиозидами активности тирозинкиназы Trk-рецепторов (рис. 6C). Как указывалось, образование рецепторного комплекса ЛПС с его рецепторами TLR4 происходит в липидных рафтах. При этом ганглиозиды, как и холестерин, в наибольшей мере определяют структуру и функции липидных рафтов [38-45]. Николаевой и Парновой [37] было показано, что преинкубация клеток PC12 с экзогенным ганглиозидом GM1 увеличивает его включение в состав плазматических мембран клеток и практически предотвращает транслокацию рецептора TLR4 в липидные рафты этих мембран под влиянием ЛПС. А такая транслокация рецепторов TLR4 необходима для осуществления ЛПС его токсического эффекта на клетки. По-видимому, при инкубации клеток в присутствии экзогенных ганглиозидов и их включении в состав наружных мембран клеток происходит изменение состава и свойств липидных рафтов, увеличение доли ганглиозидов в них, что предотвращает транслокацию рецептора TLR4 под влиянием ЛПС в состав рафтов и заметно снижает проявление токсического действия ЛПС на клетки. Такой механизм защитного действия ганглиозидов против токсического действия ЛПС является отличным от механизма их защитного действия против длительной инкубации клеток в бессывороточной среде, действия глутамата, амилоидного бета-пептида или перекиси водорода на нервные клетки или клетки нейрональных линий, в основе которого лежит активация тирозинкиназы Trk-рецепторов.

Рис. 6. Защитный эффект ганглиозидов GD1a и GM1 против токсического действия ЛПС серотипа 0111:В4 на клетки PC12 (жизнеспособность, % от контроля).

Клетки PC12 преинкубировали с 1 мкМ ингибитора K-252a (или без него) в течение 0.5 ч, затем их инкубировали в течение 1 ч с ганглиозидами GM1 или GD1a, после чего подвергали воздействию ЛПС (0.125 или 0.25 мг/мл). Данные представлены как среднее \pm SEM из 4 определений в одном типичном опыте из 4–5 поставленных опытов. Жизнеспособность клеток определяли, используя МТТ-метод. Различия достоверны: * и ** – по сравнению с контролем, * – p < 0.05, ** – p < 0.01, x и xx– по сравнению с эффектом одного ЛПС, x – p < 0.05, xx – p < 0.01, # – по сравнению с эффектом GM1 и ЛПС.

Fig. 6. Protective effect of GD1a and GM1 gangliosides against the toxic action of lipopolysaccharide of 0111:B4 serotype (LPS) on PC12 cells (viability, % from control).

PC12 cells were preincubated with the inhibitor K-252a (or without it) for 0.5 h, then with GD1a or GM1 gangliosides for 1 h, afterwards the cells were exposed to LPS (0.125 and 0.25 mg/ml). The data are presented as the mean \pm SEM of 4 determinations in a typical experiment from 4–5 experiments made. The viability of PC12 cells was determined by MTT method and expressed as a per cent of control cell viability taken as 100%. The differences are significant as compared to: * and ** – control, * – p < 0.05, ** – p < 0.01, x and xx – the effect of LPS, x – p < 0.05, xx – p < 0.01, # – the effect of GM1 and LPS.



УЛУЧШЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ПАМЯТИ У КРЫС С НЕОНАТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ИМ ГАНГЛИОЗИДОВ МОЗГА

Нами изучена способность ганглиозидов мозга, вводимых интраназально, улучшать пространственную память у крыс с неонатальной моделью сахарного диабета 2-го типа (СД2), в опытах использовали расширенную версию водного теста Морриса [46]. Интересно отметить, что интраназальное введение ганглиозидов было применено нами впервые и показало свою высокую эффективность.

В отношении инсулина в последние годы получены данные, показывающие эффективность его интраназального введения для нормализации когнитивных функции мозга при патологии центральной нервной системы человека и животных, в том числе при диабете 1-го (СД1) и 2-го типа (СД2) [46-48]. Для СД2 характерна гиперинсулинемия в крови и введение инсулина в кровь не рекомендуется. Но при интраназальном введении инсулин попадает непосредственно в мозг [49], а в мозге (в том числе в гиппокампе и гипоталамусе, важнейших мишенях инсулина в ЦНС) содержание этого гормона и активность инсулиновой сигнальной системы при СД2 заметно снижены [50]. Поэтому, очевидно, интраназальное введение инсулина, непосредственно поступающего в мозг, компенсирует его дефицит в мозге при СД2. Забегая вперед, можно указать, что интраназальное введение ганглиозидов, впервые примененное нами в том исследовании, о котором пойдет речь в этом разделе [46] показало свою эффективность. Поступление соединений непосредственно в мозг, минуя гематоэнцефалический барьер [49], причем путем, который не является травматичным, имеет большие преимущества, если целью испытаний является предотвращение нарушений когнитивных функций.

Анализ данных литературы показывает, что введение ганглиозидов улучшает обменные процессы и функциональное состояние мозга у животных с нейродегенеративными, ишемическими и другими поражениями мозга [см., например, 51–54]. При этом чаще всего вводят моносиалоанглиозид GM1. Однако имеются сведения, что другие основные ганглиозиды GD1a, GD1b и GT1b и суммарные ганглиозиды мозга обладают не менее выраженным нейропротекторным эффектом [26, 51–54]. Есть примеры благоприятного эффекта ганглиозидов мозга на когнитивные функции человека в условиях клиники [55]. Пищевые добавки в виде комплексных липидов молока, включающих ганглиозиды и фосфолипиды, на ранних стадиях развития улучшают процессы обучения и памяти у животных и коэффициент интеллектуального развития у детей [56, 57]. Но способность ганглиозидов улучшать когнитивные функции при диабете пока не исследована. Представляло интерес изучить влияние ганглиозидов на пространственную память, нарушенную у крыс с неонатальным СД2.

Неонатальный СД2 вызывали однократным введением 5-дневным крысятамсамцам линии Вистар стрептозотоцина (Sigma, США) в дозе 80 мг на кг массы тела. Через 4 мес., когда у крыс развивались признаки СД2, начинали их лечение интраназально вводимыми ганглиозидами (6 мг/кг), которое проводили в течение недели до опытов и во время тестирования в водном тесте Морриса в течение двух недель. Крыса, плавая в бассейне, отыскивала скрытую платформу. Опыты состояли из обучения (5 дней) и переобучения (5 дней), ежедневно каждая крыса совершала по 4 попытки. Поведение животных в водном тесте Морриса регистрировали с помощью веб-камеры. Для каждой серии опытов рассчитывали среднее время нахождения животными из разных групп платформы и величину площади под кривой "время поиска–продолжительность обучения" (AUC – area under curve). Данные тестирований обрабатывались в программе ANYmaze.

Ганглиозиды выделяли из серого вещества мозга быка и подвергали многоступенчатой очистке, как это описано нами ранее [26], после диализа пробы упаривали путем лиофильной сушки. С помощью тонкослойной хроматографии высокого разрешения было показано отсутствие в препарате ганглиозидов мозга примесей фосфолипидов и других гликолипидов, а также белков.

Развитие СД2 у крыс оценивали в глюкозотолерантном тесте, для чего им вводили раствор глюкозы (внутрибрюшинно, 2 г глюкозы/кг) и в течение 120 мин измеряли концентрацию глюкозы в цельной крови, полученной из хвостовой вены, с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания). При проведении этого теста у крыс с СД2 уровень глюкозы в крови был достоверно выше, чем у контрольных животных, через 30, 60 и 120 мин после введения глюкозы (p < 0.02), что свидетельствует о нарушении толерантности к глюкозе и является характерным признаком СД2. Ганглиозиды существенно не влияли на толерантность диабетических крыс к глюкозе.

У диабетических крыс показано нарушение формирования пространственной памяти. Найдено, что на разных сроках обучения и переобучения время поиска скрытой платформы у крыс с СД2 (группа Д) было достоверно большим, чем у контрольных крыс (группа К). Различия между этими группами наблюдали и по значениям AUC.

Интраназальное введение диабетическим крысам ганглиозидов в дозе 6 мг/кг достоверно снижало время поиска платформы животными (группа ГД) на разных днях обучения (со второго по пятый) и переобучения (с седьмого по десятый) по сравнению с крысами с СД2, не получавшими этот препарат (рис. 7). Достоверно ниже были и значения AUC у группы ГД по сравнению с группой Д при анализе данных опытов как по обучению, так и по переобучению крыс (рис. 7).

Столь выраженный эффект ганглиозидов на пространственную память обусловлен, по-видимому, их способностью модулировать сигнальные пути мозга, повышая жизнеспособность нервных клеток, благодаря активации тирозинкиназы Trk-peцепторов, протеинкиназы Akt, ERK1/2 и протеинкиназы C [24].

Необходимо подчеркнуть, что способность ганглиозидов, вводимых интраназально, оказывать эффект в сравнительно низкой дозе (6 мг/кг) продемонстрирована нами впервые. При внутрибрюшинном или подкожном введении для выявления защитного эффекта обычно используют 25–100 мг ганглиозидов мозга (или ганглиозида GM1) в расчете на кг массы тела [51, 54]. Мы надеемся, что интраназальное введение ганглиозидов, которые улучшают общее состояние организма, воздействуя именно на мозг, найдет в дальнейшем свое практическое применение. Перспективным для лечения когнитивных нарушений при СД2, очевидно, может быть использование ганглиозидов при их интраназальном введении совместно с метформином и другими препаратами, снижающими резистентность к инсулину.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по Госзаданию Министерства науки и высшего образования России – АААА-А18-118012290427-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Kreps E., Smirnov A., Chirkovskaya E., Patrikeeva M., Krasilnikova V. Phospholipids in the nervous system of molluscs. J. Neurochem. 15(4): 285–291. 1968.
- Kreps E.M., Avrova N.F., Chebotareva M.A., Chirkovskaya E.V., Levitina M.V., Pomazanskaya L.F., Pravdina N.I. Some aspects of comparative biochemistry of brain lipids in teleost and elasmobranch fish. Comp. Biochem. Physiol B. 52(2): 293–299. 1975.
- Крепс Е.М., Аврова Н.Ф., Забелинский С.А., Круглова Э.Э., Левитина М.В. О биохимической эволюции мозга позвоночных. Журн. эвол. биохим. и физиол. 13(5): 556–569. 1977. [Kreps E.M., Avrova N.F., Zabelinski? S.A., Kruglova E.E., Levitina M.V. Biochemical evolution of the vertebrate brain. Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 13(5): 556–569. 1977. (In Russ)].

- Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л. Наука. 1981. [Kreps E.M. Lipidy` kletochny`x membrane [Lipids of cell membranes]. L. Nauka. 1981. (In Russ)].
- 5. Avrova N.F. Brain ganglioside patterns of vertebrates J. Neurochem. 18(4): 667–674. 1971.
- 6. Avrova N.F. Evolutionary approach to the analysis of structure and function of gangliosides. Neurochem. Res. 10(11): 1547–1554. 1985.
- Аврова Н.Ф. О роли ганглиозидов в дифференцировке нервных клеток и синаптической передаче нервного импульса. Нейрохимия. 1: 290–302. 1982. [Avrova N.F. On the role of gangliosides in nerve cell differentiation and synaptic impulse transduction. Neirokhim. 1: 290–302 (In Russ)].
- Palmano K., Rowan A., Guillermo R., Guan J., Mc Jarrow P. The role of gangliosides in neurodevelopment. Nutrients. 7(5): 3891–3913. 2015.
- 9. Avrova N.F. The effect of natural adaptation of fishes to the environmental temperature on brain ganglioside fatty acid and long chain base composition. Comp. Biochem. Physiol. B. 78: 903–909. 1984.
- Крепс Е.М., Тюрин В.А., Горбунов Н.В., Максимович А.А. Активация перекисного окисления липидов при миграционном стрессе у горбуши: возможный механизм адаптации. Докл. АН СССР. 286(4): 1009–1012. 1986. [Kreps E.M., Tiurin V.A., Gorbunov N.V., Maksimovich A.A. Activation of lipid peroxidation during migration stress in the hump-backed salmon: possible mechanism of adaptation. Dokl. Akad. Nauk SSSR. 286(4): 1009–1012. 1986. [In Russ)].
- 11. Avrova N.F., Irwin L. New methods to analyze the variations of the brain gangliosides content, which are connected with idioadaptation and aromorphosis in vertebrates. J. Evol. Biochem. Physiol. 38(6): 689–699. 2002.
- 12. Avrova N.F. Systematic position of fish species and ganglioside composition and content. Comp. Biochem. Physiol. B. 83(3): 669–676. 1986.
- 13. Северцов А.С. Направленность эволюции. М. МГУ.1990. [Severtsov A.S. Napravlennost' e'volyucii. [The focus of evolution]. Moscow. MGU. 1990]. (In Russ)].
- Patterson C. Interrelationships of holosteans. In: "Interrelationships of fishes". Eds. Greenwood P.H., Miles R.S., Patterson C. London. Acad. Press. 1973.
- Попов Л.С., Антонов А.С., Медников Б.М., Белозерский А.Н. О естественной системе рыб: итоги применения метода гибридизации ДНК. Докл. АН СССР. 211(3): 737–739. 1973. [Popov L.S., Antonov A.S., Mednikov B.M., Belozerski? A.N. Natural system of fishes: results of application of the method of DNA hybridization. Dokl. Akad. Nauk SSSR. 211(3): 737–739. 1973. (In Russ)].
- 16. Попов Л.С., Антонов А.С. Нуклеотидный состав ДНК представителей некоторых отрядов рыб. Научн. докл. высш. школы. Биол. науки. 6: 33–39. 1974. [Popov L.S., Antonov A.S. Nucleotide makeup of the DNA in representatives of certain orders of fishes. Nauchnye Dokl. Vyss. Shkoly. Biol. Nauki. 6: 33–39. 1974. (In Russ)].
- 17. Zakharova I.O., Avrova N.F. The effect of cold stress on ganglioside fatty acid composition and ganglioside-bound sialic acid content of rat brain subcellular fractions. J. Thermal Biol. 26: 215–222. 2001.
- Ferrari G., Anderson B.L., Stephens R.M., Kaplan D.R., Greene L.A. Prevention of apoptotic neuronal death by GM1 ganglioside. Involvement of Trk neurotrophin receptors. J. Biol. Chem. 270: 3074–3080. 1995.
- Bachis A., Rabin S.J., Del Fiacco M., Mocchetti I. Gangliosides prevent excitotoxicity through activation of TrkB receptor. Neurotox. Res. 4(3): 225–234. 2002.
- Sokolova T.V., Rychkova M.P., Avrova N.F. Protective effect of GM1 ganglioside against toxic effect of glutamate on cerebellar granule cells. J. Evol. Biochem. Physiol. 50(5): 456–459. 2014.
- 21. Sokolova T.V., Zakharova I.O., Furaev V.V., Rychkova M.P., Avrova N.F. Neuroprotective effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. Neurochem. Res. 32(8): 1302–1313. 2007.
- 22. Kreutz F., Frozza R.L., Breier A.C., de Oliveira V.A., Horn A.P., Pettenuzzo L.F., Netto C.A., Salbego C.G., Trindade V.M. Amyloid-β induced toxicity involves ganglioside expression and is sensitive to GM1 neuroprotective action. Neurochem. Intern. 59(5): 648–655. 2011.
- Kreutz F., Scherer E.B., Ferreira A.G., Pereira C.L., Santana F., de Souza W., Salbego C.G., Trindade V.M. Alterations on Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities induced by amyloid-β peptide in rat brain and GM1 ganglioside neuroprotective action. Neurochem. Res. 38(11): 342–2350. 2013.
- 24. Zakharova I.O., Sokolova T.V., Vlasova Yu.A., Furaev V.V., Rychkova M.P., Avrova N.F. GM1 ganglioside activates ERK1/2 and Akt downstream of Trk tyrosine kinase and protects PC12 cells against hydrogen peroxide toxicity. Neurochem. Res. 39(11): 2262–2275. 2014.

- Blennow K., Davidsson P., Wallin A., Fredman P., Gattfries C.G., Mansson J.E., Svennerholm L. Differences in cerebrospinal fluid gangliosides between "probable" Alzheimer disease and normal aging. Aging. 4: 301–306. 1992.
- 26. Avrova N.F., Victorov I.V., Tyurin V.A., Zakharova I.O., Sokolova T.V., Andreeva N.A., Stelmaschuk EV., Tyurina Y.Y., Gonchar V.S. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. Neurochem. Res. 23(7): 945–952. 1998.
- Duchemin A.M., Ren Q., Neff N.H., Hadjiconstantinou M. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. J. Neurochem. 104: 1466–1477. 2008.
- 28. *Choi J.S., Kim J.A., Joo C.K.* Activation of MAPK and CREB by GM1 induces survival of RGCs in the retina with axotomized nerve. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44(4): 1747–1752. 2003.
- Pugazhenti S., Nesterova A., Sable C., Heidenreich K.A., Boxer L.M., Heasley L.E., Reusch J.E. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. J. Biol. Chem. 275(15): 10761–10766. 2000.
- Cheng Y., Loh Y.P., Birch N.P. Neuroserpin attenuates H₂O₂-induced oxidative stress in hippocampal neurons via AKT and BCL-2 signaling pathways. J. Mol. Neurosci. 61: 123–131, 2017.
- Vauzour D., Vafeiadou K., Rice-Evans C., Williams R. J., Spencer J. P. Activation of pro-survival Akt and ERK 1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. J. Neurochem. 103(4): 1355–1367. 2007.
- Brailovskaya I.V., Sokolova T.V., Kobylyanskii A.G., Avrova N.F. Effect of ganglioside GM1 on mitochondrial respiration and viability of PC12 cells under oxidative stress. J. Evol. Biochem. Physiol. 50(2): 174–176. 2014.
- Korotkov S.M., Sokolova T.V., Avrova N.F. Gangliosides GM1 and GD1a normalize respiratory rates of rat brain mitochondria reduced by tert-butyl hydroperoxide. J. Evol. Biochem. Physiol. 53(3): 200–207. 2017.
- 34. *Wiedemann F.R., Siemen D., Mawrin C., Horn T.F., Dietzmann K.* The neurotrophin receptor TrkB is colocalized to mitochondrial membranes. Intern. J. Biochem. & Cell Biol. 38: 610–620. 2006.
- Carito V., Pingitore A., Cione E., Perrotta I., Mancuso D., Russo A., Genchi G., Caroleo M.C. Localization of nerve growth factor (NGF) receptors in the mitochondrial compartment: characterization and putative role. Biochim. Biophys. Acta. 1820(2): 96–103. 2012.
- 36. Власова Ю.А., Баюнова Л.В., Микурова Е.И., Ляховненко Ю.Б., Николаева С.Д., Парнова Р.Г., Аврова Н.Ф. Защитный эффект ганглиозидов против токсического действия на клетки PC12 бактериального липополисахарида различных серотипов. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 99(7): 876–887. 2013. [Vlasova Iu.A., Baiunova L.V., Mikurova E.I., Liakhovnenko Iu.D., Nikolaeva S.D., Parnova R.G., Avrova N.F. Protective effect of gangliosides against the toxic action of bacterial lipopolysaccharide of various serotypes on PC12 cells. Russ. J. Physiol. 99(7): 876–887. 2013. [In Russ)].
- Nikolaeva S., Bayunova L., Sokolova T., Vlasova Y., Bachteeva V., Avrova N., Parnova R. GM1 and GD1a gangliosides modulate toxic and inflammatory effects of E. coli lipopolysaccharide by preventing TLR4 translocation into lipid rafts. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids. 1851(3): 239–47. 2015.
- Palsson-McDermott E. M., O'Neill L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology. 113(2): 153–162. 2004.
- 39. *Triantafilou M., Triantafilou K.* The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. J. Endotoxin. Res 11(1): 5–11. 2005.
- Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 42(2): 145– 151. 2008.
- Triantafilou M., Miyake K., Golenbock D.T., Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. J. Cell Sci. 115 (Part 12): 2603–2611. 2002.
- 42. Anderson R.G., Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. Science. 296(5574): 1821–1825. 2002.
- 43. Pike L.J. Lipid rafts: bringing order to chaos. J. Lipid Res. 44(4): 655–667. 2003.
- Sonnino S., Mauri L., Chigorno V., Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. Glycobiology. 17(1): 1R–13R. 2007.
- 45. Ohmi Y., Ohkawa Y., Yamauchi Y., Tajima O., Furukawa K., Furukawa K. Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. Neurochem. Res. 37(6): 1185–1191. 2012.
- 46. Sukhov I.B., Lebedeva M.F., Zakharova I.O., Derkach K.V., Bayunova L.V., Zorina I.I., Avrova N.F., Shpakov A.O. Improvement of spatial memory of rats with neonatal type 2 diabetes mellitus by intranasal administration of insulin and ganglioside. Bull. Exp. Biol. Med. 168(9): 282–287. 2019.

- Chistyakova O.V., Bondareva V.M., Shipilov V.N., Sukhov I.B., Shpakov A.O. Intranasal administration of insulin eliminates the deficit of long-term spatial memory in rats with neonatal Diabetes mellitus. Dokl. Biochem. Biophys. 440(2): 276–278. 2011.
- 48. Шпаков О., Деркач К.В. Гормональные системы мозга и сахарный диабет 2-го типа. Санкт-Петербург. Изд-во Политехн. Универ. 2015. [Shpakov A.O., Derkach K.V. Gormonal`ny`e sistemy` mozga i saxarny`j diabet 2-go tipa. Sankt-Peterburg. Izd-vo Politexn. Univer. [Brain hormornal systems and type 2 diabetes mellitus]. Saint-Petersburg. Publ. by Polytechnic University. 2015. (In Russ)].
- 49. Fan L.W., Carter K., Bhatt A., Pang Y. Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. Neural Regen. Res. 14(6): 1046–1051. 2019.
- 50. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. PLoS One. 14(3): e0213779. 2019.
- 51. Vancetto M.D., Curi L.C., Pereira C.A. Neutralization of the effect of Crotalus durissus terrificus venom by gangliosides. Braz. J. Med. Biol. Res. 28(5): 553–556. 1995.
- 52. *Pope-Coleman A., Schneider J.S.* Effects of chronic GM1 ganglioside treatment on cognitive and motor deficits in a slowly progressing model of Parkinsonism in non-human primates. Restor Neurol. Neurosci. 12(4): 255–266. 1998.
- 53. *Yamamoto H.A., Mohanan P.V.* Ganglioside GT1b and melatonin inhibit brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. Brain Res. 964(1): 100–106. 2003.
- 54. Li L., Tian J., Long M.K., Chen Y., Lu J., Zhou C., Wang T. Protection against experimental stroke by ganglioside GM1 is associated with the inhibition of autophagy. PLoS One. 11(1): e0144219. 2016.
- 55. Svennerholm L., Bråne G., Karlsson I., Lekman A., Ramström I., Wikkelsö C. Alzheimer disease effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 14(3): 128–136. 2002.
- 56. *Gurnida D.A., Rowan A.M., Idjradinata P., Muchtadi D., Sekarwana N.* Association of complex lipids containing gangliosides with cognitive development of 6-month-old infants. Early Hum. Dev. 88(8): 595–601. 2012.
- 57. *Liu H., Radlowski E.C., Conrad M.S., Li Y., Dilger R.N., Johnson R.W.* Early supplementation of phospholipids and gangliosides affects brain and cognitive development in neonatal piglets. J. Nutr. 144(12): 1903–1909. 2014.

Brain Gangliosides and Their Function as Natural Adaptogens

N. F. Avrova*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia *e-mail: avrova@iephb.ru

In this review some aspects of investigation of vertebrate brain lipids made under the guidance of academician E.M.Kreps and then by his collaborators are characterized using as an example the studies of brain gangliosides. In brain gangliosides and individual phospholipids of cold-water stenothermal teleost fishes higher content of polyenoic and monoenoic fatty acids was revealed than in the brain gangliosides and individual phospholipids of warm-water stenothermal teleosts. The changes in fatty acid composition of lipids during adaptation of fishes to living in cold water and at great water depth are directed to the maintenance of the optimal degree of brain cell membrane fluidity and microheterogeneity. The results of cluster analysis of the data on composition and structure of carbohydrate component of brain gangliosides of various ectothermic vertebrates were used to create a dendrogram. This dendrogram was found to correspond appreciably to the tree of classical taxonomy of vertebrates. The changes in molecular organization of brain gangliosides in the course of evolution of vertebrates are suggested to contribute to differentiation of brain and complication of its functions in phylogenesis. The main mammalian brain gangliosides (GM1, GD1a, GD1b и GT1b) protect nerve cells against the action of excitatory amino acids, hydrogen peroxide, amyloid β -peptide and other toxins, their protective effect depending on activation of Trk receptor tyrosine kinase and downstream protein kinases (Akt, ERK1/2, protein kinase C). Another mechanism of

protection is used by GM1 and GD1a gangiosides against bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced toxicity. It appears to be due to changes of lipid composition of plasma membrane rafts of nerve cells due to exogenous ganglioside incorporation, which prevents LPS receptors TLR4 translocation to them. Using Morris water test intranasal administration of gangliosides was shown to prevent the impairment of spatial memory in rats with 2-nd type diabetes mellitus. Intranasal administration of gangliosides was used for the first time, its high efficiency was shown.

Keywords: gangliosides, adaptogens, neuroprotection, signal transduction pathways, cell membrane microheterogeiniety (rafts)

ЦИТИРОВАТЬ:

Аврова Н.Ф. Ганглиозиды мозга и их функции как природных адаптогенов. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(5): 563–583. DOI: 10.31857/S0869813920050027

TO CITE THIS ARTICLE:

Avrova N.F. Brain Gangliosides and their Function as Natural Adaptogens. Russian Journal of Physiology. 106(5): 563–583.

DOI: 10.31857/S0869813920050027

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 5, с. 584-600

_ ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ <u>_</u> ПО ЛИПИДОЛОГИИ

GPR40/FFA1-РЕЦЕПТОРЫ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ

© 2020 г. Р. Г. Парнова*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: rimma_parnova@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.2020 г. После доработки 08.03.2020 г. Принята к публикации 17.03.2020 г.

Эндогенными лигандами GPR40/FFA1-рецепторов, принадлежащих к типу G-белок-связанных рецепторов, являются насыщенные и ненасыщенные свободные жирные кислоты средней (C6–C12) и длинной (C > 12) структуры. Самый высокий уровень экспрессии этих рецепторов обнаружен в β-клетках поджелудочной железы и нейронах различных отделов ЦНС. С момента "деорфанизации" рецепторов в 2003 г. накоплен огромный объем экспериментальных данных, касающийся функциональной роли этих рецепторов в центральной и периферической регуляции метаболического статуса организма. В настоящем обзоре обобщены современные представления о механизмах регуляции GPR40/FFA1-рецептора эндогенными и синтетическими лигандами, о системах внутриклеточной сигнальной трансдукции, активируемых при действии свободных жирных кислот. Рассматриваются механизмы GPR40/FFA1-опосредованных эффектов свободных жирных кислот на глюкозо-стимулированную секрецию инсулина В-клетками поджелудочной железы, продукцию инкретинов энтероэндокринными клетками, обеспечение нейрогенеза и нейродифференцировки. Обсуждаются достижения и перспективы использования синтетических лигандов GPR40/FFA1-рецепторов в лечении метаболических нарушений.

Ключевые слова: свободные жирные кислоты, GPR40/FFA1-рецепторы, секреция инсулина, инкретины, нейроны, нейрогенез, аллостерическая регуляция **DOI:** 10.31857/S0869813920050088

Почти 40 лет назад вышла книга "Липиды клеточных мембран", автором которой был Евгений Михайлович Крепс, академик, один из наиболее глубоких и авторитетных исследователей разнообразия природных липидов. И сегодня, по прошествии многих лет этот фундаментальный труд, беспрецедентный по объему данных и многообразию исследованных видов, сохраняет свою ценность для липидологии и сравнительной нейрохимии. Значительная часть исследований, проведенных Е.М. Крепсом и его сотрудниками, была посвящена эстерифицированным жирным кислотам, входящим в состав фосфолипидов, цереброзидов и ганглиозидов. Экспериментальный материал, полученный на более чем 130 видах рыб, обитающих при различной температуре, давлении, позволил рассматривать вариации набора жирных кислот, входящих в состав мембранных липидов, как важнейший фактор поддержания стабильности физико-химического состояния мембраны, определяющий границы возможности существования организма в экстремальных условиях [1]. К 80-м годам прошлого века уже были открыты эйкозаноиды, производные полиненасыщенных жирных кислот, и было понятно, что биологическая функция жирных кислот не исчерпывается их структурной ролью в организации биологических мембран или их значением как энергетических субстратов. Однако о регуляторных эффектах свободных жирных кислот в это время было ничего неизвестно, да и сама наука о рецепторах находилась на заре своего развития.

Между тем, открывшиеся в конце XX века возможности генетики, молекулярной биологии и биоинформатики обеспечили колоссальный прорыв в исследовании механизмов регуляции физиологических функций. Традиционно исследование алгоритма сигнального действия того или иного регулятора шло в направлении от известного лиганда к поиску его рецептора. Открывшиеся возможности анализа геномов позволили изменить вектор исследований в обратном направлении – по структурному сходству с уже идентифицированными рецепторами было выявлено огромное количество последовательностей, кодирующих рецепторы, лиганд которых был неизвестен. Такие рецепторы были названы орфановыми (от англ. orphan сирота). Они принадлежали к двум основным классам – ядерным рецепторам и рецепторам, функционально сопряженным с гетеротримерными G-белками (G-ргоtein coupled receptor, GPCR). Из общирного суперсемейства GPCR в результате расшифровки генома человека было идентифицировано около 720 генов, кодирующих эти рецепторы [2], для значительной их части лиганд был неизвестен. Орфановые рецепторы такого типа получали название GPR (G-Protein Receptor), которым присваивался соответствующий номер.

В результате масштабных исследований по "деорфанизации" GPCR-рецепторов оказалось, что лигандами четырех из них являются свободные жирные кислоты — насыщенные и ненасыщенные с разной длиной углеводородной цепи. Согласно классификации Международного союза фармакологов, после деорфанизации эти рецепторы получили название FFA1—4 [3]¹. Рецепторы GPR40 (FFA1) и GPR120 (FFA4) активируются насыщенными и ненасыщенными свободными жирными кислотами со средними (C6—C12) и длинными (C > 12) жирнокислотными цепями. Агонистами рецепторов GPR41 (FFA2) и GPR43 (FFA3) являются очень короткие жирные кислоты (C2—C4), образующиеся в процессе ферментации пищевых волокон под действием кишечной микробиоты. Дальнейшие исследования показали, что новый тип активаторов GPCR вовлечен в регуляцию множества важнейших физиологических процессов. В настоящем обзоре нет возможности даже кратко рассмотреть все достижения в этой области, поэтому внимание будет сосредоточено на самых важных и интересных результатах, касающихся одного из наиболее изученных рецепторов свободных жирных кислот, а именно GPR40.

"ДЕОРФАНИЗАЦИЯ" РЕЦЕПТОРОВ GPR40

Впервые нуклеотидная и аминокислотная последовательности этого белка, позволяющие отнести его к семейству GPCR, была определена в 1997 г. [4]. С помощью ПЦР участки геномной ДНК человека, имеющей хромосомную локализацию 19q13.1, были амплифицированы с использованием праймеров, специфичных к консервативным участкам рецептора нейроэндокринного пептида галанина человека и крысы, в результате чего были идентифицированы 4 гена, кодирующие неизвестные GPCR (GPR40, GPR41, GPR42 и GPR4) [4]. GPR40 является мембранным белком, содержащим 300 аминокислотных остатков и имеющим молекулярную массу 31.45 kDa. Проведенное через несколько лет сравнительное исследование ами-

¹ В современной литературе широко используется несколько вариантов названия этого типа рецептора – GPR40, FFA1 или GPR40/FFA1.

нокислотной последовательности этого рецептора у человека и нескольких видов млекопитающих показало очень высокую степень его консервативности [5].

Три независимые исследовательские группы практически одновременно "деорфанизировали" GPR40 [5-7]. Используя клетки СНО, в которых были экспрессированы GPR40, и стандартные приемы "деорфанизации" рецепторов, основанные на оценке уровня внутриклеточного кальция. Iton с соавторами проанализировали более 1000 предполагаемых лигандов [5]. Практически одновременно подобная работа была проведена другими авторами на рецепторах GPR40, экспрессированных в клетках HEK293 [6], и на клонах линии клеток HeLa с помощью высокоэффективной технологии введения репортерного гена [7]. Результаты совпали – селективными лигандами этих рецепторов оказались свободные жирные кислоты со средними и длинными углеводородными цепями, действующие в диапазоне микромолярных концентраций (EC₅₀ от 1 до 8 мкМ по данным [5], или EC₅₀ от 4 до 6 мкМ по данным [6]). Аффинность к рецептору не изменялась при удлинении цепи или при увеличении степени ненасыщенности молекулы. Действие жирных кислот на изменение [Ca²⁺]і было дозозависимым, опосредовалось ГТФ-связывающим белком Gα_{α/11} и критично зависело от присутствия свободной карбоксильной группы на конце молекулы, поскольку метиловые эфиры жирных кислот были неэффективны [5-7].

РОЛЬ GPR40 РЕЦЕПТОРОВ В ГЛЮКОЗО-СТИМУЛИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ИНСУЛИНА

Уже в первых работах по "деорфанизации" GPR40 были получены неожиданные результаты при изучении экспрессии мPHK этого белка в разных тканях. В исследованиях на крысах было показано, что мPHK GPR40 обнаруживается главным образом в островках Лангерганса поджелудочной железы, а гибридизация *in situ* и иммуногистохимия позволили определить точную локализацию GPR40 – панкреатические β-клетки, продуцирующие инсулин [5, 6, 8].

На линии MIN6 трансформированных панкреатических клеток мышей, обладающих всеми свойствами β-клеток, была убедительно показана способность этих агонистов стимулировать продукцию инсулина в присутствии высоких концентраций глюкозы [5], что позволило отнести этот механизм к глюкозо-стимулированной секреции инсулина. Торможение экспрессии GPR40 с помощью siRNA или антисмысловых олигонуклеотидов в клетках MIN6 резко снижало эффект жирных кислот на продукцию инсулина [5, 9, 10]. Значительное снижение потенцирующего действия жирных кислот на глюкозо-стимулированную секрецию инсулина наблюдалось у мышей-нокаутов по GPR40 [11], тогда как гиперэкспрессия GPR40 у мышей, находящихся на высокожировой диете, предотвращало развитие гипергликемии и улучшало секрецию инсулина [12]. Данные на животных моделях были подтверждены результатами анализа экспрессии мPHK GPR40 хорошо коррелировал с инсулинемическим индексом – показателем функции β-клеток [8].

Эти данные заставили по-новому рассматривать действие жирных кислот на продукцию инсулина. Долгое время считалось, что в основе стимулирующего эффекта жирных кислот на продукцию инсулина лежит исключительно их внутриклеточный окислительный катаболизм, приводящий к увеличению соотношения $AT\Phi/AД\Phi$, закрытию $AT\Phi$ -управляемых K⁺-каналов, деполяризации плазматической мембраны, открытию L-типа кальциевых каналов, что приводит к повышению уровня внутриклеточного кальция, перестройке цитоскелета, транслокации секреторных гранул к плазматической мембране и секреции находящегося в них инсулина в кровоток (см. обзор [13]). "Деорфанизация" GPR40 показала, что свободные жирные кислоты участвуют в регуляции секреции инсулина не только как энергетические субстраты, но являются также сигнальными молекулами, которые имеют на поверхности клеток собственные рецепторы. Считается, что оба механизма действия жирных кислот (как лиганды и как метаболические субстраты) функционируют независимо и вносят примерно равный вклад в потенциацию глюкозо-стимулированной секреции инсулина [14]. Это следует из того, что у мышей нокаутных по GPR40 секреция инсулина была снижена только на 50% [15].

МЕХАНИЗМ СИГНАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В РЕГУЛЯЦИИ ГЛЮКОЗО-СТИМУЛИРОВАННОЙ СЕКРЕЦИИ ИНСУЛИНА, ОПОСРЕДОВАННЫЙ АКТИВАЦИЕЙ GPR40

GPR40-опосредованное внутриклеточное действие свободных жирных кислот на глюкозо-стимулированную секрецию инсулина β-клетками поджелудочной железы связано с повышением концентрации внутриклеточного кальция за счет его мобилизации из эндоплазматического ретикулума и усиления входа в клетку через потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа [16–18]. Таким образом, конечные мишени эффекта жирных кислот, действующих как сигнальные молекулы или как энергетические субстраты, оказываются общими и связаны с повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция, вызываемом различными механизмами.

Глюкозо-стимулированная секреция инсулина в β-клетках является двухфазным процессом — быстрая и короткая фаза ответа связана с выбросом готовых гранул, находящихся в непосредственной близости от плазматической мембраны, вторая более длительная фаза — мобилизация гранул инсулина, которые находятся вдали от плазматической мембраны, и их перемещение в субапикальную область требует реорганизации цитоскелета [19, 20]. Считается, что свободные жирные кислоты стимулируют именно вторую фазу [14]. При GPR40-опосредованном действии свободных жирных кислот $\alpha_{a/11}$ -субъединица G_{a/11}-белка активирует фосфоинозитид-специфичную фосфолипазу Сβ, что приводит к гидролизу фосфатидилинозит-4,5-дифосфата с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃) и диацилглицерина [6, 9]. IP₃ усиливает выход кальция из эндоплазматического ретикулума β-клеток [21]. Введение проникающих аналогов как ІР₃, так и диацилглицерина (олеоилацил-глицерин), в клетки MIN6 потенцирует глюкозо-стимулированную секрецию инсулина [18]. Ингибиторы фосфолипазы СВ, форбол-чувствительных изоформ протеинкиназы С значительно снижали действие экзогенной жирной кислоты на секрецию инсулина [16]. Было установлено также, что при действии олеиновой кислоты на GPR40 диацилглицерин-зависимым механизмом осуществляется фосфорилирование протеинкиназы D, что, как показали авторы [22], необходимо для активации деполимеризации F-актина – перестройке цитоскелета, обеспечивающей транслокацию гранул инсулина к плазматической мембране. Ингибирование активности или экспрессии протеинкиназы D значительно снижало GPR40-опосредованное действие жирной кислоты на глюкозо-стимулированную секрецию инсулина [22]. Принципиальная схема внутриклеточных сигнальных путей активации секреции инсулина при GPR40-опосредованном действии свободных жирных кислот, а также синтетического агониста фасигликама (ТАG-875), представлена на рис. 1.

В увеличении концентрации внутриклеточного кальция при действии свободных жирных кислот задействована активация рецептора IP₃ на мембране эндоплазматического ретикулума. Нокдаун рецептора в клетках MIN6, или применение ксестоспонгина C, ингибитора IP₃ рецептора, в опытах на срезах островков Лангерганса приводили к резкому снижению эффекта жирных кислот на глюкозостимулированную секрецию инсулина [23]. Однако оказалось также, что в потен-



Рис. 1. Участие GPR40 рецепторов в регуляции секреции инсулина β-клетками поджелудочной железы при действии свободных жирных кислот и TAG-875 (фасиглифама). *Обозначения: GLUT2 – транспортер елюкозы, VTCC – потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа, PKD – фосфолипаза D, PLC – фосфолипаза C, PKC – протеинкиназа C, DAG – диацилелицерин, IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат. Цит. по [18] с разрешения издателя.*

Fig. 1. The participation of GPR40 receptor in the regulation of insulin secretion by pancreatic β -cells under the action of free fatty acids and TAG-875 (fasiglifam). Abbreviations: *GLUT2 – glucose transporter, VTCC – voltage-dependent calcium channel L-type, PKD – phospholipase D, PLC – phospholipase C, PKC – protein kinase C, DAG – diacylglycerol, IP₃ – inositol-1,4,5-trisphosphate. From [18] with publisher permission.*

цирующем действии жирных кислот на секрецию инсулина задействован депоуправляемый вход кальция (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE), который инициируется истощением резерва кальция в структурах эндоплазматического ретикулума. Регулятором SOCE является белок stromal interaction molecule 1 (STIM1), локализованный в мембране эндоплазматического ретикулума и являющийся сенсором концентрации кальция внутри ретикулума благодаря наличию специфического Са²⁺-связывающего домена. Са²⁺-зависимая транслокация STIM1 в плазматическую мембрану активирует находящиеся в ней кальциевые каналы Orail, что обеспечивает вход наружного кальция [24]. Экспрессия STIM1 обнаружена в клетках MIN6 и в панкреатических β-клетках мышей, а его транслокация в этих клетках активируется глюкозой или цАМФ [25, 26]. Оказалось, что нокдаун STIM1 или Orail в клетках MIN6 приводит к резкому снижению эффекта агониста GPR40 на глюкозо-стимулированную секрецию инсулина [23]. Критичная роль STIM1–Orai1 механизма в сигнальном пути, активируемым GPR40, была продемонстрирована и на нокаутных мышах, у которых специфично в β-клетках была выключена экспрессия STIM1 [23].

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ МОДУЛЯТОРЫ GPR40 И ИХ ПОТЕНЦИАЛ В ЛЕЧЕНИИ ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

"Деорфанизация" GPR40 тремя независимыми группами и обнаруженный эффект жирных кислот на глюкозо-стимулированную секрецию инсулина незамедлительно после публикации в 2003 г. экспериментальных данных оказались в фокусе интереса фармацевтической индустрии. Наибольших успехов в поиске и разработке фармакологических активаторов GPR40 в лечении сахарного диабета 2-го типа достигла японская фармацевтическая компания Takeda, препарат которой (ТАК-875/фасиглифам) дошел до третьей фазы клинических испытаний [27]. В отличие от многих других препаратов, используемых при диабете 2-го типа, фасиглифам и его аналоги стимулируют продукцию инсулина только при повышенном уровне глюкозы, что минимизируют риск развития гипогликемии. Однако в 2013 г. программа ТАК-875 была остановлена из-за выявленной на более широкой популяции пациентов гепатотоксичности [28], причины которой до сих пор не ясны, так как в печени GPR40 не экспрессируются [5, 6]. Несмотря на эту неудачу в настоящее время большое число синтетических агонистов GPR40 рецепторов производятся различными фармацевтическими компаниями (Eli Lilly, Connexios Life Sciences, Japan Tobacco, Piramal и др.) и многие из них находятся на стадии доклинических испытаний на животных моделях сахарного диабета 2-го типа.

Направление поиска оптимальной структуры для таких синтетических лигандов во многом было обусловлено обнаружением аллостерической модуляции активности GPR40, что свойственно огромному большинству представителей семейства GPCR [29]. Первоначально считалось, что жирные кислоты и синтетические лиганды GPR40 взаимодействуют с единственным лиганд-связывающим участком рецептора, состоящим из кластера гидрофильных аминокислотных остатков (Arg183, Asn244 и Arg258) соответственно в 5, 6 и 7 гидрофобных трансмембранных участках, с которыми и связывается карбоксильная группа жирной кислоты или синтетического лиганда [30]. Однако в экспериментах с радиоактивно-меченными лигандами было установлено наличие нескольких различных аллостерических сайтов регуляции GPR40, с которыми способны связываться синтетические лиганды [31]. Некоторые лиганды, например ТАК-875, являются одновременно и ортостерическим и аллостерическим регулятором GPR40, что, по-видимому, определяет его высокую аффинность к рецептору, в 400 раз превосходящую аффинность эндогенного лиганда – олеиновой кислоты [27]. Была установлена кристаллическая структура комплекса рецептора GPR40 и TAK-875 [32]. Как и ожидалось, карбоксильная группа лиганда действительно взаимодействует с остатками аргинина в 5-ом и 7-ом трансмембранных участках. Однако другая часть лиганда локализуется вдоль липидного бислоя и проникает внутрь между 3-им и 5-ым трансмембранными участками. Таким образом, ТАК-875 взаимодействует с неканоническим сайтом связывания через липидный бислой, а не со стороны водной фазы [32]. Считается, что именно с высокой липофильностью ТАК-875 связана его гепатотоксичность, по причине которой была остановлена третья фаза клинических испытаний препарата. В соответствии с этим, одно из направлений поиска новых инсулинотропных лигандов GPR40 связано с разработкой соединений, обладающих существенно большей полярностью, чем ТАК-875, при сохранении высокого сродства к рецептору [33].

Большинство синтетических лигандов GPR40 являются аллостерическими модуляторами, применение которых основано на множественности лиганд-связывающих участков и их функциональной селективности. Аллостерические модуляторы демонстрируют высокую степень сигнальной пластичности GPR40 и обладают преимуществами по сравнению с ортостерическими агонистами, так как могут специфично менять или стабилизировать конформационные изменения рецептора, в том числе вызванные ортостерическим агонистом, обеспечивать сопряжение с различными G-белками или даже активировать G-белок-независимый сигналинг через сопряжение с регуляторными белками β-аррестинами, что может иметь критическое значение для переключения направления сигналинга или его усиления [14]. Этот феномен получил название "лиганд-направленный сигналинг". Так, инсулинотропный эффект ТАК-875 опосредуется как через G_{q/11}-белки, так и через рекрутирование β-аррестинов 1 и 2 типов. Нокдаун β-аррестина 2 с помощью siRNA в клетках инсулиномы крысы INS832 ослаблял инсулинотропный эффект агониста [34]. Синтезированы агонисты GPR40 (АМ-1638 и АМ-5262), которые в одних и тех же клетках активируют и G_s - и $G_{q/11}$ -белки, вызывая соответственно увеличение цАМФ и IP₃, и оказывая кооперативный инсулинотропный эффект, хотя жирные кислоты, эндогенные лиганды GPR40, действуют только через G_{a/11}-белки [35]. Конструирование аллостерических агонистов позволяет воздействовать специфично на те сигнальные пути, которые необходимы для терапевтического эффекта, и избежать активации тех, которые могут приводить к нежелательным побочным воздействиям. Особенно успешным в экспериментах in vivo на моделях диабетических крыс оказалось использование комбинаций аллостерических агонистов, имеющих разные сайты связывания с рецептором, но оказывающих кооперативный инсулинотропный эффект [31]. Другой многообещающий подход – конструирование "битопических" лигандов [36]. Эти соединения имеют два фармакофора, соединенных между собой — один из них связывается с ортостерическим лиганд-связывающим карманом GPR40, другой одновременно взаимодействует с аллостерическими сайтами в молекуле рецептора. Интересно, что кооперативность обнаруживается не только при использовании комбинации синтетических лигандов. Инсулинотропный эффект ТАК-875 на модели диабетических крыс снижался в присутствии ингибитора липолиза, что приводило к снижению уровня жирных кислот в плазме [37]. Это свидетельствует в пользу того, что синтетические агонисты, по крайней мере ТАК-875, не вытесняют жирные кислоты с рецептора, а действуют кооперативно с эндогенными лиганлами.

РОЛЬ GPR40 В СЕКРЕЦИИ ИНКРЕТИНОВ

Прямое действие жирных кислот на клетки поджелудочной железы, как оказалось, не единственный механизм их участия в глюкозо-стимулированной секреции инсулина. GPR40 рецепторы экспрессируются в L, K и I клетках кишечника, секретирующих глюкагоноподобный пептид-1, глюкозо-зависимый инсулинотропный пептид и холецистокинин, участвующие в регуляции секреции инсулина [38, 39]. Так как поступление пищи в желудочно-кишечный тракт является мощным стимулом секреции инсулина, энтероэндокринные клетки экспрессируют целый спектр рецепторов, активируемых продуктами липолиза триглицеридов. Помимо GPR40, в энтероэндокринных клетках экспрессируются рецепторы свободных жирных кислот GPR120, GPR41, GPR43, а также GPR119, эндогенным лигандом которого является моноацилглицерин [40]. Роль GPR40 в секреции инкретинов значительно менее понятна, чем в отношении β-клеток поджелудочной железы, так как разные типы рецепторов работают кооперативно [40]. Однако показано, что у нокаутных по GPR40 мышей наблюдается сниженный уровень инкретинов [38, 39, 41]. Не все синтетические агонисты GPR40, которые увеличивают секрецию инсулина в β -клетках, например TAK-875 и AMG837, способны влиять на секрецию инкретинов [42]. Похоже, что этим эффектом обладают только полные агонисты. Предполагается, что с одной стороны это может быть связано со значительно более низким уровнем экспрессии рецептора в энтероэндокринных клетках, с другой стороны — с активацией различных сигнальных каскадов, стимулируемых полны-

591

ми агонистами [43]. Так, эффективные в отношении секреции инкретинов агонисты (AM1638 и AM5262) активируют как $G\alpha_{q/11}$ - и $G\alpha_s$ -опосредованные сигнальные пути, тогда как неэффективные – только $G\alpha_{q/11}$ -опосредованные.

ЭКСПРЕССИЯ GPR40 И ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В науке о липидах головной мозг занимает особое место. У всех позвоночных животных он отличается от других тканей очень высоким содержанием липидов, уступая в этом только жировой ткани, и входящих в их структуру длинноцепочечных полиеновых жирных кислот – докозагексаеновой и арахидоновой, сумма которых в мозгу человека составляет около половины всех жирных кислот. Поскольку мозг обладает очень ограниченной способностью к синтезу полиненасыщенных жирных кислот, их высокий уровень в этой ткани достигается постоянным поступлением из плазмы крови. В связи с этим не вызывает удивления тот факт, что для мозга характерен чрезвычайно высокий уровень экспрессии рецепторов GPR40. Уже в самых первых работах по "деорфанизации" рецептора было установлено, что из всех исследованных органов по уровню экспрессии GPR40 резко выделяются два – поджелудочная железа и мозг [6]. Последующие работы выявили локализацию GPR40 в нейронах различных структур мозга – гипоталамусе, гиппокампе, гипофизе, коре, хвостатом ядре, черной субстанции, продолговатом мозгу и др. [6, 44, 45]. Применяя два основных экспериментальных подхода на моделях *in vivo* – использование селективных агонистов/антагонистов рецепторов и нокаутных по GPR40 мышей, удалось убедиться в том, что эти рецепторы обеспечивают многие важнейшие эффекты жирных кислот в структурах ЦНС. В отличие от β -клеток поджелудочной железы действие свободных жирных кислот на GPR40 рецепторы в нейрональных клетках связано с изменением экспрессии генов, опосредуемой активацией Akt-киназы, ERK1/2 киназ и фосфорилированием цАМФ-активируемого транскрипционного фактора СREB [46-48].

Нейроны контролируют энергетический баланс организма, осуществляя мониторинг концентрации в плазме крови жирных кислот. Один из важнейших механизмов переработки информации о метаболическом статусе связан с процессами внутриклеточного метаболизма жирных кислот в нейрональной клетке, β-окислением, продукцией АТФ и активацией АТФ-регулируемых калиевых каналов. Вызываемое фармакологическими агентами изменение метаболизма жирных кислот в аркуатном ядре гипоталамуса (ингибирование транспортеров жирных кислот, карнитин-пальмитоил-трансферазы 1, ацил-КоА-синтазы) приводит к изменению пищевого поведения, массы тела, метаболизма, секреции инсулина [49, 50]. При церебровентрикулярном введении олеиновой кислоты, но не короткоцепочечных жирных кислот, наблюдается уменьшение потребления пищи и продукции глюкозы печенью [51]. Важнейшая роль в мониторинге уровня свободных жирных кислот в плазме крови принадлежит нейронам аркуатного ядра гипоталамуса, продуцирующим нейропептид Y и про-опиомеланокортин (POMK) [52]. Именно в этих нейронах обнаружен самый высокий уровень экспрессии GPR40 рецепторов и убедительно показано, что эффекты жирных кислот на активность нейронов и регуляцию энергетического статуса опосредуются не только продуктами их внутриклеточного метаболизма, но и поверхностными рецепторами [53, 54]. В гипоталамусе выявлена и экспрессия рецепторов GPR120, сходных с GPR40 по химической структуре лигандов, однако GPR120 локализованы, главным образом, в клетках микроглии [54]. Специфическая локализация двух типов рецепторов жирных кислот в гипоталамусе подтверждена и на клеточных культурах – в клеточной линии нейронов гипоталамуса CLU189 экспрессируется GPR40, но не GPR120, а в BV2, культуре микроглиальных клеток – только GPR120 [54].

С различиями в локализации GPR40 и GPR120 в клетках гипоталамуса связана, по всей вероятности, и их специфическая функциональная роль. Известно, что высоко-жировая диета, способствуя ожирению и диабету 2-го типа, активирует воспалительные процессы во многих тканях организма, в том числе в гипоталамусе [55] и гиппокампе [56]. Особенно остро реакции воспаления развивается в ответ на избыточное потребление насыщенных жирных кислот [57], таких как пальмитиновая 16:0, стеариновая 18:0 и арахиновая 20:0. В гипоталамусе активация провоспалительных генов наблюдается уже спустя несколько часов после потребления высокожировой пищи [58], а более продолжительная высокожировая диета приводит к стрессу эндоплазматического ретикулума [59], повреждению митохондрий и апоптозу нейрональных клеток [60]. Как было показано, воспалительные эффекты насыщенных жирных кислот связаны с активацией TLR4-опосредованных сигнальных путей, в которых задействованы "классические" провоспалительные киназы и транскрипционные факторы [61, 62]. В отличие от насыщенных, полиненасыщенные жирные кислоты обладают мощным нейропротективным действием, которое было продемонстрировано в многочисленных работах *in vivo* и *in vitro*. Добавление в диету мышей с ожирением полиненасыщенных жирных кислот или их непосредственное введение в гипоталамус уменьшает течение воспалительных процессов и улучшает метаболические показатели [63]. Считается, что оба типа рецепторов свободных жирных кислот (GPR40 и GPR120) задействованы в противовоспалительных эффектах в гипоталамусе, однако только агонист GPR40 вызывал увеличение экспрессии про-опиомеланокортина, снижение массы тела и потребления калорий [54]. Это свидетельствует о том, что мониторинг уровня свободных жирных кислот в плазме крови и регуляция энергетического статуса, осуществляемые NPY- и РОМК-ергическими нейронами, обеспечивается, по крайней мере, частично, рецепторами GPR40.

Метаболические нарушения находятся в тесной этиологической связи с когнитивными расстройствами и психическими заболеваниями. Многочисленная статистика свидетельствует о том, что ожирение и метаболический синдром, обусловленные в том числе распространением "западной диеты", содержащей в большом количестве насыщенные жиры и бедной ω3 жирными кислотами, способствуют ухудшению когнитивных функций и развитию деменции [64, 65]. Хотя механизмы этой взаимосвязи до сих пор не выяснены, GPR40-опосредуемый сигналинг привлекает большое внимание нейрофармакологов, а рецепторы GPR40 рассматриваются как мишени для терапии когнитивных расстройств.

Так, на мышиных моделях диабета 2-го типа (высокожировая диета и линия *db/db*) показано, что у этих животных по сравнению со здоровыми уменьшена экспрессия рецепторов GPR40 в гиппокампе и снижены когнитивные способности [48]. Важным связующим звеном этих патологических процессов оказался нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), который помимо того, что является одним из важнейших ростовых факторов в ЦНС и участвует CREB-зависимым механизмом в формировании памяти, принимает участие в контроле энергетического баланса [66, 67]. У диабетических мышей экспрессия BDNF значительно снижена [48]. Показано, что негативное действие высококалорийной диеты на пространственное обучение мышей вызывается снижением экспрессии BDNF в гиппокампе [68]. Торможение экспрессии BDNF в гипоталамусе вызывает гиперфагию и ожирение у мышей, свидетельствуя о том, что BDNF также действует как анорексигенная сигнальная молекула [69]. На первичной культуре кортикальных нейронов с помощью различных подходов показано, что докозагексаеновая кислота усиливает экспрессию BDNF через рецепторы GPR40, активируя ERK1/2-

и МАРК-опосредуемые сигнальные каскады. Добавление в рацион диабетических мышей докозагексаеновой кислоты или GW9508, синтетического агониста GPR40, приводило к нормализации уровня экспрессии BDNF и улучшению когнитивных функций, тогда как интрацеребровентрикулярное введение диабетическим мышам антагониста GPR40, GW1100, ослабляло полезные эффекты жирной кислоты на улучшение когнитивных функций и экспрессию BDNF в гиппокампе [48]. На мышиных моделях болезни Альцгеймера внутримозговое введение GW9508, агониста GPR40, улучшало память и способность животных к обучению. Активация рецепторов приводила к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB, значительному увеличению продукции различных нейротрофических факторов в нейронах гиппокампа и стимулировала нейрогенез [47].

Полиненасыщенные жирные кислоты, прежде всего ω 3 ряда, играют важнейшую роль в обеспечении нейрогенеза и функционирования нервных клеток на всех стадиях онтогенеза, в процессах формирования памяти, обучения, психического поведения. Дефицит поступления полиненасыщенных жирных кислот в организм приводит к серьезным нарушениям работы ЦНС, которые являются причинами нейродегенерации и психических нарушений [70–72]. Хотя механизм этого остается не до конца выясненным, имеются данные о вовлечении GPR40 в регуляцию широкого круга психических процессов. Так, самки мышей, выращенные на сбалансированной жировой диете, но нокаутные по GPR40, демонстрируют нарушения эмоционального статуса, социального поведения, локомоторной активности, ухаживания за потомством [73].

Показано, что GPR40-зависимый сигнальный путь, активируемый докозагексаеновой кислотой, играет важную роль в процессах нейрогенеза и нейродифференцировки в нейрогенных нишах, поддерживая регенеративный потенциал головного мозга [44]. В культуре нейральных стволовых клеток крысы докозагексаеновая кислота, действуя через активацию GPR40, стимулировала дифференцировку нейронов и рост аксонов. Эффект жирной кислоты в этом типе клеток опосредовался классическим для данного типа рецепторов механизмом — активацией фосфолипазы Сβ и мобилизацией внутриклеточного кальция [74].

Имеются данные о том, что GPR40-рецепторы играют важную роль в процессах модуляции ноцицепции. Докозагексаеновая кислота, а также GW9508, синтетический агонист GPR40, обладают антиноцицептивным эффектом: они тормозят передачу болевых стимулов, увеличивая продукцию β -эндорфина в аркуатном ядре гипоталамуса и активируя опиатную систему [45]. На мышах нокаутных по GPR40 было показано, что дисфункция этой рецепторной системы приводит к развитию хронической боли [75].

РОЛЬ GPR40 РЕЦЕПТОРОВ В ЛИПОТОКСИЧНОСТИ

Многочисленные результаты четко указывают на то, что повышенные уровни свободных жирных кислот, вызванные избыточным количеством жировой ткани – если не первая, то, по крайней мере, одна из главных причин возникновения инсулиновой резистентности. Большинство пациентов, страдающих ожирением, метаболическим синдромом и диабетом 2-го типа, имеют повышенные уровни свободных жирных кислот, что приводит к инсулиновой резистентности многих тканей. Длительная инкубация β -клеток поджелудочной железы со свободными жирными кислотами приводит к потере жизнеспособности β -клеток и снижению глюкозо-стимулированной продукции инсулина [76, 77]. Этот же эффект наблюдается *in vivo* при длительном поддержании высокого уровня жирных кислот в плазме крови [78, 79]. Наблюдаемое при этом снижение глюкозо-стимулированной продукции инсулина кислот

ных кислот, например с дисбалансом цикла Рэндла [76], продукцией активных форм кислорода [80], стрессом эндоплазматического ретикулума [81].

Хотя токсический эффект хронического действия высоких концентраций жирных кислот убедительно продемонстрирован, вопрос о вовлечении GPR40 в нарушения метаболизма, вызванные высоким содержанием жирных кислот в плазме крови, далек от окончательного решения, а экспериментальные данные противоречивы. Согласно одним данным, рецепторы GPR40 опосредуют липотоксические эффекты жирных кислот. Так, β -клетки, выделенные из мышей нокаутных по GPR40, не подвержены негативному действию жирных кислот при их долговременном воздействии, а повышенная экспрессия рецептора в этих клетках приводит к их повреждению и снижению выработки инсулина [82]. Длительная инкубация клеток линии MIN6 β с пальмитиновой кислотой вызывает стресс эндоплазматического ретикулума и апоптоз, однако, фармакологическая инактивация GPR40-рецепторов защищает клетки от негативного эффекта жирной кислоты [81].

Однако по другим данным токсические эффекты свободных жирных кислот не опосредуются рецепторами GPR40. Высокожировая диета вызывала повреждение β-клеток поджелудочной железы и тормозила глюкозо-стимулированную продукцию инсулина в одинаковой степени у мышей дикого типа и нокаутных по GPR40 [83]. Кроме того, серьезные отличия в токсических эффектах жирных кислот разной структуры противоречат их сходным величинам аффинности к рецептору [80].

Важно, что токсическое действие характерно только для насыщенных жирных кислот с длиной цепи С > 14. Ненасыщенные, независимо от длины цепи и количества двойных связей, не только не токсичны для клеток, но и защищают их от повреждающего действия насыщенных жирных кислот [80, 84]. Тем не менее, токсическими эффектами могут обладать некоторые их производные. Высокоаффинными лигандами GPR40 являются жирные кислоты в *mpaнc*-конфигурации, оказывающие повреждающее действие на клетку, а также конъюгированная линолевая кислота [77, 85, 86]. Какая-то часть *mpaнc*-изомеров может поступать в организм с пищей, однако, они могут формироваться эндогенно, например, при действии активных радикалов азота, образующихся при многих патологиях. На мышиных моделях ишемии показано, что *mpaнc*-арахидоновая кислота BBISBBAC и отсутствует у мышей нокаутных по данному рецептору [86].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени идентифицировано большое разнообразие липидных медиаторов, действующих по ауто/паракринным механизмам через активацию GPCR. К ним относятся открытые значительно раньше других многочисленные производные арахидоновой и некоторых других полиненасыщенных жирных кислот – простагландины, тромбоксаны, лейкотриены. Агонистами GPCR являются продукты метаболизма фосфолипидов – эндоканнабиноиды, несколько типов лизофосфолипидов, плазмалогены, моноацилглицерин, сфингозин-1-фосфат. Образование каждого медиатора зависит от последовательности или сети тонко регулируемых метаболических реакций, протекание которых, а, следовательно, и количество медиатора, зависит от активности или уровня экспрессии компонентов соответствующих ферментных систем.

Свободные жирные кислоты как сигнальные молекулы имеют принципиальные особенности, отличающие их от других липидных медиаторов. К ним относятся стабильно высокая концентрация неэстерифицированных жирных кислот в плазме крови и интерстициальной жидкости. Их поступление в плазму крови, где они немедленно связываются с альбуминами, обеспечивается относительно простыми реакциями — липолизом триглицеридов, происходящими из жиров пищи или собственных жировых резервов. Однако за внешней простотой проступают вопросы, которые пока еще далеки от разрешения и свидетельствуют о том, что проблема более сложна, чем представляется на первый взгляд. В привычном представлении. процессу активации рецептора агонистом предшествует появление этого агониста или повышение его концентрации. Значения ЕС₅₀ для агонистов рецепторов свободных жирных кислот находятся в микромолярном диапазоне концентраций. Как может регулироваться активность рецепторов и осуществляться передача сигнала при стабильно высокой концентрации агониста, которая в нормальных условиях может составлять несколько мкМ? Авторы одной из первых работ по "деорфанизации" GPR40 полагали, что рецептор активируется жирными кислотами, не связанными с альбуминами, так как в присутствии БСА в концентрации 0,01% и выше жирные кислоты полностью теряли способность активировать рецептор и стимулировать продукцию инсулина [5]. Однако концентрация в плазме крови жирных кислот, не связанных альбуминами, находится в наномолярном диапазоне [87] и слишком низка для возможности активировать рецептор, кроме того, впоследствии в экспериментах *in vitro* было показано, что рецептор активируется комплексом жирных кислот с альбумином. Нельзя ли предположить, что в паре "лигандрецептор" состояние самого рецептора и его доступность/чувствительность к агонисту может подвергаться регулированию?

Однако, несмотря на нерешенные вопросы, убедительные данные свидетельствуют о том, что свободные жирные кислоты представляют собой отдельный класс липидных медиаторов, действующих на GPCR, активирующих различные системы сигнальной трансдукции и имеющих широкий диапазон регуляторных эффектов. GPR40 и другие рецепторы свободных жирных кислот оказались задействованными в патогенезе наиболее распространенных нарушений здоровья современного человека — метаболического синдрома, ожирения, сахарного диабета 2-го типа, нейродегенеративных патологий, когнитивных и психических расстройств. Этот факт обеспечивает устойчивый интерес к исследованиям рецепторов жирных кислот как со стороны фундаментальной науки, так и фармакологической индустрии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (тема № АААА-А18-118012290371-3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Крепс Е.М.* Липиды клеточных мембран. Ленинград. Наука. 1981. [Kreps E.M. Lipids of cellular membranes. Leningrad. Nauka. 1981. (In Russ)].
- 2. *Wise A., Jupe S.C., Rees S.* The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44: 43–66. 2004.
- 3. *Stoddart L.A, Smith N.J., Milligan G.* International Union of Pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions. Pharmacol. Rev. 60(4): 405–417. 2008.
- Sawzdargo M., George S.R., Nguyen T., Xu S., Kolakowski L.F., O'Dowd B.F. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 239(2): 543–547. 1997.
- 5. Itoh Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi M., Fujii R., Fukusumi S., Ogi K., Hosoya M., Tanaka Y., Uejima H., Tanaka H., Maruyama M., Satoh R., Okubo S., Kizawa H., Komatsu H., Matsumura F., Noguchi Y., Shinohara T., Hinuma S., Fujisawa Y., Fujino M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. Nature. 422(6928): 173–176. 2003.
- 6. Briscoe C.P., Tadayyon M., Andrews J.L., Benson W.G., Chambers J.K., Eilert M.M., Ellis C., Elshourbagy N.A., Goetz A.S., Minnick D.T., Murdock P.R., Sauls H.R. Jr., Shabon U., Spinage L.D.,

Strum. JC., Szekeres P.G., Tan K.B., Way J.M., Ignar D.M., Wilson S., Muir A.I. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. J. Biol. Chem. 278(13): 11303–11311. 2003.

- Kotarsky K., Nilsson N.E., Olde B., Owman C. Progress in methodology Improved reporter gene assays used to identify ligands acting on orphan seven-transmembrane receptors. Pharmacol. Toxicol. 93: 249–258. 2003.
- 8. Tomita T., Masuzaki H., Iwakura H., Fujikura J., Noguchi M., Tanaka T., Ebihara K., Kawamura J., Komoto I., Kawaguchi Y., Fujimoto K., Doi R., Shimada Y., Hosoda K., Imamura M., Nakao K. Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. Diabetologia. 49(5): 962–968. 2006.
- Salehi A., Flodgren E., Nilsson N.E., Jimenez-Feltstrom J., Miyazaki J., Owman C., Olde B. Free fatty acid receptor 1 (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. Cell Tissue Res. 322(2): 207–215. 2005.
- 10. Shapiro H., Shachar S., Sekler I., Hershfinkel M., Walker M.D. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. Biochem. Biophys. Res. Commun. 335: 97–104. 2005.
- 11. *Kebede M., Alquier T., Latour M.G., Semache M., Tremblay C., Poitout V.* The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion *in vivo* after high-fat feeding. Diabetes. 57(9) : 2432–2437. 2008.
- Nagasumi K., Esaki R., Iwachidow K., Yasuhara Y., Ogi K., Tanaka H., Nakata M., Yano T., Shimakawa K., Taketomi S., Takeuchi K., Odaka H., Kaisho Y. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. Diabetes. 58(5): 1067–1076. 2009.
- 13. Prentki M., Corkey B.E., Madiraju S.R.M. Lipid-associated metabolic signalling networks in pancreatic beta cell function. Diabetologia. 63(1): 10–20. 2020.
- Mancini A.D., Poitout V. GPR40 agonists for the treatment of type 2 diabetes: life after 'TAKing' a hit. Diabetes Obes. Metab. 17(7): 622–629. 2015.
- 15. Latour M.G., Alquier T., Oseid E., Tremblay C., Jetton T.L., Luo J., Lin D.C., Poitout V. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. Diabetes. 56(4): 1087–1094. 2007.
- Fujiwara K., Maekawa F., Yada T. Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 289(4): E670–677. 2005.
- Schnell S., Schaefer M., Schöfl C. Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. Mol. Cell. Endocrinol. 263(1– 2): 173–80. 2007.
- Sakuma K., Yabuki C., Maruyama M., Abiru A., Komatsu H., Negoro N., Tsujihata Y., Takeuchi K., Habata Y., Mori M. Fasiglifam (TAK-875) has dual potentiating mechanisms via Gαq-GPR40/FFAR1 signaling branches on glucose-dependent insulin secretion. Pharmacol. Res. Perspect. 4(3): e00237. 2016.
- Wang Z., Thurmond D.C. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. J. Cell. Sci. 122(Pt 7): 893–903. 2009.
- Шпаков А.О. Аденилатциклазная система в норме и при диабетической патологии. Санкт-Петербург. Изд-во Политехнического университета. 2016. [Shpakov A.O. Adenylyl cyclase system in norm and in diabetic pathology. St. Petersburg. Polytechn Univer. Publishing. 2016. (In Russ)].
- Gwiazda K.S., Yang T.L., Lin Y., Johnson J.D. Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in beta-cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296(4): E690–E701. 2009.
- Ferdaoussi M., Bergeron V., Zarrouki B., Kolic J., Cantley J., Fielitz J., Olson E.N., Prentki M., Biden T., MacDonald P.E., Poitout V. G protein-coupled receptor (GPR) 40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. Diabetologia. 55(10): 2682–2692. 2012.
- 23. Usui R., Yabe D., Fauzi M., Goto H., Botagarova A., Tokumoto. S, Tatsuoka H., Tahara Y., Kobayashi S., Manabe T., Baba Y., Kurosaki T., Herrera P.L., Ogura M., Nagashima K., Inagaki N. GPR40 activation initiates store-operated Ca²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β-cells. Sci. Rep. 9(1): 15562. 2019.
- 24. Muik M., Frischauf I., Derler I., Fahrner M., Bergsmann J., Eder. P, Schindl R., Hesch C., Polzinger B., Fritsch R., Kahr H., Madl J., Gruber H., Groschner K., Romanin C. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. J. Biol. Chem. 283(12): 8014–8022. 2008.
- 25. *Tamarina N.A., Kuznetsov A., Philipson L.H.* Reversible translocation of EYFP-tagged STIM1 is coupled to calcium influx in insulin secreting beta-cells. Cell. Calcium. 44(6): 533–44. 2008.

- 26. Tian G., Tepikin A.V., Tengholm A., Gylfe E. cAMP induces stromal interaction molecule 1 (STIM1) puncta but neither Orai1 protein clustering nor store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) in islet cells. J. Biol. Chem. 287(13): 9862–9872. 2012.
- 27. Tsujihata Y., Ito R., Suzuki M., Harada A., Negoro N., Yasuma T., Momose Y., Takeuchi K. TAK-875, an orally available G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist, enhances glucose-dependent insulin secretion and improves both postprandial and fasting hyperglycemia in type 2 diabetic rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 339(1): 228–237. 2011.
- Urano Y., Oda S., Tsuneyama K., Yokoi T. Comparative hepatic transcriptome analyses revealed possible pathogenic mechanisms of fasiglifam (TAK-875)-induced acute liver injury in mice. Chem. Biol. Interact. 296 : 185–197. 2018.
- Шпаков А.О., Деркач К.В., Бахтюков А.А. Шпакова Е.А. Сопряженные с G-белками рецепторы и их аллостерические регуляторы. Санкт-Петербург. ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2019. [Shpakov A.O., Derkach K.V., Bakhtyukov A.A. Shpakova E.A. G-protein-coupled receptors and their allosteric regulators. St. Petersburg. Polytech-Press. 2019 (In Russ)].
- Sum C.S., Tikhonova I.G., Neumann S., Engel S., Raaka B.M., Costanzi S., Gershengorn M.C. Identification of residues important for agonist recognition and activation in GPR40. J. Biol. Chem. 282(40): 29248–29255. 2007.
- Lin D.C., Guo Q., Luo J, Zhang J., Nguyen K., Chen M., Tran T., Dransfield P.J., Brown S.P., Houze J., Vimolratana M., Jiao X.Y., Wang Y., Birdsall N.J., Swaminath G. Identification and pharmacological characterization of multiple allosteric binding sites on the free fatty acid 1 receptor. Mol. Pharmacol. 82(5): 843–859. 2012.
- 32. Srivastava A., Yano J., Hirozane Y., Kefala G., Gruswitz F., Snell G., Lane W., Ivetac A., Aertgeerts K., Nguyen J., Jennings A., Okada K. High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. Nature. 513: 124–127. 2014.
- Krasavin M., Lukin A., Bagnyukova D., Zhurilo N., Golovanov A., Zozulya S., Zahanich I., Moore D., Tikhonova I.G. Polar aromatic periphery increases agonist potency of spirocyclic free fatty acid receptor (GPR40) agonists inspired by LY2881835. Eur. J.Med. Chem. 127 : 357–368. 2017.
- Mancini A.D., Bertrand G., Vivot K., Carpentier E., Tremblay C., Ghislain J., Bouvier M., Poitout V. beta-Arrestin recruitment and biased agonism at free fatty acid receptor 1. J. Biol. Chem. 290: 21131–21140. 2015.
- 35. Hauge M., Vestmar M.A., Husted A.S., Ekberg J.P., Wright M.J., Di Salvo J., Weinglass A.B., Engelstoft M.S., Madsen A.N., Lückmann M., Miller M.W., Trujillo M.E., Frimurer T.M., Holst B., Howard A.D., Schwartz T.W. GPR40 (FFAR1) Combined Gs and Gq signaling in vitro is associated with robust incretin secretagogue action ex vivo and in vivo. Mol. Metab. 4(1): 3–14. 2014.
- 36. *Lane J.R., Sexton P.M., Christopoulos A.* Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol. Sci. 34(1): 59–66. 2013.
- 37. Yabuki C., Komatsu H., Tsujihata Y., Maeda R., Ito R., Matsuda-Nagasumi K., Sakuma K., Miyawaki K., Kikuchi N., Takeuchi K., Habata Y., Mori M. A novel antidiabetic drug, fasiglifam/TAK-875, acts as an ago-allosteric modulator of FFAR1. PLoS One. 8(10):e76280. 2013.
- Edfalk S., Steneberg P., Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. Diabetes. 57(9): 2280–2287. 2008.
- Liou A.P., Lu X., Sei Y., Zhao X., Pechhold S., Carrero R.J., Raybould H.E., Wank S. Gastroenterology. 140(3): 903–912. 2011.
- 40. Ekberg J.H., Hauge M., Kristensen L.V., Madsen A.N., Engelstoft M.S., Husted A.S., Sichlau R., Egerod K.L., Timshel P., Kowalski T.J., Gribble F.M., Reiman F., Hansen H.S., Howard A.D., Holst B., Schwartz T.W. GPR119, a major enteroendocrine sensor of dietary triglyceride metabolites coacting in synergy with FFA1 (GPR40). Endocrinology. 157(12): 4561–4569. 2016.
- Xiong Y., Swaminath G., Cao Q., Yang L., Guo Q., Salomonis H., Lu J., Houze J.B., Dransfield P.J., Wang Y., Liu J.J., Wong S., Schwandner R., Steger F., Baribault H., Liu L., Coberly S., Miao L., Zhang, J, Lin D.C., Schwarz M. Activation of FFA1 mediates GLP-1 secretion in mice. Evidence for allosterism at FFA1. Mol. Cell. Endocrinol. 369(1–2): 119–129. 2013.
- 42. Leifke E., Naik H., Wu J., Viswanathan P., Demanno D., Kipnes M., Vakilynejad M. A multipleascending-dose study to evaluate safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a novel GPR40 agonist, TAK-875, in subjects with type 2 diabetes. Clin. Pharmacol. Ther. 92(1): 29– 39. 2012.
- 43. Luo J., Swaminath G., Brown S.P., Zhang J., Guo Q., Chen M., Nguyen K., Tran T., Miao L., Dransfield P.J., Vimolratana M., Houze J.B., Wong S., Toteva M., Shan B., Li F., Zhuang R., Lin D.C. A potent class of GPR40 full agonists engages the enteroinsular axis to promote glucose control in rodents. PLoS One. 7(10):e46300. 2012.
- 44. Ma D., Lu L., Boneva N.B., Warashina S., Kaplamadzhiev D.B., Mori Y., Nakaya M.A., Kikuchi M., Tonchev A.B., Okano H., Yamashima T. Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus. Hippocampus. 18(3): 326–333. 2008.

- 45. Nakamoto K., Nishinaka T., Matsumoto K., Kasuya F., Mankura M., Koyama Y., Tokuyama S. Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system. Brain Res. 1432: 74–83. 2012.
- 46. Zamarbide M., Etayo-Labiano I., Ricobaraza A., Martínez-Pinilla E., Aymerich M.S., Luis Lanciego J., Pérez-Mediavilla A., Franco R. GPR40 activation leads to CREB and ERK phosphorylation in primary cultures of neurons from the mouse CNS and in human neuroblastoma cells. Hippocampus. 24: 733–739. 2014.
- 47. *Khan M.Z., Zhuang X., He L.* GPR40 receptor activation leads to CREB phosphorylation and improves cognitive performance in an Alzheimer's disease mouse model. Neurobiol. Learning and Memory. 131 : 46–55. 2016.
- 48. Sona C., Kumar A., Dogra S., Kumar B.A., Umrao D., Yadav P.N. Docosa-hexaenoic acid modulates brain-derived neurotrophic factor via GPR40 in the brain and alleviates diabesity-associated learning and memory deficits in mice. Neurobiol. Dis. 118: 94–107. 2018.
- Obici S., Feng Z., Arduini A., Conti R., Rossetti L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. Nat. Med. 9: 756–761. 2003.
- 50. *Miller I., Ronnett G.V., Moran T.H., Aja S.* Anorexigenic C75 alters c-Fos in mouse hypothalamic and hindbrain subnuclei. Neuroreport. 15: 925–929. 2004.
- 51. Obici S., Feng Z., Morgan K., Stein D., Karkanias G., Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. Diabetes. 51(2): 271–275. 2002.
- Wang R., Cruciani-Guglielmacci C., Migrenne S., Magnan C., Cotero. VE., Routh V.H. Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. J. Neurophysiol. 95(3): 1491–1498. 2006.
- Nascimento L.F., Souza G.F., Morari J., Barbosa G.O., Solon C., Moura R.F., Victório S.C., Ignácio-Souza L.M., Razolli D.S., Carvalho H.F., Velloso L.A. n-3 Fatty Acids Induce Neurogenesis of Predominantly POMC-Expressing Cells in the Hypothalamus. Diabetes. 65(3): 673– 686. 2016.
- 54. Dragano N.R.V., Solon C., Ramalho A.F., de Moura R.F., Razolli D.S., Christiansen E., Azevedo C., Ulven T., Velloso L.A. Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. J. Neuroinflammation. 14(1):91. 2017.
- 55. Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. Nat. Rev. Immunol. 11(2): 98–107. 2011.
- Dutheil S., Ota K. T., Wohleb E.S., Rasmussen K., Duman R.S. High-fat diet induced anxiety and anhedonia: impact on brain homeostasis and inflammation. Neuropsychopharmacology. 41: 1874–1887. 2016.
- 57. Velloso L.A., Schwartz M.W. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. Int. J. Obes. (Lond) 35 : 1455–1465. 2011.
- Carraro R.S., Souza G.F., Solon C., Razolli D.S., Chausse B., Barbizan R., Victorio S.C., Velloso L.A. Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. Mol. Cell. Endocrinol. 460 : 238–245. 2018.
- Ozcan U., Yilmaz E., Ozcan L., Furuhashi M., Vaillancourt E., Smith R.O., Gorgun C.Z., Hotamisligil G.S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. Science. 313: 1137–1140. 2006.
- Moraes J.C., Coope A., Morari J., Cintra D.E., Roman E.A., Pauli J.R., Romanatto T., Carvalheira J.B., Oliveira A.L., Saad M.J., Velloso LA. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. PLoS One 4:e5045. 2009.
- Wang Z., Liu D., Wan F., Liu S., Zhao S., Ling E. A., Hao A. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF-κB signalling. Br. J. Nutr. 107: 229–241. 2012.
- Dorfman M.D., Thaler J.P. Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 22 : 325–330. 2015.
- 63. Cintra D.E., Ropelle E.R., Moraes J.C., Pauli J.R., Morari J., Souza C.T., Grimaldi R., Stahl M., Carvalheira J.B., Saad M.J., Vellos LA. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One. 7(1): e30571. 2012.
- 64. Panza F., Frisardi V., Seripa D., Imbimbo B.P., Sancarlo D., D'Onofrio G., Addante F., Paris F., Pilotto A., Solfrizzi V. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment, and dementia. Curr. Alzheimer Res. 8(5): 492–509. 2011.
- 65. *Pal K., Mukadam N., Petersen I., Cooper C.* Mild cognitive impairment and progression to dementia in people with diabetes, prediabetes and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol. 53(11): 1149–1160. 2018.
- 66. Passaro A., Dalla Nora E., Morieri M.L., Soavi C., Sanz. JM., Zurlo A., Fellin R., Zuliani G. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels: relationship with dementia and diabetes in the elderly population. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 70(3): 294–302. 2015.
- 67. Schwartz E., Mobbs C.V. Hypothalamic BDNF and obesity: found in translation. Nat. Med. 18(4): 496–497. 2012.

- Molteni R., Barnard R.J., Ying Z., Roberts C.K., Gómez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. Neuroscience. 112(4): 803–814. 2002.
- 69. Fox E.A., Biddinger J.E., Jones K.R., McAdams J., Worman A. Mechanism of hyperphagia contributing to obesity in brain-derived neurotrophic factor knockout mice. Neuroscience. 229: 176–199. 2013.
- Labrousse V.F., Nadjar A., Joffre C., Costes L., Aubert A., Grégoire S, Bretillon L, Layé S. Shortterm long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. PLoS One. 7(5):e36861. 2012.
- Janssen C.I., Kiliaan A.J. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. Prog. Lipid Res. 53: 1–17. 2014.
- Healy-Stoffel M., Levant B. n-3 (Omega-3) Fatty Acids: Effects on Brain Dopamine Systems and Potential Role in the Etiology and Treatment of Neuropsychiatric Disorders. CNS Neurol. Disord. Drug Targets.17(3): 216–232. 2018.
- 73. Aizawa F, Ogaki Y, Kyoya N., Nishinaka T., Nakamoto K., Kurihara T., Hirasawa A., Miyata A., Tokuyama S. The Deletion of GPR40/FFAR1 Signaling Damages Maternal Care and Emotional Function in Female Mice. Biol. Pharm. Bull. 40(8) : 1255-1259. 2017.
- 74. *Ma D., Zhang M., Larsen Cp., Xu F., Hua W., Yamashima T.* DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene. Brain Res. 1330: 1-8. 2010.
- 75. Nakamoto K., Aizawa F., Miyagi K., Yamashita T., Mankura M., Koyama Y., Kasuya F., Hirasawa A., Kurihara T., Miyata A., Tokuyama S. Dysfunctional GPR40/FFAR1 signaling exacerbates pain behavior in mice. PLoS One. 12(7): e0180610. 2017.
- Zhou Y.P., Grill V.E. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucoseinduced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. J. Clin. Invest. 93(2): 870–876. 1994.
- 77. *Yamashima T*. Dual effects of the non-esterified fatty acid receptor 'GPR40' for human health. Prog. Lipid Res. 58: 40–50. 2015.
- Sako Y., Grill V.E. A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. Endocrinology. 127(4): 1580–1589. 1990.
- Carpentier A., Mittelman S.D., Lamarche B., Bergman R.N., Giacca A., Lewis G.F. Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. Am. J. Physiol. 276(6): E1055–1066. 1999.
- Gehrmann W., Elsner M., Lenzen S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β-cells. Diabetes Obes. Metab. 12 Suppl 2: 149–158. 2010.
- Wu J., Sun P., Zhang X., Liu H., Jiang H., Zhu W., Wang H. Inhibition of GPR40 protects MIN6 β cells from palmitate-induced ER stress and apoptosis. J. Cell. Biochem. 113(4): 1152–1158. 2012.
- 82. Steneberg P., Rubins N., Bartoov-Shifman R., Walker M.D., Edlund H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. Cell Metab. 1(4): 245–258. 2005.
- Tan C.P., Feng Y., Zhou Y.P., Eiermann G.J., Petrov A., Zhou C., Lin S., Salituro G., Meinke P., Mosley R., Akiyama T.E., Einstein M., Kumar S., Berger J.P., Mills S.G., Thornberry N.A., Yang L., Howard A.D. Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. Diabetes. 57(8): 2211– 2219. 2008.
- 84. Almaguel F.G., Liu J.W., Pacheco F.J., De Leon D., Casiano C.A., De Leon M. Lipotoxicity-mediated cell dysfunction and death involve lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L activity. Brain Res. 1318: 133–143. 2010.
- Schmidt J., Liebscher K., Merten N., Grundmann M., Mielenz M., Sauerwein H., Christiansen E., Due-Hansen M.E., Ulven T., Ullrich S., Gomeza J., Drewke C., Kostenis E. Conjugated linoleic acids mediate insulin release through islet G protein-coupled receptor FFA1/GPR40. J. Biol. Chem. 286(14): 11890–11894. 2011.
- Honoré J.C., Kooli A., Hamel D., Alquier T., Rivera J.C., Quiniou C., Hou X., Kermorvant-Duchemin E., Hardy P., Poitout V., Chemtob S. Fatty acid receptor Gpr40 mediates neuromicrovascular degeneration induced by transarachidonic acids in rodents. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 33(5): 954–961. 2013.
- Richieri G.V., Kleinfeld A.M. Unbound free fatty acid levels in human serum. J. Lipid Res. 36(2): 229–240. 1995.

Free Fatty Acid Receptor GPR40/FFA1 and Its Functional Role

R. G. Parnova*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia *e-mail: rimma parnova@mail.ru

The endogenous ligands of GPR40/FFA1 receptor, a member of G protein-coupled receptor family, are saturated and unsaturated free fatty acids of medium (C6–C12) and long (C >12) chain. The highest level of GPR40/FFA1 expression was found in pancreatic β -cells and in neurons in different brain parts. Since its "deorphanization" in 2003, a large amount of experimental data has been accumulated regarding the functional role of GPR40/FFA1 in the central and peripheral regulation of the metabolic status of the organism. The present review provides a comprehensive overview of the mechanisms of GPR40 activation by endogenous and synthetic ligands, and of the intracellular signaling pathways coupled to GPR40/FFA1. The review specifically focuses on GPR40/FFA1-mediated activation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells, production of incretins by enteroendocrine cells, and also on stimulation of neurogenesis and neurodifferentiation in CNS. New prospects for the treatment of metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes, with synthetic GPR40/FFA1 agonists are considered.

Keywords: free fatty acids, receptor GPR40/FFA1, insulin secretion, incretins, neurons, neurogenesis, allosteric regulation

ЦИТИРОВАТЬ:

Парнова Р.Г. GPR40/FFA1-рецепторы свободных жирных кислот и их функциональная роль. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(5): 584–600. DOI: 10.31857/S0869813920050088

TO CITE THIS ARTICLE:

Parnova R.G. Free Fatty Acid Receptor GPR40/FFA1 and Its Functional Role. Russian Journal of Physiology. 106(5): 584–600.

DOI: 10.31857/S0869813920050088

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 5, с. 601-621

_ ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ _ ПО ЛИПИДОЛОГИИ

НЕЗАМЕНИМЫЕ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ В ФИЗИОЛОГИИ И МЕТАБОЛИЗМЕ РЫБ И ЧЕЛОВЕКА: ЗНАЧЕНИЕ, ПОТРЕБНОСТИ, ИСТОЧНИКИ

© 2020 г. О. Н. Махутова^{1, 2, *}, М. И. Гладышев^{1, 2}

¹Институт биофизики Красноярского научного центра СО РАН, Красноярск, Россия ²Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия *E-mail: makhutova@ibp.krasn.ru

> Поступила в редакцию 17.01.2020 г. После доработки 06.03.2020 г. Принята к публикации 08.03.2020 г.

Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) семейства омега-3 (ω3 или n-3), а именно эйкозапентаеновая (ЭПК, 20:5n-3) и докозагексаеновая (ДГК, 22:6п-3), признаны веществами высокой физиологической ценности для животных разных таксономических групп, включая человека. n-3 ПНЖК обеспечивают нормальное функционирование сердечно-сосудистой и нервной систем, иммунитета и метаболизма в целом, а их применение носит профилактический характер. Лекарственные свойства этих веществ неоднозначны и активно обсуждаются в литературе. Основным источником ЭПК и ДГК для человека является рыба. Содержание п-3 ПНЖК в рыбе зависит от большого числа факторов и, как следствие, варьирует в широких пределах. Потребности самих рыб в ПНЖК неодинаковы. Некоторые виды эффективно синтезируют ЭПК и ДГК из предшественников, другие же получают эти ЖК только с пищей. При этом в метаболизме всех рыб n-3 ПНЖК играют важную роль. Вылов дикой рыбы достиг своих пределов, но при этом он не удовлетворяет потребности человечества в n-3 ПНЖК. Для снижения дефицита ЭПК+ДГК в питании человека существует несколько путей, а именно, аквакультура, биотехнология микроорганизмов и генная инженерия.

Ключевые слова: эйкозапентаеновая кислота, докозагексаеновая кислота, водная экосистема, корм для аквакультуры, диета человека, профилактика заболеваний человека

DOI: 10.31857/S0869813920050040

ЗНАЧЕНИЕ ПНЖК ДЛЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ. СОДЕРЖАНИЕ N-3 И N-6 ПНЖК В ПИЩЕВЫХ ОБЪЕКТАХ РЫБ КАК ВАЖНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ КАЧЕСТВА

Традиционно в ихтиологии для быстрой и приблизительной оценки состояния рыб используются физиологические параметры (индексы), базирующиеся на соотношениях линейных размеров и массы тела рыб [1, 2]. Для более точной оценки состояния здоровья рыб и прогноза продуктивности популяций совместно с традиционными индексами используют биохимические показатели, например, состав и содержание липидов, включая жирные кислоты и стерины, аминокислоты, макрои микроэлементы [3]. Из всех этих важных параметров мы рассмотрим только жирные кислоты.

Среди жирных кислот физиологически ценными для рыб признаны длинноцепочечные ПНЖК семейства n-3, а именно, эйкозапентаеновая кислота (20:5n-3, ЭПК) и докозагексаеновая кислота (22:6n-3, ДГК), и семейства n-6, а именно, арахидоновая кислота (20:4n-6, APK) [4, 5]. Как и все остальные жирные кислоты ПНЖК могут служить источником энергии в клетках, если потребляемое количество этих кислот превосходит необходимое и достаточное [6]. Однако есть и исключение из этого правила: ДГК, главным образом, аккумулируется и не расходуется на энергетические цели [7]. Большая часть ПНЖК в составе фосфолипидов используется для построения клеточных мембран, формируя основу липидного бислоя. ДГК как раз является приоритетной кислотой, выполняющей строительную функцию во всех мембранах, но в особенности в мембранах клеток нервных тканей [8, 9]. Уникальной функцией обладают две ПНЖК, а именно 20:4n-6 и 20:5n-3. Из АРК и ЭПК путем ферментативного окисления производятся гормоноподобные биологически активные вещества — эйкозаноиды [10–12]. Эйкозаноиды производятся практически всеми тканями и служат для регуляции работы сердечнососудистой системы, процессов свертывания крови, иммунного ответа, воспалительных процессов, работы репродуктивных органов, участвуют в метаморфозе рыб [12]. Отсутствие АРК, ЭПК и ДГК в пище рыб в течение длительного времени приводит к появлению различных патологий: миокардита, ожирения печени и кишечника, эрозии плавников, жаберного кровотечения, искривления позвоночника, снижения репродуктивного потенциала и т.д. [7, 13]. На уровне популяции отмечается снижение скорости роста и увеличение смертности рыб [13]. Предупреждение развития перечисленных патологий путем введения в рацион различных ЖК позволяет обнаружить ЖК, которые являются незаменимыми (эссенциальными) для конкретных видов рыб. Castel в 70-х годах прошлого века обнаружил и детально описал симптомы дефицита ПНЖК у рыб, и произвел количественную оценку их потребностей в ПНЖК [5]. С тех пор разными авторами опубликовано много работ с оценкой потребностей ПНЖК у разных видов морских и пресноводных рыб [5]. Была предложена идея двух-порогового лимита ПНЖК у рыб. Первый порог – минимальное количество ПНЖК, необходимое для профилактики развития патологий. Второй порог оптимальное количество ПНЖК, требуемое для улучшения ростовых характеристик рыб. Далеко не все исследователи признают наличие двух порогов [5].

Потребности рыб в тех или иных ЖК сильно варьируют. Для пресноводных и диадромных (проходных) рыб, способных синтезировать длинноцепочечные ПНЖК из С18 ПНЖК, эссенциальными ЖК считаются 18:2n-6 и 18:3n-3, достаточное содержание которых в пище обеспечивает оптимальное развитие рыб. Достаточным считается содержание ~1% (0.4–2.0%) эссенциальных ПНЖК от сухой массы пищи [5]. По потребностям в этих ПНЖК пресноводных рыб разделяют на 3 группы: холодноводные виды, включающие лососевых, которые требовательны к наличию в пище 18:3n-3; тепловодные виды, например, тиляпия, которым необходима 18:2n-6; и эвритермные рыбы, например, Ictalurus punctatus и Cyprinus carpio, в рационе которых должны присутствовать обе ПНЖК [5]. Дополнительное включение длинноцепочечных n-3 ПНЖК в рацион пресноводных рыб улучшает показатели их роста [14]. Yang с соавт. в экспериментальных условиях показали, что пресноводные рыбы (Salvelinus alpinus и Oncorhynchus mykiss), получающие 18:2n-6 и 18:3n-3 с пищей, эффективно синтезируют АРК и ДГК. Тем не менее, оба вида при потреблении пищи, обогащенной АРК и ДГК, росли лучше, чем при отсутствии этих ЖК в пище [15]. Однако для некоторых рыб замена рыбьего жира на растительные масла, богатые 18:3п-3, не приводит к ухудшению ростовых характеристик, но существенно снижает содержание ЭПК и ДГК в их биомассе [16]. Ahlgren с соавт. обнаружили связь потребности в ПНЖК с типом питания пресноводных рыб. Наиболее требовательны к высокому содержанию п-3 ПНЖК оказались хищники-бентофаги, имеющие самые высокие значения соотношений n-3/n-6 и ДГК/АРК. Хищники-рыбояды оказались менее требовательны к содержанию данных ЖК в пище, а травоядно-всеядные рыбы рассматривались как самые нетребовательные [17]. При этом была обнаружена высокая вариабельность состава ЖК травоядно-всеядных рыб внутри одного вида (Oreochromis niloticus), указывающая на их способность адаптироваться к изменению качества пищи. Напротив, хищники, представители одного вида (*Clarias gariepinus*), обитающие в разных озерах, демонстрировали стабильность жирнокислотного состава, что, возможно, указывает на большую значимость качества пищи для хищных рыб [17]. Другие авторы отмечают более высокое содержание ЭПК и ДГК у хищников-рыбоядов, чем у бентофагов и планктофагов при сравнении в пределах одного отряда [18]. Разницу в потребностях разных видов рыб в ПНЖК необходимо учитывать при разработке кормов для аквакультуры. Избыток n-3 ПНЖК в пище пресноводных рыб, вероятно, способен приводить к негативным последствиям, вплоть до развития патологий [19]. Такой дифференцированный подход к разработке кормов позволит более эффективно расходовать ресурсы природных экосистем, учитывая, что источником n-3 ПНЖК для аквакультуры служат морские экосистемы.

В отличие от пресноводных рыб все морские рыбы требовательны к содержанию С20 и С22 ПНЖК в пище. В их рационе должны присутствовать длинноцепочечные ЭПК и ДГК, которые и считаются эссенциальными для морских рыб [3–5]. Потребности морских рыб в ЭПК и ДГК варьируют. Для таких видов, как Psetta maxima, Pagrus major, Dicentrarchus labrax, Sciaenops ocellatus и Sebastes schlegeli достаточно около 1% ЭПК + ДГК от сухой массы корма, в то время как для видов *Rhab*dosargus sarba, Pseudocaranx dentex и Pleuronectes ferrugineus требуется повышенное содержание ЭПК + ДГК, составляющее до 2.5% от сухой массы корма [5]. Количественные данные по потребностям морских и пресноводных рыб в АРК немногочисленны [5, 20]. Количество эссенциальных ПНЖК, необходимых для оптимального роста рыб. может варьировать в зависимости от соотношения отдельных ПНЖК. Например, при соотношении $Д\Gamma K/ \Im \Pi K$ в пище = 1.0 потребность в этих ЖК составляла 0.9%, а при соотношении = 0.5 потребность в ДГК и ЭПК возрастала до 1.9% [5]. То есть, потребности в ПНЖК снижаются при увеличении соотношения ДГК/ЭПК в пище. Эти результаты свидетельствуют о большей ценности ДГК для исследованных рыб, чем ЭПК, что подтверждается многими авторами [21–25].

В течение жизни рыб потребности в ПНЖК меняются [7]. На личиночной стадии потребности в ЭПК и ДГК выше, чем на более поздних стадиях развития рыб, хотя таких сравнительных работ было проведено немного [5, 26]. Кроме того, у личинок морских рыб потребности в ДГК гораздо выше, чем в ЭПК, что связывают с активным ростом и развитием органов зрения и нервной системы [7]. Содержание АРК в пище личинок рыб морского окуня (*Sparus aurata*), составляющее 1-1.5% от сухой массы корма, значительно увеличило скорость роста личинок и их стрессоустойчивость [27]. Напротив, добавление АРК в корм желтохвостой камбалы (*Pleu*ronectes ferrugineus) привело к снижению скорости роста, увеличению смертности и ухудшению пигментации [28]. Снижение содержания n-3 ПНЖК и увеличение APK в рационе камбалообразных на личиночной стадии развития привело к нарушениям метаморфоза, а именно, неправильной пигментации и замедлению миграции глаза [29–31]. Lund с соавт. также связали нарушение пигментации у личинок камбалы Solea solea с повышенным содержанием АРК в рационе этих рыб. Авторы предположили, что такое влияние АРК на метаморфоз камбалообразных вызвано не самой ЖК, а образованными из АРК простагландинами PGE2 [32]. Однако взрослым рыбам камбалообразных АРК необходима, так как эйкозаноиды, образованные из АРК, обеспечивают синхронизацию их нереста [33]. Накопление АРК в отдельных органах, например, в жабрах и почках у палтуса и в молоках у морского окуня, вероятно, объясняется специфической физиологической ролью этой ПНЖК [34, 35].

603

Недостаток ПНЖК в пище рыб вызывает изменение в синтезе ЖК, что приводит к появлению специфических ЖК в тканях рыб, которые могут служить маркерами дефицита ПНЖК [5]. Одной из таких кислот является 20:3n-9. При отсутствии в пище 18:2n-6 и 18:3n-3, а также АРК, ЭПК и ДГК субстратом для ∆6 десатуразы становится 18:1n-9. Синтезированная 18:2n-9 подвергается действию ферментов элонгаз, и затем из 20:2n-9 под действием $\Delta 5$ десатуразы образуется 20:3n-9 [5]. Однако, так как в рыбе даже при дефиците эссенциальных ПНЖК в небольших количествах они все равно присутствуют, то было предложено маркером дефицита ПНЖК использовать соотношение 20:3n-9/ДГК [36, 37]. Например, при значениях соотношения = 0.4 в фосфолипидах радужной форели, рыба испытывала дефицит в n-3 ПНЖК [5]. В липидах печени полярной рыбы *Coregonus lavaretus maraena* при сильном недостатке ПНЖК в корме соотношение 20:3n-9/ДГК достигало 2.6 [5]. Этот маркер применяется только в отношение пресноводных рыб, у которых активны $\Delta 5$ и $\Delta 6$ десатуразы [5]. В морских рыбах синтез 20:3n-9 невозможен, но некоторые авторы обнаруживают повышенное содержание 18:2n-9 и 20:2n-9 при дефиците ПНЖК в пище [5, 21, 38].

ЗНАЧЕНИЕ ПНЖК ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА И ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ЭТИХ ВЕЩЕСТВ. ФУНКЦИИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Все жирные кислоты, присутствующие в питании человека можно разделить на четыре основные группы: насыщенные (НЖК), мононенасыщенные (МНЖК), полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) и транс-жирные кислоты. Количество транс-жирных кислот в питании человека было незначительным, и основным источником этих ЖК были продукты из жвачных животных (мясо, молоко, жир) [39]. После введения в пищевую промышленность гидрогенирования растительных масел, доля транс-жирных кислот в питании человека сильно выросла. Помимо роста транс-жирных кислот в диете современного человека увеличилось и потребление НЖК, n-6 ПНЖК и жира в целом [40]. Основные n-6 ПНЖК рациона человека — это АРК, главным источником которой служит мясо животных и линолевая кислота (18:2n-6, 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 (18:3n-3, АЛК). Основным источником ЭПК и ДГК для человека служит рыба и морепродукты [41]. АЛК поступает к человеку из растительных масел, семян, орехов и зеленых частей растений.

ЖК в организме человека выполняют несколько функций, одна из которых структурно-функциональная. Мембрана клеток представляет собой бислой фосфолипидов с белковыми включениями. Фосфолипиды состоят из полярной части ("головки") и двух неполярных молекул ЖК, которые присоединяются к фосфолипиду в положение sn-1 и sn-2. Как правило, в положении sn-1 находятся НЖК или МНЖК, например, стеариновая или олеиновая (18:0, 18:1n-9), а в положении sn-2 находятся ПНЖК. Состав ЖК мембран клеток разных органов и тканей сильно варьирует. В сетчатке глаза человека 90% всех ЖК составляют всего 5 кислот: ДГК (20-25%), 16:0 (18-22%), 18:0 (15-20%), 18:1n-9 (16-19%) и АРК (9-12%) [42, 43]. В клетках серого вещества коры головного мозга здорового человека доминируют 18:1п-9 (19%), 18:0 (19%), 16:0 (17%), ДГК (13.5%) и АРК (9%) [44]. В фосфолипидах сердца человека преобладают АРК (22-24%), ЛК (18-20%), 16:0 (15%), 18:0 (14%), в то время как содержание ДГК достигает лишь 5% [45]. В печени основную долю составляют НЖК (16:0 и 18:0), а из ПНЖК преобладают ЛК (17%), АРК (8%) и ДГК (3%) [46]. Жировая ткань человека состоит, в основном, из МНЖК и НЖК: 18:1n-9 (44%), 16:0 (22%), ЛК (14%), 16:1n-7 (7%) [47].


Рис. 1. Содержание ДГК (% от общих ЖК) в разных органах и тканях человека: в сером веществе мозга, сетчатке глаза, сперме, коре головного мозга, печени, эритроцитах, белом веществе мозга, селезенке, скелетных мышцах, сердце, ректальном эпителии и жировой ткани (по [56, 59]). Fig. 1. The content of DHA (% of the total FAs) in different organs and tissues of human (by [56, 59]).

Метаболизм целого организма во многом определяется процессами и скоростью этих процессов, ассоциированными с мембранами [48]. Свойства мембран во многом определяются составом ЖК [49]. Мембраны, содержащие ПНЖК, более проницаемы для ионов Na^+ , K^+ , H^+ , что приводит к более быстрому обмену веществ [48]. Однако мембраны с высоким содержанием ПНЖК в большей степени подвержены действию окислительных агентов, вызывая окислительное повреждение органелл и клетки в целом [50-53]. Механизмов для защиты от окисления ПНЖК в организме животных и человека весьма много. Витамин Е является акцептором радикалов и действует как ограничитель перекисного окисления липидов; пероксисомная каталаза предотвращает самоокисление ПНЖК; глютатионпероксидаза – селенсодержащий фермент, разрушающий перекись водорода и действующий даже при низких концентрациях перекиси; супероксид-дисмутаза удаляет свободные радикалы [54]. Ткани человека, в которых скорость передачи сигналов и активность мембран имеют важное значение отличаются от других тканей высоким содержанием ДГК (рис. 1). Такими тканями, в первую очередь, являются нервные, например, кора головного мозга и сетчатка глаза, фоторецепторы которой характеризуются высокой скоростью передачи сигналов [48, 55, 56].

В попытках найти преимущества молекулы ДГК в функционировании мембран по сравнению с очень близкими по строению молекулами 22:5n-6 и 22:5n-3, а также ЭПК и АЛК были проведены экспериментальные работы [57]. Предположительно, более компактное пространственное строение липидов этерифицированных ДГК способствует более эффективному липид-белковому взаимодействию внутри мембраны, что обеспечивает высокую эффективность восприятия светового сигнала и проведения нервного импульса [57, 58]. Напротив, для регуляции работы мембран некоторых других тканей необходима ЭПК, а не ДГК. Например, в эндотелии сосудов, ЭПК стабилизирует мембраны при возрастании температуры и увеличении количества холестерина тем самым снижая воспалительный процесс и улучшая работу эндотелия [49]. В то же время ДГК уменьшает толщину мембран, увеличивает их текучесть и усиливает агрегацию холестерина в мембранах эндотелия сосудов [49].

Еще одна функция, выполняемая ЖК в организме человека, это энергетическая. В качестве источников энергии в основном используются НЖК и МНЖК, которые в составе триацилглицеринов аккумулируются в белой жировой ткани человека [60]. Помимо белой жировой ткани в организме человека присутствует бурая жировая ткань. В отличие от белой жировой ткани, в клетках которой находится одна большая жировая капля и небольшое количество митохондрий, клетки бурого жира богаты митохондриями, а многочисленные жировые капли ассоциированы с ними [61–63]. У новорожденных детей содержание бурого жира гораздо выше, чем у взрослого человека [61]. Местоположение бурого жира во многом определяется его функциями: быстрое сжигание глюкозы и липидов для производства тепла обеспечивает защиту жизненно важных органов младенца [60, 64]. Однако предполагается, что это не единственная функция бурого жира. В буром жире аккумулируется большое количество ДГК, которое, вероятно, используется как пул для обеспечения роста и развития мозга в течение первых месяцев жизни младенцев [65].

Особенная роль в организме человека принадлежит двум ПНЖК, а именно АРК и ЭПК. Эти ПНЖК являются предшественниками в синтезе эйкозаноидов [10, 11, 58, 66]. Синтез эйкозаноидов начинается с отщепления АРК или ЭПК от фосфолипидов мембран с помощью фермента фосфолипазы А2 [67]. Этот фермент не специфичен к определенному семейству ПНЖК. Поэтому та ПНЖК, АРК или ЭПК, которая находится в избытке в мембранах, в большей степени будет использоваться в синтезе эйкозаноидов. Из АРК и ЭПК синтезируются три типа эйкозаноидов – простагландины, тромбоксаны и лейкотриены [66, 68]. Простагландины и тромбоксаны синтезируются под действием фермента циклооксигеназы (COX), а лейкотриены под действием фермента липоксигеназы (LOX). Эйкозаноиды, синтезированные из АРК и ЭПК отличаются по своей структуре и свойствам. Из АРК синтезируются простагландины и тромбоксаны второй серии, а также лейкотриены четвертой серии. Простагландины второй серии способствуют развитию воспалительного процесса и индуцируют боль; тромбоксаны второй серии вызывают сужение кровеносных сосудов, усиливают агрегацию тромбоцитов, что в конечном счете приводит к повышению артериального давления, образованию тромбов и закупорке сосудов; лейкотриены четвертой серии вызывают спазмы бронхов и усиливают секрецию слизи [46, 66, 68]. Из ЭПК синтезируются простагландины и тромбоксаны третьей серии и лейкотриены пятой серии, обладающие противоположными свойствами, такими как, расширение кровеносных сосудов и бронхов, снижение кровеносного давления, подавление воспалительного процесса [10, 12, 58, 68]. Дополнительно, из ЭПК и ДГК под действием фермента LOX синтезируются противовоспалительные медиаторы, а именно, резолвины и нейропротектины [69]. Эти медиаторы выполняют важные функции. Например, нейропротектин D1 ингибирует воспалительные процессы и предотвращает разрушение клеток пигментного эпителия сетчатки глаза [70]. Кроме того, ЭПК и ДГК замедляют синтез эйкозаноидов из АРК и в целом снижают синтез эйкозаноидов [71].

ПНЖК В МЕДИЦИНСКИХ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Из всех ЖК можно выделить две ПНЖК, а именно ЭПК и ДГК, которые обладают высокой физиологической ценностью и играют ключевую роль в обеспечении здоровья человека. Многочисленные медицинские исследования демонстрируют важное значение ЭПК и ДГК для профилактики и лечения разнообразных болезней человека. Ряд медицинских и эпидемиологических исследований показал высокую эффективность профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний препаратами, содержащими n-3 ПНЖК (ЭПК + ДГК) [72]. Американские исследования, проведенные на более чем 22000 людей, выявили, что еженедельное потребление n-3 ПНЖК снижает риск внезапной остановки сердца на 52% [73]. Положительная связь между приемом n-3 ПНЖК и снижением развития сердечно-сосудистых заболеваний была обнаружена в исследовании, охватившем около 85000 женщин [74]. В последние годы появились работы, демонстрирующие отсутствие положительного эффекта от приема n-3 ПНЖК при сердечно-сосудистых заболеваниях [75–77]. Объясняется это, главным образом, применением в последние годы высокоэффективных препаратов, на фоне которых эффект от n-3 ПНЖК становится незаметным [72].

К настоящему времени проведено много исследований по влиянию п-3 ПНЖК на когнитивные способности людей разных возрастов. Результаты этих исследований весьма противоречивы [78]. Положительное влияние приема n-3 ПНЖК женщинами в течение беременности на улучшение внимательности детей, способность решать задачи и улучшение зрения было обнаружено одними авторами [79-82], но опровергнуто другими [83-85]. Подобные противоречивые результаты были получены и на других возрастных группах детей [78]. Наиболее устойчивые положительные результаты зарегистрированы на пожилых людях в период снижения когнитивных способностей или деменции [78]. Например, в клиническом исследовании, проведенном в 90-х годах прошлого века, было обнаружено положительное влияние ежедневного потребления 380 мг ЭПК + ДГК на когнитивные способности пожилых людей в возрасте 70-89 лет [86]. Эпидемиологические и клинические исследования подтверждают, что потребление n-3 ПНЖК препятствует снижению когнитивных способностей у пожилых людей [87–89]. Однако при уже имеющихся серьезных нейродегенеративных заболеваниях, например, болезни Альцгеймера, прием n-3 ПНЖК не оказывает существенного положительного воздействия [78].

Положительное воздействие n-3 ПНЖК зарегистрировано при лечении депрессий [48, 86, 90], воспалительных процессов [91–93], в том числе артрита [94], сахарного диабета [48, 95], а также злокачественных опухолевых новообразований [96–98]. Например, ЭПК и ДГК ингибируют рост и вызывают апоптоз клеток опухолевых новообразований молочной железы [99] и улучшают состояние здоровья людей, страдающих от рака легких [100]. ЭПК, ДГК и 22:5n-3 препятствуют пролиферации и вызывают апоптоз клеток колоректальной карциномы, при этом самое сильное влияние оказывает 22:5n-3 [101]. Высокое содержание n-3 ПНЖК (>3 г/сутки) в пище людей, страдающих ожирением, препятствует развитию печеночного стеатоза (накопление жира в гепатоцитах) и инсулиновой резистентности, которая часто развивается на фоне ожирения [71, 102]. Кроме того, у пациентов, принимающих n-3 ПНЖК, наблюдали усиление транскрипции генов, участвующих в β-окислении липидов, что приводило к ослаблению синтеза липидов и усилению их окисления [102, 103].

Учреждения здравоохранения различных стран мира разработали нормы потребления ЭПК + ДГК для профилактики развития сердечно-сосудистых и прочих заболеваний, которые варьируют в пределах 200–1000 мг ЭПК + ДГК в сутки [104]. Наиболее часто для диетологических и других расчетов используют норму, рекомендованную Всемирной организацией здравоохранения, составляющей 500–1000 мг ЭПК + ДГК в сутки [86]. Хотя по отчетам Комитета Великобритании по питанию и Комитета Великобритании по токсичности (Scientific Advisory Committee On Nutrition и Committee On Toxicity) лечебный эффект при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, а именно, снижение концентрации ТАГ в плазме крови, снижение

артериального давления и тромбообразования оказывает ежедневное потребление 1500–2000 мг длинноцепочечных n-3 ПНЖК [104].

Однако в большинстве индустриально развитых стран основу питания составляет мясная продукция, выращенная на искусственных кормах, богатых n-6 ПНЖК [11, 46]. В рационе населения многих европейских стран источником ПНЖК (60–80%) служат растительные и животные жиры, мясная продукция и злаковые, а общее потребление насыщенных ЖК превышает норму, рекомендованную Всемирной организацией здравоохранения [105]. В то же время потребление ЭПК + ДГК во многих странах значительно ниже рекомендованной нормы [86].

Национальными медицинскими организациями также подчеркивается важность соблюдения норм потребления ПНЖК семейства n-6. Соотношение n-6/n-3 в пище человека не должно превышать 3 : 1 [106]. Однако соотношение n-6/n-3 в рационе людей, населяющих индустриально развитые страны, в несколько раз превышает рекомендованное и достигает 15 : 1–25 : 1 [11, 66, 94, 107]. Тенденция к увеличению соотношения n-6/n-3 в рационе человека продолжается до сих пор. Например, в Европе потребление 18:2n-6 за последние двадцать лет возросло на 50% [94]. При этом смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в Европе занимает первое место. По эпидемиологическим данным 2015 г. в целом средняя смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в Европе составила 45% от общей смертности населения [108]. В России по данным на 2016 г. смертность от сердечно-сосудистых заболеваний составляла 47.8% [109]. Многие исследователи указывают на прямую связь между потреблением n-3 ПНЖК и снижением смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [11, 46, 71]. Например, по данным Simopoulos у населения Европы и США содержание ЭПК в фосфолипидах тромбоцитов в 3 раза ниже, чем у жителей Японии и в 16 раз ниже, чем у жителей Гренландии, в то время как смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в 4 и 6 раз выше, чем у жителей Японии и Гренландии соответственно. Население европейских стран различается по потреблению рыбы, а также по показателям смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (табл. 1). В странах с высоким потреблением рыбы смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в среднем в 3 раза ниже, чем в странах с ее низким потреблением (табл. 1).

ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ n-3 ПНЖК В ПИТАНИИ ЧЕЛОВЕКА

Основным пищевым источником длинноцепочечных n-3 ПНЖК для человека являются водные экосистемы, и, в первую очередь, рыба [41, 111]. Абсолютное содержание ЭПК и ДГК сильно варьирует в зависимости от вида рыб и ее физиологического состояния. Различные виды рыб могут различаться по содержанию ЭПК + ДГК в сотни раз [112]. На основании абсолютного содержания ЭПК и ДГК в отдельных видах рыб можно рассчитать порцию рыбы, в которой содержится суточная норма ЭПК и ДГК для человека (табл. 2). Приведенные порции рыб ориентировочные, поскольку человек, как правило, не питается сырой рыбой, а кулинарная обработка может оказать влияние на содержание ЭПК + ДГК в готовом продукте. К наиболее ценным видам рыб в отношении n-3 ПНЖК можно отнести сайру, сардины, скумбрию, семгу и сельдь, которых нужно потреблять менее 100 г в день для получения суточной нормы ЭПК + ДГК (табл. 2). Однако многие промысловые виды рыб, например, лещ, окунь, судак, небогаты n-3 ПНЖК, и потребляя их практически невозможно удовлетворить суточную потребность человека в этих физиологически ценных веществах.

Рост численности населения Земли происходит с высокой скоростью и составляет 1.4% в год. По данным ООН и FAO в 2012 г. численность человечества составила 7 миллиардов, а к 2050 г. может превысить 9 миллиардов [134]. Возникает вопрос,

Страны Countries	Смертность Mortality	Потребление рыбы Fish consumption	Страны Countries	Смертность Mortality	Потребление рыбы Fish consumption
Kyrgyzstan	2531	2-5	Switzerland	598	10-20
Tajikistan	2252	<2	Estonia	1492	10-20
Turkmenistan	3048	2-5	Среднее [Mean]	1415 ± 234	
Uzbekistan	2717	<2			
Среднее [Mean]	2637 ± 167		The United Kingdom	574	20-30
			Belgium	610	20-30
Bulgaria	2302	5-10	Denmark	567	20-30
Hungary	1567	5-10	Israel	468	20-30
Kazakhstan	1218	5-10	Ireland	783	20-30
Poland	1262	5-10	Italy	684	20-30
Romania	2047	5-10	Latvia	1874	20-30
Slovakia	1806	5-10	Netherlands	565	20-30
Turkey	1040	5-10	Russia	2338	20-30
The Czech Republic	1285	5-10	Среднее [Mean]	940 ± 226	
Среднее [Mean]	1566 ± 158				
			Spain	513	30-60
Austria	849	10-20	Iceland	738	>60
Belarus	2175	10-20	Lithuania	1803	30-60
Germany	839	10-20	Norway	570	30-60
Greece	876	10-20	Portugal	607	30-60
Moldova	2452	10-20	Finland	775	30-60
Slovenia	923	10-20	France	449	30-60
Ukraine	2609	10-20	Sweden	706	30-60
Croatia	1342	10-20	Среднее [Mean]	770 ± 153	

Таблица 1. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (тыс. на 100000 человек) и потребление рыбы (кг/человек/год) в разных странах Европы по [108, 110] **Table 1.** Human mortality from cardiovascular diseases (thousand per 100000 people) and fish con-

sumption (kg/person/year) in different countries of Europe by [108, 110]

способны ли водные экосистемы обеспечивать население Земли, а также всех животных суши, необходимым количеством n-3 ПНЖК? Уже сейчас промысловый вылов рыб и морепродуктов достиг своих пределов – около 100×10^6 тонн в год [135], из которых более 85% приходится на продукты морских экосистем и около 15% – на продукты континентальных водоемов и водотоков [110]. При этом по данным FAO среднее потребление рыбы и морепродуктов, включая аквакультуру, на душу населения составляет 20.1 кг в год (данные на 2014 г.) [110]. Среднее содержание ЭПК + ДГК в биомассе рыб и беспозвоночных составляет 2 мг/г сырой массы веса [41]. Следовательно, человек в среднем потребляет 0.11 г ЭПК + ДГК в сутки, что в 5–10 раз меньше существующей рекомендованной нормы. Очевидно, что уже сейчас человечество испытывает острый дефицит в этих физиологически ценных веществах.

Для снижения дефицита ЭПК + ДГК в питании человека существует несколько путей, а именно, аквакультура, биотехнология микроорганизмов и генная инженерия.

Аквакультура производит 44% (73.8 × 10^6 тонн в год, данные на 2014 г.) всех рыбных продуктов на рынке [110, 111]. Например, практически вся имеющаяся в продаже семга (*Salmo salar*) выращена в аквакультуре [111]. Последние несколько лет около 20% от промыслового улова рыб используется для производства кормов для

Таблица 2. Порция основных промысловых рыб (г сырой массы), содержащая 1 г ЭПК + ДГК
(расчет порций проведен на основании абсолютного содержания ЭПК и ДГК в рыбах)
Table 2. Portions of the main commercial fishes (g, wet weight) containing 1 g of EPA + DHA (The
calculation of the portions was carried out on the basis of the absolute content of EPA and DHA in fish)

Вид Species	Порция, г Portion, g	Источник Reference		
Сайра (Cololabis saira)	28	[113]		
Палия боганидская (Salvelinus boganidae)	31	[114]		
Сардина (Sardinops sagax)	39	[115]		
Скумбрия (Scomber scombrus)	53	[116]		
Семга (Salmo salar)	83	[117]		
Сельдь (<i>Clupea harengus</i>)	84	[115, 116, 118]		
Keta (Oncorhynchus keta)	100	[119]		
Кижуч (Oncorhynchus kisutch)	120	[120, 121]		
Мойва (Mallotus villosus)	122	[115]		
Ставрида (Trachurus trachurus)	133	[122]		
Чавыча (Oncorhynchus tshawytscha)	144	[120, 121]		
Горбуша (Oncorhynchus gorbuscha)	155	[115, 119, 123]		
Нерка (Oncorhynchus nerka)	166	[119, 120, 124]		
Тугун (Coregonus tugun)	173	[114]		
Микижа (Oncorhynchus mykiss)	177	[120, 121, 125]		
Кумжа (Salmo trutta)	227	[125]		
Чир (Coregonus nasus)	236	[114]		
Голец арктический (Salvelinus alpines)	244	[125]		
Корюшка (Osmerus mordax)	289	[120]		
Тунец (Thunnus tonggol)	290	[126]		
Сиг (Coregonus albula)	291	[114]		
Ряпушка (Coregonus sardinella)	297	[114]		
Елец (Leuciscus leuciscus baikalensis)	301	[112]		
Xek (Merluccius productus)	318	[115, 120]		
Ленок (Brachymystax lenok)	330	[114]		
Налим (Lota lota)	339	[127-129]		
Хариус европейский (Thymallus thymallus)	344	[127]		
Минтай (<i>Theragra chalcogramma</i>)	347	[115, 120]		
Хариус сибирский (Thymallus arcticus)	384	[130, 131]		
Сиг (Coregonus lavaretus)	388	[114]		
Уклейка (Alburnus alburnus)	405	[128]		
Треска атлантическая (Gadus morhua)	413	[116]		
Щука (<i>Esox lucius</i>)	422	[112, 121, 127, 128]		
Камбала морская (Pleuronectes platessa)	426	[116]		
Плотва (<i>Rutilus rutilus</i>)	431	[112, 127, 128]		
Треска тихоокеанская (Gadus macrocephalus)	510	[120]		
Таймень (Hucho taimen)	515	[114]		
Палтус (Paralichthys californicus)	610	[120]		
Окунь речной (Perca fluviatilis)	694	[112, 116, 127, 128]		

Вид Species	Порция, г Portion, g	Источник Reference
Карась (Carassius carassius)	704	[127, 128]
Пикша (Melanogrammus aeglefinus)	724	[120]
Камбала красная (Glyptocephalus cynoglossus)	725	[120]
Судак (Sander lucioperca)	735	[116, 127, 132]
Густера (Blicca bjoerkna)	800	[116, 127, 133]
Окунь морской (<i>Mycteroperca microlepis</i>)	833	[120]
Пыжьян (Coregonus pidschian)	885	[112]
Лещ (Abramis brama)	1000	[112, 116, 127]

Таблица 2. Окончание

аквакультуры и рыбьего жира [110]. Основная доля рыбьего жира, а именно, 75% расходуется на корм рыбам в аквакультуре и лишь 22% на питание человека [110, 136]. Увеличение объема аквакультуры могло повлечь за собой и увеличение доли расходов промыслового улова на поддержание аквакультуры и соответственно снижение доли улова, которую будет потреблять человек. Однако разработка новых сбалансированных кормов, специализированных под потребности разных видов рыб, способна снизить расход морепродуктов на аквакультуру [136]. За последние несколько лет (с 2009 г.) объемы продукции аквакультуры выросли на 40%, при этом потребление морепродуктов аквакультурой осталось на прежнем уровне [110, 136]. Хорошо известно, что замещение рыбьего жира на растительные масла в кормах для рыб приводят к снижению содержания ЭПК + ДГК в биомассе рыб [137]. Кроме того, дефицит n-3 ПНЖК у рыб вызывает развитие различных заболеваний, что дополнительно осложняет содержание аквакультуры [138]. Новые оптимизированные корма со сбалансированным составом, содержащие минимальное, но достаточное для нормального роста и развития рыб количество ЭПК и ДГК, позволяют получать высококачественную рыбную продукцию [139-141]. Например, абсолютное содержание ЭПК+ДГК в лососевых рыбах, выращенных в аквакультуре, значительно превосходит таковое в дикой рыбе [119, 136]. Несмотря на современные разработки в данной области, остается нерешенным вопрос о загрязнении природных водных экосистем аквакультурой. Размещаясь на базе морей, озер, рек и водохранилищ, предприятия аквакультуры оказывают негативное влияние на дикую рыбу, остающуюся до сих пор основным источником n-3 ПНЖК для человека [142, 143].

Промышленное культивирование микроорганизмов, включая генетически модифицированные штаммы, синтезирующие n-3 ПНЖК, может оказаться экономически выгодным и обеспечивать часть населения Земли физиологически ценными веществами [144]. Однако далеко не все микроорганизмы, синтезирующие n-3 ПНЖК, подходят для промышленного использования. Бактерии, вероятно, являются неподходящим объектом, поскольку они не накапливают триацилглицерины [145]. Многие авторы уверены, что использовать фотоавтотрофные микроорганизмы, являющиеся основными продуцентами ЭПК и ДГК в природе, для промышленного производства этих веществ экономически невыгодно [145–148]. Для поддержания оптимальной скорости роста плотность культуры таких микроорганизмов должна быть достаточно низкой, что ведет к низкому производству биомассы при высоких затратах на культивирование. В небольших объемах культивирование микроводорослей встречается в аквакультуре. Например, микроводоросли *Isochrysis, Chaetoceros, Nannochloropsis, Phaeodactylum* и *Pavlova* культивирование обогащения n-3 ПНЖК зоопланктона и личинок рыб [146, 149]. Культивирование

гетеротрофных микроводорослей в отличие от автотрофных позволяет производить п-3 ПНЖК более эффективно и высококачественно [145, 148]. Например, производство ДГК с помощью облигатных гетеротрофных морских динофитовых водорослей (*Crypthecodinium cohnii*) может достигать 1–1.5 г/л в сутки [146]. ДГК, произведенная динофитами, в основном используется для обогащения искусственных молочных смесей для младенцев и производства пищевых добавок — желатиновых капсул [145, 146]. Самыми продуктивными микроорганизмами в отношении ДГК являются траустохитриды рода Schizochytrium, которые производят около 10 г/л в сутки этой ЖК [146]. ДГК, произведенная траустохитридами, применяется 1) в пищевых добавках для человека; 2) в кормах для сельскохозяйственных животных, в основном кур, для обогащения мяса и яиц птиц физиологически ценной ДГК; 3) в аквакультуре, для увеличения содержания ДГК в коловратках и ракообразных, используемых в питании личинок рыб [150]. Другая физиологически ценная ПНЖК – ЭПК, не производится микроорганизмами в промышленных масштабах, поскольку эффективность ее производства низкая. Например, самые продуктивные диатомовые водоросли Nitzschia laevis при гетеротрофном способе питания способны производить лишь 0.175 г/л в сутки этой ПНЖК [146]. Однако в последнее время микроводоросли стали объектом генетических модификаций методом CRISPR-Cas9 [151]. Уже получены генномодифицированные микроводоросли – Chlamydomonas reinhardtii и Nannochloropsis gaditana – с высоким содержанием липидов [152, 153], а в Nannochloropsis oceanica удалось значительно увеличить содержание ЭПК [154]. В настоящее время промышленное производство n-3 ПНЖК микроорганизмами вносит небольшой вклад в общее производство этих ПНЖК [145, 155].

На сегодняшний день самым перспективным путем снижения дефицита ЭПК и ДГК в рационе человека можно считать производство генно-модифицированных масленичных растений, синтезирующих длинноцепочечные n-3 ПНЖК. Первым объектом генной модификации были растения рода Arabidopsis. После удачных экспериментов была выбрана масличная культура рыжик, *Camelina sativa*, которая легко поддается трансгенным манипуляциям методом инфильтрации с помощью бактерий Agrobacterium [156, 157]. Кроме того, С. sativa богата АЛК (около 45% от общих ЖК в целом растении и около 30% в семенах) [158, 159], из которой синтезируются ЭПК и затем ДГК. Путем подбора оптимального сочетания ферментов (десатураз и элонгаз) были получены растения, семена которых содержали 20–30% длинноцепочечных п-3 ПНЖК, в основном ЭПК, от общей суммы ЖК [156, 160]. В 2014 г. был произведен первый экспериментальный полевой посев трансгенных семян C. sativa, с генами, необходимыми для синтеза ЭПК и ДГК приблизительно в равных пропорциях [159]. В собранных семенах содержание ЭПК + ДГК в среднем составило около 15% [159]. Первый полевой посев показал стабильность жирнокислотного состава получаемых семян и стандартные ростовые характеристики трансгенных растений в поле, продемонстрировав возможность получать в промышленном масштабе ЭПК и ДГК из трансгенных растений. Масла семян *C. sativa* уже были апробированы в аквакультуре на S. salar. Ростовые характеристики рыб и их пищевая ценность для человека были сопоставимыми при использовании кормовых смесей на основе рыбьего жира и масла трансгенной C. sativa, содержащей 20% ЭПК и 0% ДГК от общей суммы ЖК [158]. Несмотря на отсутствие ДГК в корме, содержание ДГК в мышечной массе рыб составляло 8%, что было в 2 раза ниже, чем у рыб, выращиваемых на рыбьем жире [158]. Повышенное содержание 22:5n-3 и ДГК в печени и кишечнике рыб свидетельствовало о наличии активного синтеза ДГК в рыбах [161]. Эксперименты, проведенные другой группой ученых с использованием кормовых смесей на основе рыбьего жира и масла C. sativa, содержащего ЭПК и ДГК в равных пропорциях, показали, что пищевая ценность рыб S. salar,

выращенных на растительном масле, была выше, чем у рыб, выращиваемых на рыбьем жире [162]. Процентное содержание ЭПК и ДГК, а также соотношение n-3/n-6 было практически одинаковым в мышцах рыб при обеих диетах, однако общее содержание липидов было выше в рыбах, потребляющих корм на основе растительного масла [162]. Наряду с масличной культурой рыжика подобные исследования проводятся и в отношении рапса *Brassica napus* [163].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длинноцепочечные n-3 ПНЖК, а именно ЭПК и ДГК, играют важную роль для здоровья человека. Человек, как и большинство позвоночных, не способен синтезировать эти ПНЖК в достаточных количествах и поэтому должны получать их из пищи. Ключевым источником ЭПК и ДГК для животных служат водные экосистемы. Основную долю этих ПНЖК человек получает, потребляя рыбу и другие морепродукты. Рыбы для нормального роста и развития также нуждаются в достаточном количестве n-3 ПНЖК. Эти кислоты и их производные играют важную роль во многих процессах у рыб, включая формирование стайного поведения, прохождение метаморфоза и других стадий жизненного цикла. Эффективность собственного синтеза данных ПНЖК у рыб сильно варьирует. В целом основным источником ЭПК, ДГК и АРК для рыб также является пища. Вылов дикой рыбы достиг своих пределов и не может быть увеличен без катастрофических последствий. При этом человечество испытывает дефицит этих физиологически ценных веществ, получая лишь 10-20% от потребностей в n-3 ПНЖК. В настоящее время ведутся работы по поиску альтернативных источников ЭПК и ДГК, а также по разработке кормов для аквакультуры с оптимальным содержанием п-3 ПНЖК для снижения нагрузки на природные водные экосистемы. В обзоре обобщены представления, включая самые современные, о роли ПНЖК в физиологии и метаболизме рыб и человека. Кроме того, обозначены ключевые проблемы, связанные с дефицитом этих веществ в питании человека и возможные пути их решения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00594; Государственным заданием в рамках программы фундаментальных исследований РФ, тема № 51.1.1; Государственным заданием Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Сибирскому федеральному университету на 2020 г. (тема проекта «Биологически активные вещества в трофических сетях водных экосистем как незаменимые компоненты питания человека и маркеры для охраны рыбных ресурсов»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Jakob E.M., Marshall S.D., Uetz G.W. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. Oikos. 77: 61–67. 1996.
- 2. *Froese R.* Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. J. Appl. Ichthyol. 22: 241–253. 2006.
- Arts M.T., Kohler C.C. Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. Lipids in aquatic ecosystems. Arts M.T., Kainz M., Brett M.T. (Eds.). N.Y. Springer. 237 – 255. 2009.
- 4. *Koven W.* Key factors influencing juvenile quality in mariculture: a review. Isr. J. Aquacult.-Bamid. 55(4): 283–297. 2003.
- 5. *Tocher D.R.* Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. Aquaculture Res. 41: 717–732. 2010.
- 6. *Tocher D.R.* Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Rev. Fish Sci. 11: 107–184. 2003.
- 7. *Sargent J.R., Tocher D.R., Bell J.G.* The lipids. Fish Nutrition. 3rd edn. Halver J.E., Hardy R.W. (Eds.) San Diego. Acad. Press. 181–257. 2002.

- 8. *Feller S.E.* Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: A comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids. Chem. Phys. Lipids. 153: 76–80. 2008.
- 9. *Wassell S.R., Stillwell W.* Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. Chem. Phys. Lipids. 153: 57–63. 2008.
- Simopoulos A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am. J. Clin. Nutr. 54: 438–463. 1991.
- Simopoulos A.P. Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. Poult. Sci. 79: 961– 970. 2000.
- Schmitz G., Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. Prog. Lipid Res. 47: 147– 155. 2008.
- 13. *Glencross B.E.* Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. Rev. Aquacult. 1(2): 71–124. 2009.
- 14. Santha C.R., Gatlin D.M. Growth response and fatty acid composition of channel catfish fry fed practical diets supplemented with menhaden fish oil. The Progressive Fish-Culturist. 53: 135–140. 1991.
- Yang X., Tabachek J.L., Dick T.A. Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on lipid and fatty acid composition and haematology of juvenile Arctic charr Salvelinus alpinus (L.). Fish Physiol. Biochem. 12: 409–420. 1994.
- Toyes-Vargas E.A., Parrish C.C., Viana M.T., Carreón-Palau L., Magallón-Servín P., Magallón-Barajas F.J. Replacement of fish oil with camelina (*Camelina sativa*) oil in diets for juvenile tilapia (var. GIFT Oreochromis niloticus) and its effect on growth, feed utilization and muscle lipid composition, Aquaculture. 2020. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735177
- 17. *Ahlgren G., Vrede T., Goedkoop W.* Fatty acid ratios in freshwater fish, zooplankton and zoobenthos are there specific optima? Lipids in aquatic ecosystems. Arts M.T., Kainz M., Brett M.T. (Eds.). N.Y. Springer. 147–178. 2009.
- Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Glushchenko L.A., Zadelenov V.A., Rudchenko A.E., Dgebuadze Y.Y. Fatty acid composition of fish species with different feeding habits from an Arctic Lake. Dokl. Biochem. Biophys. 474(1): 220 – 223. 2017.
- 19. Bell J.G., Ghioni C., Sargent J.R. Fatty acid compositions of 10 freshwater invertebrates which are natural food organisms of Atlantic salmon parr (Salmo salar); a comparison with commercial diets. Aquaculture. 128(3–4): 301–313. 1994.
- 20. *Bell J.G., Sargent J.R.* Arachidonic acid in aquaculture feeds: Current status and future opportunities. Aquaculture. 218: 491–499. 2003.
- 21. *Kalogeropulos N., Alexis M.N., Henderson R.J.* Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 104: 293–308. 1992.
- Watanabe T. Importance of docosahexaenoic acid in marine fish larvae. J. World Aquacult. Soc. 24: 152–161. 1993.
- 23. *Ibeas C., Izquierdo M.S., Lorenzo A.* Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 127: 177–188. 1994.
- 24. *Rodriguez C., Perez J.A., Badia P., Izquierdo M.S., Fernandez-Palacios H., Hernandez A.L.* The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. Aquaculture. 169: 9–23. 1998.
- 25. Hamre K., Opstad I., Espe M., Solbakken J., Hemre G.-I., Pittman K. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or Artemia. Aquacul. Nutr. 8(2): 139–148. 2002.
- 26. *Nemova N.N., Nefedova Z.A., Murzina S.A., Veselov A.E., Ripatti P.O.* Comparative characteristics of the lipid and fatty acid status of eyed-stage atlantic salmon embryos reared in natural and artificial environments. Biol. Bull. 42(6): 493–499. 2015.
- 27. Koven W., Barr Y., Lutzky S., Ben Atia I., Weiss R., Harel M., Behrens P., Tandler A. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (Sparus aurata) larvae. Aquaculture. 193: 107–122. 2001.
- 28. Ishizaki Y., Takeuchi T., Watanabe T., Arimoto M., Shimizu K. A preliminary experiment on the effect of Artemia enriched with arachidonic acid on survival and growth of yellowtail. Fish. Sci. 64: 295–299. 1998.
- 29. *Villalta M., Estevez A., Bransden M.P.* Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture. 245: 193–209. 2005.
- 30. *Hamre K., Harboe T.* Critical levels of essential fatty acids for normal pigmentation in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. Aquaculture. 277: 101–108. 2008.
- 31. *Hamre K., Harboe T. Artemia* enriched with n-3 HUFA may give a large improvement in performance of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. Aquaculture. 277: 239–243. 2008.

- 32. Lund I., Steenfeldt S.J., Banta G., Hansen B.W. The influence of dietary concentrations of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid at various stages of larval ontogeny on eyemigration, pigmentation and prostaglandin content of common sole larvae (*Solea solea* L.). Aquaculture. 276: 143–153. 2008.
- Sargent J.R., McEvoy L.A., Bell J.G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. Aquaculture. 155: 119–129. 1997.
- Castell J.D., Bell J.G., Tocher D.R., Sargent J.R. Effects of purified diets containing different combinations arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (Scophthalmus maximus). Aquaculture. 128(3–4): 315–333. 1994.
- Bell M.V., Dick J.R., Thrush M., Navarro J.C. Decreased 20:4n-6/ 20:5n-3 ratio in sperm from cultured sea bass, Dicentrarchus labrax, broodstock compared with wild fish. Aquaculture. 144: 189–199. 1996.
- 36. *Castell J.D., Lee D.J., Sinnhuber R.O.* Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Lipid metabolism and fatty acid composition. J. Nutr. 102(1): 93–99. 1972.
- 37. *Castell J.D., Sinnhuber R.O., Lee D.J., Wales J.H.* Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Physiological symptoms of EFA deficiency. J. Nutr. 102(1): 87–92. 1972.
- 38. *Tocher D.R., Sargent J.R., Frerichs G.N.* The fatty acid compositions of established fish cell lines after long-term culture in mammalian sera. Fish Physiol. Biochem. 5: 219–227. 1988.
- 39. *Da Silva M.S., Julien P., Pérusse L., Vohl M.C., Rudkowska I.* Natural rumen-derived trans fatty acids are associated with metabolic markers of cardiac health. Lipids. 50: 873–882. 2015.
- 40. *Simopoulos A.P.* Genetic variation and evolutionary aspects of diet. Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. Papas A.M., Boca Raton (Eds.). CRC Press. 65–88. 1999.
- Gladyshev M.I., Arts M.T., Sushchik N.N. Preliminary estimates of the export of omega-3 highly unsaturated fatty acids (EPA + DHA) from aquatic to terrestrial ecosystems. Lipids in aquatic ecosystems. eds. Arts M.T., Kainz M., Brett M.T. (Eds.). N.Y. Springer. 179–209. 2009.
- 42. *Van Kuijk F.J.G.M., Buck P.* Fatty acid composition of the human macula and peripheral retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 33(13): 3493–3496. 1992.
- 43. Lauritzen L., Hansen H.S., Jorgensen M.H., Michaelsen K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. Prog. Lipid Res. 40: 1–94. 2001.
- 44. *McNamara R.K., Carlson S.E.* Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 75: 329–349. 2006.
- 45. *Rocquelin G., Guenot L., Justrabo E., Grynberg A., David M.* Fatty acid composition of human heart phospholipids: data from 53 biopsy specimens. J. Mol. Cell Cardiol. 17: 769–773. 1985.
- 46. Гладышев М.И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты и их пищевые источники для человека. Бюлл. Сибирск. федер. универ. Серия биол. 5(4): 352–386. 2012. [Gladyshev M.I. Essential polyunsaturated fatty acids and their dietary sources for man. J. Sib. Fed. Univ. Biol. 5(4): 352–386. 2012. (In Russ)].
- 47. *Hodson L. Skeaff C.M., Fielding B.A.* Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. Prog. Lipid Res. 47: 348–380. 2008.
- Hulbert A.J., Turner N., Storlien L.H., Else P.L. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. Biol. Rev. 80: 155–169. 2005.
- 49. *Mason R.P., Jacob R.F., Shrivastava S., Sherratt S.C.R., Chattopadhyay A.* Eicosapentaenoic acid reduces membrane fluidity, inhibits cholesterol domain formation, and normalizes bilayer width in atherosclerotic-like model membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1858: 3131–3140. 2016.
- 50. Pamplona R. Advanced lipoxidation end-products. Chem. Biol. Interactions. 192: 14-20. 2011.
- 51. Zimmiak P. Relationship of electrophilic stress to aging. Free Radic. Biol. Med. 51: 1087–1105. 2011.
- 52. *Naudí A., Jové M., Ayala V., Portero-Ortín M., Barja G., Pamplona R.* Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. Front Physiol. 4: 1–13. 2013.
- 53. *Brenna J.T., Carlson S.E.* Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development. J. Hum. Evol. 77: 99–106. 2014.
- 54. *Henderson R.J., Tocher D.R.* The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. Prog. Lipid Res. 26: 281–347. 1987.
- 55. German O.L., Insua M.F., Gentili C., Rotstein N.P., Politi L.E. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. J. Neurochem. 98: 1507–1520. 2006.
- 56. Calder P.C. Docosahexaenoic acid. Ann. of Nutrition and Metabolism. 69: 8–21. 2016.
- Crawford M.A., Bloom M., Broadhurst C.L., Schmidt W.F., Cunnane S.C., Galli C., Gehbremeskel K., Linseisen F., Lloyd-Smith J., Parkington J. Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. Lipids. 34: S39–S47. 1999.
- 58. SanGiovanni J.P., Chew E.Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. Prog. Retin. Eye Res. 24: 87–138. 2005.

- 59. Arterburn L.M., Hall E.B., Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. Am. J. Clin. Nutr. 83(6): 1467S-1476S. 2006.
- 60. Qin X., Park H.G., Zhang J.Y., Lawrence P., Liu G., Subramanian N., Kothapalli K.S.D., Brenna J.T. Brown but not white adipose cells synthesize omega-3 docosahexaenoic acid in culture. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 104: 19–24. 2016.
- 61. Bartelt A., Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. Nat. Rev. Endocrinol. 10(1): 24–36. 2014.
- 62. *Seale P.* Transcriptional regulatory circuits controlling brown fat development and activation. Diabetes. 64: 2369–2375. 2015.
- 63. *Betz M.J., Enerback S.* Human brown adipose tissue: what we have learned so far. Diabetes. 64: 2352–2360. 2015.
- 64. *Lidell M.E., Betz M.J., Enerback S.* Two types of brown adipose tissue in humans. Adipocyte. 3: 63–66. 2014.
- 65. Cunnane S.C., Francescutti V., Brenna J.T., Crawford M.A. Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosahexaenoate accumulation than formula fed infants not consuming dietary docosahexaenoate. Lipids. 35: 105–111. 2000.
- 66. *Simopoulos A.P.* Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. Exp. Biol. Med. 235: 785–795. 2010.
- Tassoni D., Kaur G., Weisinger R.S., Sinclair A.J. The role of eicosanoids in the brain. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 17(S1): 220–228. 2008.
- 68. *Tapiero H., Nguyen G., Couvreur P., Tew K.D.* Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. Biomed. Pharmacother. 56: 215-222. 2002.
- Janssen C.I.F., Kiliaan A.J. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. Prog. Lipid Res. 53: 1–17. 2014.
- Bazan N.G. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. Trends Neurosci. 29(5): 263–271. 2006.
- 71. *De Caterina R*. N-3 fatty acids in cardiovascular disease. N. Engl. J. Med. 364(25): 2439–2450. 2011.
- Rice H.B., Bernasconi A., Maki K.C., Harris W.S., Von Schacky C., Calder P.C. Conducting omega-3 clinical trials with cardiovascular outcomes: Proceedings of a workshop held at ISSFAL 2014. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 107: 30–42. 2016.
- 73. Albert C.M., Hennekens C.H., O'Donnell C.J., Ajani U.A., Carey V.J., Willett W.C., Ruskin J.N., Manson J.E. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. JAMA. 279(1): 23–28. 1998.
- 74. Hu F.B., Bronner L., Willett W.C., Stampfer M.J., Rexrode K.M., Albert C.M., Hunter D., Manson J.E. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. JAMA. 287: 1815–1821. 2002.
- 75. *Kromhout D., Giltay E. J., Geleijnse J. M.* Alpha omega trial group, n-3 fatty acids and cardio-vascular events after myocardial infarction. N. Engl. J. Med. 363: 2015–2026. 2010.
- Rauch B., Schiele R., Schneider S., Diller F., Victor N., Gohlke H., Gottwik M., Steinbeck G., Castillo U.D., Sack R., Worth H., Katus H., Spitzer W., Sabin G., Senges J. OMEGA, arandomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. Circulation. 122: 2152–2159. 2010.
- 77. Strand E., Pedersen E.R., Svingen G.F., Schartum-Hansen H., Rebnord E.W., Bjørndal B., Seifert R., Bohov P., Meyer K., Hiltunen J.K., Nordrehaug J.E., Nilsen D.W., Berge R.K., Nygård O. Dietary intake of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and risk of myocardial infarction in coronary artery disease patients with or without diabetes mellitus: a prospective cohort study. BMCMed. 11: 216. 2013.
- 78. Joffre C., Nadjar A., Lebbadi M., Calon F., Laye S. N-3 LCPUFA improves cognition: The young, the old and the sick. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 91: 1–20. 2014.
- 79. *Uauy R.D., Birch D.G., Birch E.E., Tyson J.E., Hoffman D.R.* Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low-birth-weight neonates. Pediatr. Res. 28(5): 485–492. 1990.
- Colombo J., Kannass K.N., Shaddy D.J., Kundurthi S., Maikranz J.M., Anderson C. J., Blaga O.M., Carlson S.E. Maternal DHA and the development of attention in infancy and toddlerhood. Child. Dev. 75(4): 1254–1267. 2004.
- Judge M.P., Harel O., Lammi-Keefe C.J. Maternal consumption of a docosahexaenoic acid containing functional food during pregnancy: Benefit for infant performance on problemsolving but not on recognition memory tasks at age 9 months. Am. J. Clin. Nutr. 85: 1572– 1577. 2007.
- Jiao J., Li Q., Chu J., Zeng W., Yang M., Zhu S. Effect of n-3 PUFA supplementation on cognitive function throughout the life span from infancy to old age: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. Am. J. Clin. Nutr. 100(6): 1422–1436. 2014.

- Tofail F., Kabir I., Hamadani J.D., Chowdhury F., Yesmin S., Mehreen F., Huda S.N. Supplementation of fish-oil and soy-oil during pregnancy and Psychomotor development of infants. J. Health Popul. Nutr. 24: 48–56. 2006.
- Dunstan J.A., Simmer K., Dixon G., Prescott S.L. Cognitive assessment of children at age 2(1/2) years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomized controlled trial. Arch. Dis. Child Fetal. Neonatal Ed. 93: F45–F50. 2008.
- 85. *Makrides M., Gibson R.A., McPhee A.J., Yelland L., Quinlivan J., Ryan P.* Effect of DHA supplementation during pregnancy on maternal depression and neurodevelopment of young children: a randomized controlled trial. JAMA. 304: 1675–1683. 2010.
- 86. *Givens D.I.* Manipulation of lipids in animal-derived foods: Can it contribute to public health nutrition? Eur. J. Lipid Sci. Technol. 117: 1306–1316. 2015.
- Dangour A.D., Allen E., Elbourne D., Fasey N., Fletcher A.E., Hardy P., Holder G.E., Knight R., Letley L., Richards M., Uauy R. Effect of 2-yn-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on cognitive function in older people: a randomized, double-blind, controlled trial. Am. J. Clin. Nutr. 91: 1725–1732. 2010.
- Yurko-Mauro K., McCarthy D., Rom D., Nelson E.B., Ryan A.S., Blackwell A., Salem N.Jr., Stedman M. Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. Alzheimers Dement. 6: 456–464. 2010.
- Dacks P.A., Shineman D.W., Fillit H.M. Current evidence for the clinical use of long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. J. Nutr. Health Aging. 17: 240–251. 2013.
- 90. Rondanelli M., Giacosa A., Opizzi A., Pelucchi C., La Vecchia C., Montorfano G., Negroni M., Berra B., Politi P., Rizzo A. Long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in the treatment of elderly depression: Effects on depressive symptoms, on phospholipids fatty acids profile and on health-related quality of life. J. Nutr. Health Aging. 15: 37–44. 2011.
- 91. *Calder P.C.* Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. Biochimie. 91: 791–795. 2009.
- Fetterman J., Zdanowicz M. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. Am. J. Health Syst. Pharm. 66: 1169–1179. 2009.
- 93. Figueras M., Olivan M., Busquets S., Lopez-Soriano F., Argiles J. Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) treatment on insulin sensitivity in an animal model of diabetes: Improvement of the inflammatory status. Obesity. 19: 362–369. 2011.
- 94. Wall R., Ross R., Fitzgerald G., Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. Nutr. Res. 68: 280–289. 2010.
- 95. *Hellmann J., Tang Y., Kosuri M., Bhatnagar A., Spitem M.* Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice. FASEB J. 25: 2399–2407. 2011.
- 96. Witte T. R., Hardman W. E. The effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid consumption on mammary carcinogenesis. Lipids. 50: 437–446. 2015.
- 97. Astorg P. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: A review of epidemiological and experimental evidence. Cancer Causes Control. 15(4): 367–386. 2004.
- Leitzmann M., Stampfer M., Michaud D., Augustsson K., Colditz G., Willett W., Giovannucci E. Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. Am. J. Clin. Nutr. 80(1): 204–216. 2004.
- Wu M., Harvey K., Ruzmeto N., Welch Z., Sech L., Jackson K., Stillwell W., Zaloga G., Siddiqui R. Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway. Int. J. Cancer. 117: 340–348. 2005.
- 100. *Murphy R., Mourtzakis M., Chu Q., Baracos V., Reima T., Mazurak V.* Nutritional intervention with fish oil provides a benefit over standard of care for weight and skeletal muscle mass in patients with nonsmall cell lung cancer receiving chemotherapy. Cancer. 117: 1775–1782. 2011.
- Morin C., Rousseau É., Fortin S. Anti-proliferative effects of a new docosapentaenoic acid monoacylglyceride incolorectal carcinoma cells. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 89: 203–213. 2013.
- 102. Buettner R., Parhofer K.G., Woenckhaus M., Wrede C.E., Kunz-Schughart L.A., Schölmerich J., Bollheimer L.C. Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. J. Mol. Endocrinol. 36: 485–501. 2006.
- 103. *Siriwardhana N., Kalupahana N.S., Moustaid-Moussa N.* Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. Adv. Food Nutr. Res. 65: 211–222. 2012.
- 104. *Givens D.I., Gibbs R.A.* Current intakes of EPA and DHA in European populations and the potential of animal-derived foods to increase them. Proc. Nutr. Soc. 67: 273–280. 2008.
- 105. *Eilander A., Harika R.K., Zock P.L.* Intake and sources of dietary fatty acids in Europe: Are current population intakes of fats aligned with dietary recommendations? Eur. J. Lipid Sci. Technol. 117(9): 1370–1377. 2015.

- 106. *Davis B.C., Kris-Etherton P.M.* Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: current knowledge and practical implications. Am. J. Clin. Nutr. 78(3): 640S–646S. 2003.
- 107. *Simopoulos A.P.* The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Exp. Biol. Med. 233: 674–688. 2008.
- 108. Townsend N., Nichols M., Scarborough P., Rayner M. Cardiovascular disease in Europe epidemiological update 2015. Eur. Heart J. 36: 2696–2705. 2015.
- 109. Бойцов С.А., Шальнова С.А., Деев А.Д. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации и возможные механизмы ее изменения. Журн. неврол. психиатр. им. С.С. Корсакова. 118(8): 98–103. 2018. [Boytsov S.A., Shalnova S.A., Deev A.D. Cardiovascular mortality in the Russian Federation and possible mechanisms of its changes. Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im S.S. Korsakova. 118(8): 98–103. 2018. [In Russ)].
- 110. FAO. Food and Agriculture Organisation. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO. Rome. 2016.
- Betancor M.B., Olsen R.E., Solstorm D., Skulstad O.F., Tocher D.R. Assessment of a land-locked Atlantic salmon (Salmo salar L.) population as a potential genetic resource with a focus on long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1861(3): 227–238. 2016.
- 112. Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Tolomeev A.P., Dgebuadze Y.Y. Meta-analysis of factors associated with omega-3 fatty acid contents of wild fish. Rev. Fish Biol. Fisher. 28: 277–299. 2018.
- 113. *Cheung L.K.Y., Tomita H., Takemori T.* Mechanisms of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid loss from Pacific Saury and comparison of their retention rates after various cooking methods. J. Food Sci. 81(8): C1899–C1907. 2016.
- 114. Gladyshev M.I., Glushchenko L.A., Makhutova O.N., Rudchenko A.E., Shulepina S.P., Dubovskaya O.P., Zuev I.V., Kolmakov V.I., Sushchik N.N. Comparative analysis of content of omega-3 polyunsaturated fatty acids in food and muscle tissue of fish from aquaculture and natural habitats. Contemp. Probl. Ecol. 11(3): 297–308. 2018.
- Huynh M.D., Kitts D.D. Evaluating nutritional quality of pacific fish species from fatty acid signatures. Food Chem. 114: 912–918. 2009.
- 116. Joordens J.C.A., Kuipers R.S., Wanink J.H., Muskiet F.A.J. A fish is not a fish: Patterns in fatty acid composition of aquatic food may have had implications for hominin evolution. J. Hum. Evol. 77: 107–116. 2014.
- 117. Kitson A.P., Patterson A.C., Izadi H., Stark KD. Pan-frying salmon in an eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) enriched margarine prevents EPA and DHA loss. Food Chem. 114: 927–932. 2009.
- 118. *Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Gubanenko G.A., Demirchieva S.M., Kalachova G.S.* Effect of boiling and frying on the content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of four fish species. Food Chem. 101: 1694–1700. 2007.
- 119. *Henriques J., Dick J.R., Tocher D.R., Bell J.G.* Nutritional quality of salmon products available from major retailers in the UK: content and composition of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. Br. J. Nutr. 112: 964–975. 2014.
- 120. *Cladis D.P., Kleiner A.C., Freiser H.H., Santerre C.R.* Fatty acid profiles of commercially available finfish fillets in the United States. Lipids. 49(10): 1005–1018. 2014.
- 121. Neff M.R., Bhavsar S.P., Ni F.J., Carpenter D.O., Drouillard K., Fisk A.T., Arts M.T. Risk-benefit of consuming Lake Erie fish. Environ Res. 134: 57-65. 2014.
- 122. Chuang L.T., Bulbul U., Wen P.C., Glew R.H., Ayaz F.A. Fatty acid composition of 12 fish species from the Black Sea. J. Food Sci. 77(5): C512–C518. 2012.
- 123. Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Gubanenko G.A., Demirchieva S.M., Kalachova G. S. Effect of way of cooking on content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of hump-back salmon (Oncorhynchus gorbuscha). Food Chem. 96: 446–451. 2006.
- 124. Gladyshev M.I., Lepskaya E.V., Sushchik N.N., Makhutova O.N., Kalachova G.S., Malyshevskaya K.K., Markevich G.N. Comparison of polyunsaturated fatty acids content in filets of anadromous and landlocked sockeye salmon Oncorhynchus nerka. J. Food Sci. 77(12): C1307– C1310. 2012.
- 125. *Heissenberger M., Watzke J., Kainz M.J.* Effect of nutrition on fatty acid profiles of riverine, lacustrine, and aquaculture-raised salmonids of pre-alpine habitats. Hydrobiologia. 650: 243–254. 2010.
- 126. Sahari M.A., Farahani F, Soleimanian Y, Javadi A. Effect of frozen storage on fatty acid composition of the different tissues of four scombrid and one dussumeriid species. J. Appl. Ichthyol. 30: 381–391. 2014.
- 127. Ahlgren G., Blomqvist P., Boberg M., Gustafsson I.-B. Fatty acid content of the dorsal muscle an indicator of fat quality in freshwater fish. J. Fish Biol. 45(1): 131–157. 1994.
- 128. Vasconi M., Caprino F., Bellagamba F., Busetto M.L., Bernardi C., Puzzi C., Moretti V.M. Fatty acid composition of freshwater wild fish in subalpine lakes: a comparative study. Lipids. 50: 283–302. 2015.

- 129. Wang D.H., Jackson J.R., Twining C., Rudstam L.G., Zollweg-Horan E., Kraft C., Lawrence P., Kothapalli K., Wang Z., Brenna J. T. Saturated branched chain, normal odd-carbon-numbered, and n-3 (omega-3) polyunsaturated fatty acids in freshwater fish in the Northeastern United States. J. Agric Food Chem. 64(40): 7512–7519. 2016.
- Sushchik N.N., Gladyshev M.I., Kalachova G.S., Makhutova O.N., Ageev A.V. Comparison of seasonal dynamics of the essential PUFA contents in benthic invertebrates and grayling *Thy*mallus arcticus in the Yenisei river. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 145: 278–287. 2006.
- 131. Sushchik N.N., Gladyshev M.I., Kalachova G.S. Seasonal dynamics of fatty acid content of a common food fish from the Yenisei River, Siberian grayling, *Thymallus arcticus*. Food Chem. 104: 1353–1358. 2007.
- 132. Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Gubanenko G.A., Makhutova O.N., Kalachova G.S., Rechkina E.A., Malyshevskaya K.K. Effect of the way of cooking on contents of essential polyunsaturated fatty acids in filets of zander. Czech. J. Food Sci. 32(3): 226–231. 2014.
- 133. Gladyshev M.I., Krylov A.V., Sushchik N.N., Malin M.I., Makhutova O.N., Chalova I.V., Kalacheva G.S. Transfer of essential polyunsaturated fatty acids from an aquatic to terrestrial ecosystem through the fish-bird trophic pair. Dokl. Biol. Sci. 431: 121–123. 2010.
- 134. FAO. How to feed the world in 2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 2009.
- 135. Pauly D., Christensen V., Guenette S., Pitcher T.J., Sumaila U.R., Walters C.J., Watson R., Zeller D. Towards sustainability in world fisheries. Nature. 418: 689–695. 2002.
- 136. *Tocher D.R.* Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. Aquaculture. 449: 94–107. 2015.
- 137. Wijekoon M.P.A., Parrish C.C., Mansou A. Effect of dietary substitution of fish oil with flaxseed or sunflower oil on muscle fatty acid composition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at varying temperatures. Aquaculture. 433: 74–81. 2014.
- 138. Benítez-Santana T., Masuda R., Juárez Carrillo E., Ganuza E., Valencia A., Hernández-Cruz C.M., Izquierdo M.S. Dietary n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream Sparus aurata larvae. Aquaculture. 264: 408–417. 2007.
- 139. *Sales J., Glencross B.D.* A meta-analysis of the effects of dietary marine oil replacement with vegetable oils on growth, feed conversion and muscle fatty acid composition of fish species. Aquacult. Nutr. 17: e271–e287. 2011.
- 140. *Turchini G.M., Torstensen B.E., Ng W.K.* Fish oil replacement in finfish nutrition. Rev. Aquacult. 1: 10–57. 2009.
- 141. *Turchini G.M., Ng W.K., Tocher D.R.* Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. Boca Raton. CRC Press Taylor and Francis Group. 2011.
- 142. *De Silva S.S.* Aquaculture: a newly emergent food production sector and perspectives of its impacts on biodiversity and conservation. Biodiversity and Conservation. 21: 3187–3220. 2012.
- 143. *Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Makhutova O.N.* Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. Prostagl. Other Lipid Mediat. 107: 117–126. 2013.
- 144. *Cao Y., Cao Y., Zhao M.* Biotechnological production of eicosapentaenoic acid: from a metabolic engineering point of view. Process Biochem. 47(9): 1320–1326. 2012.
- 145. Sijtsma L., de Swaaf M.E. Biotechnological production and applications of the ω-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 146–153. 2004.
- 146. Ward O.P., Singh A. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. Process Biochem. 40: 3627–3652. 2005.
- 147. *Damude H.G., Kinney A.J.* Engineering oilseed plants for a sustainable, land-based source of long chain polyunsaturated fatty acids. Lipids. 42: 179–185. 2007.
- 148. Mendes A., Reis A., Vasconcelos R., Guerra P., da Silva T.L. Crypthecodinium cohnii with emphasis on DHA production: a review. J. Appl. Phycol. 21: 199–214. 2009.
- 149. *Khozin-Goldberg I., Iskandarov U., Cohen Z.* LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91: 905–915. 2011.
- 150. *Raghukumar S.* Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. Marine Biotechnol. 10: 631–640. 2008.
- 151. Patel V. K., Soni N., Prasad V., Sapre A., Dasgupta S., Bhadra B. CRISPR-Cas9 system for genome engineering of photosynthetic microalgae. Mol. Biotechnol. 61: 541–561. 2019.
- 152. Work V.H., Radakovits R., Jinkerson R.E., Meuser J.E., Elliot L.G., Vinyard D.J., Laurens L.M.L., Dismukes G.C., Posewitz M.C. Increased lipid accumulation in the Chlamydomonas reinhardtii sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. Eukaryot. Cell. 9(8): 1251–1261. 2010.
- 153. Ajjawi I., Verruto J., Aqui M., Soriaga L.B., Coppersmith J., Kwok K., Peach L., Orchard E., Kalb R., Xu W., Carlson T.J., Francis K., Konigsfeld K., Bartalis J., Schultz A., Lambert W., Schwartz A.S., Brown R.,

Moellering E.R. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. Nat. Biotechnol. 35(7): 647–652. 2017.

- 154. Poliner E., Pulman J. A., Zienkiewicz K., Childs K., Benning C., Farre E. M. A toolkit for Nannochloropsis oceanica CCMP1779 enables gene stacking and genetic engineering of the eicosapentaenoic acid pathway for enhanced long-chain polyunsaturated fatty acid production. Plant. Biotechnol. J. 16: 298–309. 2018.
- 155. Rubio-Rodriguez N., Beltran S., Jaime I., de Diego S.M., Sanz M., Carballido J. R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. Innov. Food Sci. Emerg. 11: 1–12. 2010.
- 156. *Napier J.A., Haslam R.P., Beaudoin F., Cahoon E.B.* Understanding and manipulating plant lipid composition: Metabolic engineering leads the way. Curr. Opin. Plant Biol. 19: 68–75. 2014.
- 157. Napier J.A., Usher S., Haslam R.P., Ruiz-Lopez N., Sayanova O. Transgenic plants as a sustainable, terrestrial source of fish oils. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 117: 1317–1324. 2015.
- 158. Betancor M.B., Sprague M., Usher S., Sayanova O., Campbell P.J., Napier J.A., Tocher D.R. A nutritionally-enhanced oil from transgenic *Camelina sativa* effectively replaces fish oil as a source of eicosapentaenoic acid for fish. Scient. Rep. 5: 8104. 2015.
- 159. Usher S., Haslam R.P., Ruiz-Lopez N., Sayanova O., Napier J.A. Field trial evaluation of the accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic *Camelina sativa*: making fish oil substitutes in plants. Metab. Eng. Commun. 2: 93–98. 2015.
- 160. Ruiz-Lopez N., Haslam R.P., Napier J.A., Sayanova O. Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. Plant J. 77: 198–208. 2014.
- 161. Betancor M.B., Sprague M., Sayanova O., Usher S., Campbell P.J., Napier J.A., Caballero M.J., Tocher D.R. Evaluation of a high-EPA oil from transgenic Camelina sativa in feeds for Atlantic salmon (Salmo salar L.): Effects on tissue fatty acid composition, histology and gene expression. Aquaculture. 444: 1–12. 2015.
- 162. Hixson S.M., Parrish C.C., Anderson D.M. Full substitution of fish oil with camelina (Camelina sativa) oil, with partial substitution of fish meal with camelina meal, in diets for farmed Atlantic salmon (Salmo salar) and its effect on tissue lipids and sensory quality. Food Chem. 157: 51–61. 2014.
- 163. Napier J.A., Olsen R.-E., Tocher D.R. Update on GM canola crops as novel sources of omega-3 fish oils. Plant Biotechnol. J. 17: 703–705. 2019.

Essential PUFA in Physiology and Metabolism of Fish and Human: Functions, Needs, Sources

O. N. Makhutova^{*a*, *b*, * and M. I. Gladyshev^{*a*, *b*}}

^a Institute of Biophysics of Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia

^bSiberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia *e-mail: makhutova@ibp.krasn.ru

The long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the omega-3 family (ω 3 or n-3), namely eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), are recognized as molecules of high physiological values for animals of different taxonomic groups, including humans. N-3 PUFAs provide the normal functioning of the cardiovascular and nervous systems, immunity and metabolism in general, and their use is preventive. The medicinal properties of these PUFAs are ambiguous and are being actively discussed in the literature. The main source of EPA and DHA for human is fish. The content of n-3 PUFAs in fish depends on a number of factors and, as a result, varies widely. The needs of the different fish species in the PUFAs are not the same. Some species efficiently synthesize EPA and DHA from their precursors, while others obtain these FAs only with food. Moreover, n-3 PUFAs play important roles in the metabolism of all fishes. The catch of wild fish has reached its limit, but it does not satisfy the needs of mankind in n-3 PUFAs. To reduce the deficiency of EPA + DHA in human nutrition, there are several ways: aquaculture, biotechnology of microorganisms (single cell oils) and genetic engineering.

Keywords: eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, aquatic ecosystem, aquaculture food, human diet, human disease prevention

621

ЦИТИРОВАТЬ:

Махутова О.Н., Гладышев М.И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты в физиологии и метаболизме рыб и человека: значение, потребности, источники. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(5): 601–621.

DOI: 10.31857/S0869813920050040

TO CITE THIS ARTICLE:

Makhutova O.N., Gladyshev M.I. Essential PUFA in Physiology and Metabolism of Fish and Human: Functions, Needs, Sources. Russian Journal of Physiology. 106(5): 601–621. DOI: 10.31857/S0869813920050040 РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 5, с. 622-630

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ПО ЛИПИДОЛОГИИ

ВЛИЯНИЕ ФОТОПЕРИОДА НА ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР МОЛОДИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ SALMO SALAR L.

© 2020 г. Н. Н. Немова^{1, *}, З. А. Нефедова¹, С. Н. Пеккоева¹, В. П. Воронин¹, Т. Р. Руоколайнен¹, С. А. Мурзина¹

¹Институт биологии Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук", Петрозаводск, Россия

*E-mail: nnnemova@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.2020 г. После доработки 06.03.2020 г. Принята к публикации 13.03.2020 г.

На выращиваемой в условиях рыбоводного завода молоди (двухлеток 1+) атлантического лосося Salmo salar L. с августа по октябрь проведен эксперимент по влиянию двух световых режимов: 16/8 (16 ч – свет и 8 ч – темнота) и 24/0 (24 ч – свет) на липидный состав организма в процессе роста и развития. Проанализирован уровень общих липидов (ОЛ), структурных липидов – фосфолипидов¹ (ФЛ) и их классов (ФХ, ФЭА, ФС, ФИ, СФМ, ЛФХ), холестерина (ХС), запасных липидов – триацилглицеринов (ТАГ), а также диацилглицеринов (ДАГ), свободных жирных кислот (СЖК), эфиров холестерина (ЭХС). Показано, что в процессе роста двухлеток лосося (с августа по октябрь) индекс отношения структурных липидов к запасным $\Phi \Pi + XC/TA\Gamma + \Im XC$ повышается в большей степени у особей, развитие которых проходило под воздействием экспериментальных световых режимов, чем в контрольных вариантах. Полученные данные указывают на преобладание структурного роста органов и тканей над жиронакоплением в большей степени у рыб при дополнительном освещении в данный период. Эти изменения сопровождались повышенным темпом роста молоди лосося в сентябре и октябре при двух световых режимах по сравнению с контролем и таковыми в августе.

Ключевые слова: липиды, фотопериод, атлантический лосось *Salmo salar* L., искусственное выращивание

DOI: 10.31857/S0869813920050064

Известно, что у подавляющего большинства видов рыб, как и у других живых организмов, ритмы питания и физиологической активности определяются циклом освещения, им присущи суточные колебания (циркадные ритмы), активность которых регулируется эндокринной системой [1, 2]. Ранее было обнаружено, что разные возрастные группы атлантического лосося, лучше питаются и растут при более продолжительном освещении [3, 4]. Свет является одним из важных факторов внешней среды, который оказывает влияние на физиолого-биохимическое состояние организмов, в том числе, на метаболизм липидов (липогенез, липолиз, утилизацию липидов). Показано, что продолжительность светового дня и температура

Сокращения: ОЛ – общие липиды; ФЛ – фосфолипиды; ФИ – фосфатидилинозит; ФС – фосфатидилсерин; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭА – фосфатидилэтаноламин; СФМ – сфингомиелин; ЛФХ – лизофосфатидилхолин; ТАГ – триацилглицерины; ДАГ – диацилглицерины; СЖК – свободны жирные кислоты; ХС – холестерин; ЭХС – эфиры холестерина.

являются основными модифицирующими факторами, влияющими на процесс смолтификации лосося [5]. Некоторые авторы полагают, что подбором температуры и фотопериода можно добиться лучшего роста рыб и повлиять на возраст смолтификации молоди [6]. Было показано, что среди классов фосфолипидов личинок и молоди морских и проходных рыб наиболее важными являются ФХ и ФИ, наличие которых в корме обеспечивает более эффективный рост и хорошее физиологическое состояние рыб [7–9]. В настоящей работе изучили влияние разных режимов освещения на содержание общих липидов (ОЛ) и их отдельных классов, а также на соотношение суммы структурных липидов к запасным (ФЛ + XC/TAГ + ЭХС) у искусственно выращиваемой молоди лосося (двухлеток 1+) в условиях рыбоводного завода (Республика Карелия, пос. Сосновец, Беломорский район).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперимент по влиянию двух режимов фотопериода (16/8 и 24/0) на липидный статус двухлеток (1+) атлантического лосося проводили в условиях рыбоводного завода. Были использованы экспериментальные бассейны размером 2 × 2 м, на каждый из исследованных фоторежимов приходилось по два бассейна, так что рыбы забирались из них согласно световому воздействию и формировали три группы. Исследованы три группы рыб: группа № 1 – контроль, режим освещения, который используется на заводе при выращивании молоди рыб; группа № 2 – режим освещения 16/8 (16 ч света и 8 ч – темноты); группа № 3 – режим освещения постоянный 24/0 (24 ч). Все остальные условия содержания во всех бассейнах были одинаковыми: плотность посадки, режим кормления (согласно потребностям возрастной группы 1+), профилактические меры и уход за бассейнами. В контрольном бассейне содержались двухлетки лосося в условиях естественного освещения в выростных цехах завода. Использовали коммерческий корм марки BioMar A/C (Дания): Inicio+917 (стартовый корм № 2 для двухлеток 1+). Экспериментальные бассейны были оборудованы двумя светодиодными светильниками (Aquel leddy smart led sunny, 6W, 6500K) и накрыты черной, не пропускающей свет пленкой. Переключение режимов происходило автоматически с помощью розеток-таймеров (Ferron TM-50). Количество особей двухлеток (1+), находившихся при каждом из исследованных режимов освещения составляло 1246 шт. Температурный режим был естественным. Колебания температуры за период исследования составили: в июле (14.8–19.9°C), августе (18.2– 13.8°С), сентябре (13.8–9.8°С), октябре (9.8–2.4°С). Средняя масса отобранных для эксперимента мальков в июле была в пределах 10.16-10.25 (±0.05) г.

Для исследования были отобраны (31 июля) двухлетки лосося в количестве 160 особей/бассейн, которые были помечены с помощью чипов (FelixcanSL, Испания), для чего они были усыплены при помощи гвоздичного масла. После измерения массы и длины рыбе вводили чип с индивидуальным номером. Средняя масса отобранных для исследования рыб в каждом бассейне составила: 10.20 + 0.13 г (№ 1 – контроль), 10.25 + 0.04 г (№ 2 – режим освещения 16/8), 10.16 + 0.15 г (№ 3 – режим освещения 24/0). Пробы на липидный анализ отбирали один раз в конце месяца (август, сентябрь, октябрь). Замеры чипированных рыб (30–40 штук) проводили каждый месяц. Исследование длилось до конца октября.

Отобранные образцы молоди лосося гомогенизировали в небольшом количестве смеси хлороформ—метанол (2 : 1) и хранили до анализа на холоде (4°С). Липиды экстрагировали и очищали по методу Фолча [10] и Кейтса [11]. Затем их концентрировали с помощью роторно-вакумной установки. Выделенные суммарные липиды и обезжиренный остаток (включающий белки, углеводы, нуклеиновые кислоты, аминокислоты и микроэлементы) сушили до постоянной массы.

Качественное и количественное определение отдельных липидных классов осуществляли при помощи метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Фракционирование общих липидов проводили на пластинках на стеклянной основе – HPTLC Silicagel 60 F254 Premium Purity (Merck, Германия). Нанесение экстракта липидов осуществлялось при помощи полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (CAMAG, Швейцария) микрошприцом на 100 мкл штриховым методом, шириной 6 мм, на расстоянии 8 мм от края пластинки. В качестве элюента, а также раствора для насыщения хроматографической камеры ADC2 (САМАG, Швейцария), использовалась система растворителей гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (32:8:0.8 по объему) [12]. Насыщение хроматографической камеры проводили в течение 20 мин с одновременным контролем влажности (10 мин), после чего проводилось насыщение пластины (20 мин). Дистанция подвижной фазы составляла 80 мм (Rf конечная = 80 мм), сушка пластины осуществлялась в течение 5 мин. Проявление липидных пятен проводили в растворе медного купороса ($CuSO_4$) с ортофосфорной кислотой (H_3PO_4) и нагреванием пластины до 160°C в течение 15 мин [13]. Качественное и количественное определение липидных компонентов было выполнено в камере денситометра TLC Scanner 4 (САМАG, Швейцария) на дейтериевой лампе при длине волны 350 нм в режиме адсорбции [13]. Идентификация липидных классов проводилась по референтным стандартам соответствующих компонентов (Sigma-Aldrich, США) с учетом соответствия значений Rf.

Состав индивидуальных фосфолипидов – фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозитола (ФИ), сфингомиелина (СФМ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ) анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на стальной колонке Nucleosil 100-7 (Элсико, Москва), используя элюент ацетонитрил–гексан–метанол–ортофосфорная кислота (918 : 30 : 30 : 17.5). Детектирование проводили по степени поглощения света при 206 нм [14]. Соотношение между компонентами оценивали по величинам площадей пиков на хроматограммах.

Данные в табл. 1 и 2 представлены в виде $M \pm \text{SEM}$ (ошибка среднеарифметического). Обработка результатов проводилась при помощи непараметрического метода теста ранговых сумм Вилкоксона–Манна–Уитни в открытой среде программирования R [15]. Различия считаются достоверными при $p \le 0.05$.

Исследования выполнены на базе лаборатории экологической биохимии с использованием оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследований представлены в табл. 1 и 2. У мальков (1+) лосося из бассейнов с разным режимом фотопериода (контроль, свет 16/8 и 24/0 ч) за период август-сентябрь содержание общих липидов (ОЛ) было в пределах 26.24–30.16% сухой массы. В этот период у них в составе ОЛ доминировали запасные ТАГ (в пределах 14.94–17.19% сухой массы). У мальков в августе при световом режиме 16/8 отмечено незначительное, но достоверное повышение (относительно контроля) содержания ФЛ (за счет ФИ, ФС, ФЭА, ФХ), а также ДАГ, ХС, СЖК, индекса ФЛ + XC/TAГ + ЭХС при снижении индекса ХС/ФЛ. В опытной партии мальков при режиме 24/0 (относительно контроля и режима 16/8 произошло повышение ФЛ (за счет ФХ, ЛФХ и СФМ), а также ДАГ, ХС и индекса ФЛ + XC/TAГ + ЭХС при снижении индекса ХС/ФЛ. В опытной партии мальков при режиме 24/0 (относительно контроля и режима 16/8 произошло повышение ФЛ (за счет ФХ, ЛФХ и СФМ), а также ДАГ, ХС и индекса ФЛ + ХС/TАГ + ЭХС при снижении индекса ХС/ФЛ. В августе влияние режима фотопериода 16/8 и 24/0 отрицательно отразилось на массе мальков экспериментальных групп (до 16.61 г и 19.08 г соответственно против 21.62 г). Снижение массы рыб из опытных бассейнов совпа-

Таблица 1. Содержание общих липидов и липидных классов (фосфолипиды, триацилглицерины, диацилглицерины, эфиры холестерина, холестерин, свободные жирные кислоты) (% сухой массы) у молоди Атлантического лосося (*Salmo salar* L.) возраста 1+, выращенной на рыбзаводе при разном световом режиме

Table 1. The content of total lipids and lipid classes (phospholipids, triacylglycerols, diacylglycerols, cholesterol esters, cholesterol, free fatty acids) (% dry weight) in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 1+ age reared in a fish farm under different light regimes

Mecяц Month		Август August			Сентябрь September			Октябрь October	
Группы Groups	Контроль Control (1)	16 ч – свет/8 ч – темнота 16 h – light/8 h – dark (2)	24 ч – свет 24 h – light (3)	Kohtpojib Control (1)	16 ч – свет/8 ч – темнота 16 h – light/8 h – dark (2)	24 ч – свет 24 h - light (3)	Kohtpojib Control (1)	16 ч – свет/8 ч – темнота 16 h – light /8 h – dark (2)	24 ч – свет 24 h – light (3)
n	15	15	15	15	15	15	14	15	14
Macca, r Weight, g	${}^{21.62\pm}_{\pm0.79}$	$^{16.61\pm}_{\pm0.80^{1}}$	${}^{19.08\pm}_{\pm0.51^{12}}$	${}^{26.71\pm}_{\pm1.76^{B}}$	${}^{26.67\pm}_{\pm1.38^{B}}$	${}^{25.32\pm}_{\pm1.01^{\rm B}}$	${}^{28.14\pm}_{\pm2.29^{B}}$	$^{27.49\pm}_{\pm1.56^{B}}$	${}^{29.57\pm}_{\pm1.48}{}^{\rm B}$
Длина, см Length, cm	$^{11.86\ \pm}_{\pm\ 0.13}$	${}^{10.95\pm}_{\pm0.18^1}$	$^{11.13}_{\pm 0.09^{1}}$	${}^{12.99\pm}_{\pm0.31^{B}}$	$\begin{array}{c} 13.01 \pm \\ \pm \ 0.21^{B} \end{array}$	$^{12.75\pm}_{\pm0.19^{B}}$	$^{13.48\pm}_{\pm0.33^{B}}$	$^{13.40\pm}_{\pm0.26^{B}}$	$^{13.81\pm}_{\pm0.22^{\text{BC}}}$
ОЛ TL	26.69 ± ± 1.01	${}^{29.52\pm}_{\pm0.76^1}$	29.99 ± 0.66^{1}	$26.24 \pm \pm 0.83$	${}^{28.55\pm}_{\pm0.85^1}$	${ \begin{array}{c} 30.16 \pm \\ \pm \ 0.82^{1} \end{array} }$	$^{18.56\pm}_{\pm1.11^{\rm BC}}$	17.93 ± 1.26^{BC}	$^{15.90\pm}_{\pm0.98^{BC1}}$
ФЛ PL	$3.49 \pm \pm 0.14$	${}^{4.62\pm}_{\pm0.13^1}$	${5.29 \pm \atop \pm 0.15^{12}}$	$^{4.40\pm}_{\pm0.15^{B}}$	${5.57 \pm \atop \pm 0.20^{B1}}$	$5.32 \pm \pm 0.17^{1}$	${3.14} \pm \ \pm 0.23^{C}$	3.37 ± 0.28^{BC}	$^{2.98\pm}_{\pm0.19^{BC}}$
ДАГ DAG	${}^{1.41~\pm}_{\pm~0.07}$	$^{1.59\pm}_{\pm0.04^{1}}$	$^{1.76\pm}_{\pm0.05^{12}}$	$1.65 \pm \pm 0.14$	$^{1.88\pm}_{\pm0.09^{B1}}$	$1.73 \pm \pm 0.08$	$\substack{1.10\ \pm\\ \pm\ 0.17^{\text{BC}}}$	$^{0.94\pm}_{\pm0.08^{\rm BC}}$	${}^{0.73\pm}_{\pm0.04^{BC1}}$
XC CHOL	$2.69 \pm \pm 0.10$	$3.41 \pm \\ \pm 0.09^{1}$	${}^{3.80\pm}_{\pm0.08^{12}}$	$2.85 \pm \pm 0.08$	$3.23 \pm \pm 0.09^{1}$	${}^{3.51\pm}_{\pm0.07^{\rm B12}}$	$2.86 \pm \pm 0.16$	$\begin{array}{c} 2.75 \pm \\ \pm \ 0.21^B \end{array}$	$^{2.51\pm}_{\pm0.17^{\rm BC}}$
СЖК FFA	${}^{1.10~\pm}_{\pm~0.06}$	$^{1.31\pm}_{\pm0.06^{1}}$	$1.27 \pm \pm 0.08$	${}^{0.89\pm}_{\pm0.05^{B}}$	${}^{0.92\pm}_{\pm0.04^B}$	$^{1.20\pm}_{\pm0.05^{12}}$	${0.43 \pm \atop 0.03^{\rm BC}}$	${}^{0.75\pm}_{\pm0.05^{BC1}}$	$^{0.60\pm}_{\pm0.04^{BC12}}$
ТАГ TAG	$16.78 \pm \pm 0.68$	17.19 ± ± 0.49	$16.42 \pm \pm 0.44$	$^{14.94\pm}_{\pm0.54^{B}}$	$15.73 \pm \pm 0.52$	$16.42 \pm \pm 0.52$	$^{10.18\ \pm}_{\pm\ 0.72^{BC}}$	$^{9.42\pm}_{\pm0.66^{BC}}$	$^{8.36\pm}_{\pm0.53^{BC}}$
ЭХС Chol ester	${}^{1.27~\pm}_{\pm~0.05}$	$1.39 \pm \pm 0.04$	$^{1.45\pm}_{\pm0.06}$	$^{1.64\pm}_{\pm0.07^{B}}$	$^{1.20\pm}_{\pm0.05^{B1}}$	$^{1.98\pm}_{\pm0.08^{B12}}$	$^{1.02\pm}_{\pm0.08^{\rm BC}}$	${}^{0.70\pm}_{\pm0.07^{BC1}}$	${}^{0.73\pm}_{\pm0.06^{BC1}}$
ХС/ФЛ CHOL/PL	$0.77 \pm \pm 0.01$	${}^{0.74\pm}_{\pm0.01^1}$	$\begin{array}{c} 0.72 \\ \pm \ 0.02^1 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.65 \pm \\ \pm \ 0.01^{\text{B}} \end{array}$	${}^{0.58\pm}_{\pm0.01^{B1}}$	${}^{0.66\pm}_{\pm0.02^{\text{B2}}}$	${}^{0.93\pm}_{\pm0.03^{\hbox{BC}}}$	$_{\pm0.02^{BC1}}^{0.82\pm}$	${}^{0.85\pm}_{\pm0.02^{BC1}}$
Φ JI + XC/ TAF + \Im XC PL + CHOL/ TAG + Chol esters	$0.34 \pm \pm 0.03$	$0.43 \pm \pm 0.03$	$0.51 \pm \pm 0.05$	$0.44 \pm \pm 0.05$	$0.52 \pm \pm 0.05$	$0.48 \pm \pm 0.03$	$0.55 \pm \pm 0.12$	$0.61 \pm \pm 0.10$	$0.61 \pm \pm 0.05$

Условные обозначения: Данные в таблице представлены в виде $M \pm SEM$ (ошибка среднего арифметического). ОЛ – общие липиды, Φ Л – фосфолипиды, ТАГ – триацилглицерины, ДАГ – диацилглицерины, ЭХС – эфиры холестерина, ХС – холестерин, СЖК – свободные жирные кислоты; n – количество проб. ^В – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых в августе у рыб, содержащихся при однотипном режиме светового освещения; ^С – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых в сентябре у рыб, содержащихся при однотипном режиме освещения; ¹ – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых у рыб, составляющих группу № 1; ² – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых у рыб, составляющих группу № 2. The data in the table are presented as $M \pm SEM$ (standard error of mean). TL – total lipids, PL – phospholipids,

The data in the table are presented as $M \pm \text{SEM}$ (standard error of mean). TL – total lipids, PL – phospholipids, TAG – triacylglycerols, DAG – diacylglycerols, Chol esters – cholesterol esters, CHOL – cholesterol, FFA – free fatty acids; n – the number of samples. B – significant differences ($p \le 0.05$) from those in August, fish exposed same light regime; C – significant differences ($p \le 0.05$) from those in September, fish exposed same light regime; 1 – significant differences ($p \le 0.05$) from those in fish from group 1; 2 – significant differences ($p \le 0.05$) from those in fish from the group 2.

Таблица 2. Содержание отдельных классов фосфолипидов (% сухой массы) у молоди Атлан
тического лосося (Salmo salar L.) возраста 1+, выращенной на рыбзаводе при разном свето
вом режиме

Table 2. The con	ntent of phospholipid	classes (% dry	weight) in ju	uvenile Atlantic	salmon (<i>Salm</i>	o salar L.)
1+ age reared in	a fish farm under di	fferent light re	egimes			

Mесяц Month		Август August			Сентябрь Октябрь September October				
Группы Groups	Контроль Control (1)	16 ч – свет/8 ч – темнота 16 h – light/8 h – dark (2)	24 ч – свет 24 h – light (3)	Контроль Control (1)	16 ч – свет/ 8 ч – темнога 16 h – light/8 h – dark (2)	24 ч – свет 24 h– light (3)	Контроль Control (1)	16 ч – свет/ 8 ч – темнота 16 h – light/8 h – dark (2)	24 ч – свет 24 h – light (3)
п	15	15	15	15	15	15	15	15	15
ФЛ PL	$3.49 \pm \pm 0.14$	${}^{+.62\pm}_{\pm0.13^1}$	${}^{5.29\pm}_{\pm0.15^{12}}$	$^{\rm 4.40\pm}_{\pm0.15^{\rm B}}$	${}^{5.57\pm}_{\pm0.20^{B1}}$	${5.32 \pm \atop \pm 0.17^{1}}$	$\begin{array}{c} 3.14 \pm \\ \pm \ 0.23^{C} \end{array}$	$\substack{3.37 \\ \pm 0.28}^{\underline{+}} \\ \text{BC}$	$^{2.98\pm}_{\pm0.19^{BC}}$
ФИ PI	${0.15 \pm \pm 0.01}$	${ \begin{array}{c} 0.19 \pm \\ \pm \ 0.01^{1} \end{array} }$	${ \begin{array}{c} 0.19 \pm \\ \pm \ 0.01^{1} \end{array} }$	$0.16 \pm \pm 0.01$	$^{0.22\pm}_{\pm0.01^{B1}}$	${}^{0.16\pm}_{\pm0.01^{B1}}$	$\substack{0.07 \ \pm \\ \pm \ 0.01^{BC}}$	$\substack{0.12 \ \pm \\ \pm \ 0.01^{BC1}}$	$^{0.08\pm}_{\pm0.01^{\rm BC2}}$
ΦC PS	${0.07 \pm \pm 0.01}$	${}^{0.10\pm}_{\pm0.01^1}$	${}^{0.09\pm}_{\pm0.01^1}$	$0.09 \pm \pm 0.01$	$^{0.08\pm}_{\pm0.01^{B1}}$	${}^{0.08\pm}_{\pm0.01^2}$	$^{0.06\pm}_{\pm0.01^{C}}$	$\substack{0.05\ \pm\\ \pm\ 0.01^{BC}}$	$\substack{0.06\ \pm\\ \pm\ 0.01^{BC}}$
ФЭА РЕА	${0.43 \pm \pm 0.03}$	${}^{0.57\pm}_{\pm0.03^1}$	${}^{0.51\pm}_{\pm0.03^1}$	${0.57 \pm \pm 0.06}$	$0.55 \pm \pm 0.04$	${}^{0.78\pm}_{\pm0.04^{B}}$	${0.48} \pm {\pm 0.05}$	${0.48 \pm \atop \pm 0.05}$	$^{0.48\pm}_{\pm0.03^{C}}$
ФХ РС	$2.61 \pm \pm 0.13$	${}^{3.50\pm}_{\pm0.13^1}$	${}^{3.74\pm}_{\pm0.11^1}$	$^{3.28\pm}_{\pm0.11^{B}}$	$\substack{4.34 \pm \\ \pm \ 0.18^B}$	${}^{3.90\pm}_{\pm0.16^{12}}$	$^{2.34\pm}_{\pm0.21^{C}}$	$^{2.49\pm}_{\pm0.22^{BC}}$	$\substack{2.22 \\ \pm 0.14^{BC}}$
ЛФХ LPC	$0.14 \pm \pm 0.01$	$0.15 \pm \pm 0.03$	${}^{0.22\pm}_{\pm0.04^{12}}$	$\begin{array}{c} 0.19 \pm \\ \pm \ 0.01^B \end{array}$	${}^{0.24\pm}_{\pm0.02^{B1}}$	${}^{0.26\pm}_{\pm0.02^1}$	$\substack{0.05\ \pm\\ \pm\ 0.01^{BC}}$	$\substack{0.08\ \pm\\ \pm\ 0.01^{BC1}}$	$^{0.03\pm}_{\pm0.01^{BC2}}$
СФМ SFM	$\begin{array}{c} 0.01 \pm \\ \pm \ 0.00 \end{array}$	${0.01 \pm \atop \pm 0.00}$	$^{0.02\pm}_{\pm0.004^{12}}$	$\begin{array}{c} 0.02 \pm \\ \pm \ 0.002^B \end{array}$	$0.02 \pm \pm 0.004$	$\begin{array}{c} 0.02 \pm \\ \pm \ 0.002^1 \end{array}$	${}^{0.01\pm}_{\pm0.00}{}^{\rm C}$	$\substack{0.01 \ \pm \\ \pm \ 0.00^{BC}}$	$^{0.005\pm}_{\pm0.00^{BC1}}$
Неизвестные Unknown	$0.16 \pm \pm 0.03$	${}^{0.29\pm}_{\pm0.02^1}$	${ \begin{array}{c} 0.35 \pm \\ \pm \ 0.05^1 \end{array} }$	$\begin{array}{c} 0.10 \pm \\ \pm \ 0.01^{B} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.12 \pm \\ \pm \ 0.01^{B} \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.12 \pm \\ \pm \ 0.02^{B} \end{array}$	$0.12 \pm \pm 0.02$	$\begin{array}{c} 0.14 \pm \\ \pm \ 0.02^B \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.10 \pm \\ \pm \ 0.01^B \end{array}$

Условные обозначения: Данные в таблице представлены в виде $M \pm SEM$ (ошибка среднего арифметического). ФИ – фосфатидилиназитол, ФС – фосфатидилсерин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СФМ – сфингомиелин; n – количество проб. ^В – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых в августе у рыб, содержащихся при однотипном режиме светового освещения; ^С – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых в сентябре у рыб, содержащихся при однотипном режиме светового освещения; ¹ – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых у рыб, составляющих группу № 1: ² – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых у рыб, составляющих группу № 2

№ 1; ² – отличия достоверны ($p \le 0.05$) от таковых у рыб, составляющих группу № 2. The data in the table are presented as M ± SEM (standard error of mean). PI – phosphatidylinositol, PS – phosphatidylserine, PEA – phosphatidylethanolamine, PC – phosphatidylcholine, LPC – lysophosphatidylcholine, SPM – sphingomyelin; n – the number of samples. B – significant differences ($p \le 0.05$) from those in August, fish exposed same light regime; C – significant differences ($p \le 0.05$) from those in September, fish exposed same light regime; 1 – significant differences ($p \le 0.05$) from those in fish from group 1; 2 – significant differences ($p \le 0.05$)

ло с повышением индекса $\Phi \Pi$ + XC/TAГ + ЭХС, причем в августе индекс $\Phi \Pi$ + + XC/TAГ + ЭХС был в большей степени выше у рыб при режиме 24/0 по сравнению с контрольным вариантом и режимом 16/8. В сентябре, как и в августе, при двух режимах фотопериода отмечено незначительное, но достоверное повышение (относительно контроля) содержания ОЛ за счет $\Phi \Pi$ (в том числе ΦU – при режиме 16/8, $\Phi \Im A$ – при 24/0, $\Phi Xu \ \Pi \Phi X$ – при 16/8 и 24/0 и снижение ΦC – при 16/8), а также повышение ДАГ (при 16/8), XC (при 16/8 и 24/0), CЖК(при 24/0), вариации ЭХС и индекса XC/ $\Phi \Pi$. Причем индекс $\Phi \Pi$ + XC/TAГ + ЭХС (отношение суммы структурных липидов к запасным) в период август–сентябрь был выше у мальков при искусственном освещении по сравнению с контролем (в августе – более высокий при режиме 24/0, в сентябре – при режиме 16/8). У мальков в сентябре по сравнению с таковым в августе темп роста в опытных бассейнах был выше, чем в контроле (в 1.6, в 1.33 и в 1.23 раза, соответственно, при свете 16/8, 24/0 и контроле). В сентябре темп роста мальков (1+) в опытных вариантах был выше (особенно при режиме 16/8), по массе и длине они почти сравнялись с контрольной группой. Отмеченный темп роста у экспериментальных рыб (особенно при режиме 16/8) положительно коррелировал с более повышенным индексом $\Phi \Pi + XC/TA\Gamma + \Im XC$, что указывает на преобладание структурного роста органов и тканей над жиронакоплением. В октябре (по сравнению с периодом август-сентябрь) содержание ОЛ достоверно снизилось у мальков (1+) из всех исследованных вариантов, но в большей степени – при режиме 24/0 (до 15.90% сухой массы). При этом снижение доли Φ Л (в основном Φ ЭА, Φ Х, Л Φ Х, С Φ М, Φ С и Φ И), а также ХС и ТАГ произошло как в контрольном, так и в опытных вариантах и практически не зависело от режима фотопериода. В октябре при режиме 16/8 и 24/0 у мальков лосося отмечено снижение (относительно контроля) ЭХС, ДАГ, индексов ХС/ФЛ (повышение ФЛ + + ХС/ТАГ + ЭХС) при росте СЖК. Снижение доли ДАГ и ЭХС положительно коррелировало с повышением СЖК, уровень которых относительно контроля повышался (в 1.7 и 1.4 раза при режиме 16/8 и 24/0 соответственно). Темп роста мальков в октябре, как и в сентябре (по сравнению с таковыми в августе) был выше при световых режимах 16/8 и 24/0, чем в контроле (в 1.65, 1.55 и 1.3 раза соответственно). При этом индекс $\Phi \Pi + XC/TA\Gamma + \Im XC$ у молоди, выращиваемой при световых режимах 16/8 и 24/0, оставался достоверно повышенным и равным (0.61) по сравнению с контролем (0.55).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Доминирование ТАГ (запасных липидов) в составе ОЛ у двухлеток лосося по мере их роста объясняется тем, что мальки должны накопить энергетические резервы, необходимые как для успешной адаптации молоди при изменении осмолярности среды обитания при выпуске ее из пресной воды в морскую, так и для последующей ее миграции к местам нагула в море. Влияния различных режимов фотопериода на процесс накопления ТАГ в организме двухлеток лосося в исследуемый период (с августа по октябрь) не выявлено. Достоверная разница между контрольными и опытными (режим освещения 16/8 и 24/0) группами молоди лосося была обнаружена в содержании суммарных ФЛ и отдельных их классов – минорных ФИ, ФЭА, ЛФХ, СФМ, а также ХС. Эти изменения могут быть связаны с тем, что ФЛ помимо структурной функции выступают посредниками во многих сигнальных механизмах роста и развития, регулируют активность мембранносвязанных ферментов, обеспечивая поддержание на оптимальном уровне необходимых физиологических функций организма при адаптации к изменению внешних факторов, в том числе светового режима и температуры [16, 17]. Наблюдаемый рост содержания трудноокисляемых липидов ФХ и XC (при режимах фотопериода 16/8 и 24/0), а также СФМ (при режиме 24/0) способствует стабилизации липидов мембран и тем самым препятствует активации свободнорадикального окисления (СРО) более ненасыщенных мембранных липидов, особенно в заводских условиях при дефиците антиоксидантов. Повышение доли ХС при двух световых режимах в августе и сентябре может быть связано с изменением гормонального фона у молоди, особенно при длительном световом периоде. Известно, что в регуляции липидного обмена (активации или подавлении активности ферментов липогенеза) участвуют липолитическе гормоны (гормон роста, тироксин и т.д.), биосинтез и секреция которых стимулируется в том числе такими факторами среды как свет и температура [1, 18]. Тироксин повышает содержание липидов, в частности, ХС у рыб [19], а также усиливает синтез СФМ, что согласуется с данными наших иссле-

дований по влиянию дополнительного освещения на рост и развитие молоди лосося возраста 1+ в выростных бассейнах и свидетельствует о повышении содержания СФМ, ХС в августе и в сентябре у опытных групп рыб при искусственном фотопериоде, особенно при режиме (24/0 ч). Снижение у мальков лосося соотношения ХС/ФЛ, отражающего вязкость и текучесть биомембран, в августе – при 16/8 и 24/0 световых режимах, а в сентябре – при фотопериоде 16/8 компенсирует рост более насыщенных мембранных липидов – ФХ и СФМ (в августе) и ФХ (в сентябре), которые, как известно, повышают вязкость мембран [20, 21]. Известно, что ХС образует в мембранах комплексы с холинсодержащими ФЛ – ФХ и СФМ и регулирует их метаболизм [22, 23]. Изменение уровня этих липидов в организме рыб взаимосвязано, что и было отмечено в наших исследованиях по влиянию двух световых режимов на рост молоди лосося. У мальков в сентябре и октябре при режиме 16/8 установлено повышение относительно контроля минорного фосфолипида – ФИ (в 1.4 и 1.7 раза соответственно), индуцирующего активность Na⁺, K⁺-АТФазы – ключевого фермента осморегуляции, на которую, в свою очередь, влияют условия среды [24, 25].

В сентябре темп роста мальков в опытных вариантах (особенно при 16/8) был выше по сравнению с контрольной группой. С понижением температуры воды в сентябре и октябре темп роста рыб не снижался и был несколько выше при действии световых режимов, чем в контроле (в большей степени при режиме 16/8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, темп роста молоди лососей всех исследованных групп в период с июля по октябрь отражал естественные сезонные изменения регионального климата, которые включают вариации температуры воды и протяженность светового дня. При этом у мальков из бассейнов с режимом фотопериода 16/8 и 24/0 по сравнению с контрольным вариантом индекс ФЛ + XC/TAГ + ЭХС, отражающий соотношение структурных липидов к запасным, был достоверно выше (август – 0.34 контроль/0.43-0.51 опыт; сентябрь - 0.44/0.48-0.52; октябрь - 0.55/0.61). Эти изменения сопровождались повышенным темпом роста молоди в сентябре и октябре при двух световых режимах по сравнению с контролем и показателями в августе. Так, в сентябре по сравнению с августом (и соответствующими режимами) у рыб в контроле масса тела увеличилась в 1.23 раза; при режиме света 16/8 – в 1.6 раз, при режиме 24/0 – в 1.33 раза; в октябре по сравнению с августом (и соответствующими режимами) в контроле у рыб масса увеличивалась в 1.3 раза, при режиме 16/8 масса увеличилась в 1.65 раза, при режиме 24/0 – в 1.55 раза. Рост содержания трудноокисляемых липидов — ΦX и XC, а также С ΦM , препятствующих активации свободнорадикального окисления более ненасыщенных мембранных липидов и увеличение ФИ, можно рассматривать в качестве биохимических индикаторов адаптивных изменений липидного состава у двухлеток (1+) атлантического лосося, выращиваемого в заводских условиях при различных режимах освещения в искусственных условиях, в процессе подготовки молоди к смолтификации и смене среды обитания с пресной на морскую.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 19-14-00081 "Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика".

Соблюдение этических стандартов. Все применимые международные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к. б. н., с. н. с. Чуровой М.В. за организацию и проведение сбора проб на рыбоводном заводе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Björnsson B.T., Stefansson S.O., McCormick S. D. Environmental endocrinology of salmon smoltification. Gen. Compar. Endocrinology. 170: 290-298.2011.
- Handeland S.O., Porter M., Björnsson B.T., Stefansson S.O. Osmoregulation and growth in a wild and a selected strain of atlantic salmon on two photoperiod regimes. Aquaculture. 222(1– 4): 29–43.2003.
- 3. *Saunders R.L., Specker J.L., Komourdjian M.P.* Effects of photoperiod on growth and smolting in juvenile Atlantic salmon. Aquaculture. 82(1–4): 103–117.1989.
- 4. *Boeuf G., Bail P.-Y.* Does light have an influence on fish growth? Aquaculture. 177(3): 129–152. 1999.
- 5. Пестрикова Л.И. Физиологическое состояние молоди атлантического лосося, выращиваемого на рыбоводных заводах Мурманской области. Материалы Междунар. Конф. "Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов". (6–9 сентября 2004 г., г. Петрозаводск, Республика Карелия). Петрозаводск. 2004. [Pestrikova L.I. Fiziologicheskoe sostoyanie molodi atlanticheskogo lososya, vyrashchivaemogo na rybovodny-hzavodah Murmanskojoblasti. Materialy Mezhdunarodnoj konferencii "Sovremennye problem fiziologii i biohimii vodnyh organizmov". (6–9 sentyabrya 2004 g., g. Petrozavodsk, Respublika Kareliya) [Physiological state of juvenile Atlantic salmon reared infarms in the Murmansk Region. Materials of the International Conference Modern problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms (September 6–9. 2004. Petrozavodsk. Republic of Karelia)]. Petrozavodsk. 2004. (In Russ)].
- 6. *Metcalfe N.B., Thorpe J.E.* Determinants of geographical variation in the age of seaward-migrating salmon, *Salmo salar*. J. Animal Ecology. 59: 135–145. 1990.
- 7. Hung S.O., Moore B.J., Bordner C.E., Conte F.S.Growth of Juvenile White Sturgeon (Acipenser transmontanas) fed Different Purified Diets1. J. Nutr. 117(2): 328.1987.
- Kanazawa A. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. Aquaculture. 155(1-4): 129–134. 1997.
- Гершанович А.Д., Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности обмена липидов у рыб. Успехи соврем. биологии. 111(2): 207–219. 1991. [Gershanovich A.D., Lapin V.I., Shatunovsky M.I. Features of lipid metabolism in fish. Successes of modern biology. 111 (issue 2.): 207–219. 1991. (In Russ)].
- 10. *Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H.* A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle). J. Biol. Chem. 226: 497–509. 1957.
- Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М. Мир. 1975. [Kejts M. Tekhnikalipidologii. Vydelenie, analiziidentifikaciya lipidov [The technique of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids]. Moscow. Nauka. 1975. (In Russ)].
- 12. Olsen R.E., Henderson R.J. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using doubledevelopment HPTLC and scanning densitometry. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 129: 189–197. 1989.
- 13. *Hellwig J*. Definig parameters for a reproducible TLC-separation of phospholipids using ADC. Diploma thesis. Germany. 2008.
- Arduini A., Peschechera A., Dottori S., Sciarroni A.F., Serafini F., Calvani M.High-performance liquid chromatography of long-chainacylcarnitineandphospholipids in fatty acid turnover studies. J. Lipid Res. 37(2): 684–689. 1996.
- Коросов А.В., Горбач В.В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск. 2007. [Korosov A.V., Gorbach V.V. Komp'yuternaya obrabotka biologicheskih dannyh [Computer processing of biological data]. Petrozavodsk. 2007. (In Russ)].
- 16. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л. Наука. 1981. [Kreps E.M. Lipidykletochnyhmembran. Evolyuciya lipidov mozga. Adaptacionnayafunkciya lipidov [Cell membrane lipids. The evolution of brain lipids. Lipid Adaptation Function]. L. Nauka. 1981. (In Russ)].
- 17. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. N.Y. Oxford Univer. Press. 2002.
- Саутин Ю.Ю. Проблема регуляции адаптационных изменений липогенеза, липолиза и транспорта липидов у рыб. Успехи соврем. биологии. 107(1): 131–147. 1989. [Sautin Yu. Yu. The problem of regulation of adaptive changes in lipogenesis, lipolysis and lipid transport in fish. Successes of modern biology. 107(1): 131–147. 1989. (In Russ)].
- 19. *Ghosh R.K., Medda A.K.* Effect of thyroxine and thiourea on cholesterol total lipid and glycogen contents of brain of Singi fish (*Heteropneustesfossilisbloch*). Neurochem. Internat. 6(1): 97–101. 1984.
- 20. Коломийцева И.К., Перепелкина Н.И., Патрушев И.В., Попов В.И. Роль липидов в сборке эндоплазматического ретикулума и диктиосом нейрональных клеток коры головного

мозга якутского суслика *Citellusundulates* при гибернации. Биохимия. 68: 954–967. 2003. [*Kolomiytseva I.K., Perepelkina N.I., Patrushev I.V., Popov V.I.* The role of lipids in the assembly of the endoplasmic reticulum and dictios of neuronal cells of the cerebral cortex of the Yakut gopher *Citellus undulates* during hibernation. Biochemistry. 68: 954–967. 2003 (In Russ)].

- Barak S., Fischer G., Rivney B. On the mechanism of sphingomyelin interaction roith solubilized membrane proteins. Membr. Biochem. 7(3): 153–73. 1998.
- Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Физиологически активные липиды. М. Наука. 1991. [Stepanov A.E., Krasnopol'skij YU.M., Shvec V.I. Fiziologicheski aktivnye lipidy [Physiologically Active Lipids] M. Nauka. 1991. (In Russ)].
- Ипатова О.М., Торховская Т.И., Захарова Т.С., Халилов Э.М.Сфинголипиды и клеточная сигнализация: участие в апоптозе и атерогенезе. Биохимия. 71(7): 882–893. 2006. [Ipatova O.M., Torkhovskaya T.I., Zakharova T.S., Halilov E.M. Sphingolipids and cell signaling: participation in apoptosis and atherogenesis. Biochemistry. 71(7): 882–893. 2006. (In Russ)].
- 24. Болдырев А.А., Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А. Мембранология. Петрозаводск. КарНЦ PAH. 2006. [Boldyrev A.A., Kyajvyaryajnen E.I., Ilyuha V.A. Membranologiya. [Membraneology] Petrozavodsk. KarRCRAS. 2006. (In Russ)].
- Bystriansky J.S., Ballantyne J.S. Gill Na⁺, K⁺-ATPase activity correlates with basolateral membrane lipid composition in seawater but not freshwater-acclimated Arctic charr (Salvelinus alpines). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp.Physiol. 292(2): R1043–R1051.2007.

Effect of the Photoperiod on Lipid Spectrum of Young Atlantic Salmon Salmo salar L.

N. N. Nemova^{*a*, *}, Z. A. Nefedova^{*a*}, S. N. Pekkoeva^{*a*}, V. P. Voronin^{*a*}, T. R. Ruokolainen^{*a*}, and S. A. Murzina^{*a*}

^aInstitute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

*E-mail: nnnemova@gmail.com

Effect of two light regimes 16/8 (16 hours – light and 8 hours – darkness) and 24/0 (24 hours – light) on the lipid content of juvenile Atlantic salmon (at the 1+ age) in the process of growth and development from August to October was carried out in a fish farm. The content of total lipids, structural lipids – phospholipids (PL), their classes (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, sphingomielin, and lysophosphatidylcholine) and cholesterol (CHOL), reserve triacylglicerols (TAG), diacylglycerols (DAG), free fatty acids (FFA), cholesterol esters (ECHOL) were analysed. It was shown that index of ratio structural and reserve lipids (PL + CHOL/TAG + ECHOL) is increasing during growth and development of young's Atlantic salmon (1+) principally than in control options. The data obtained indicate the predominance of the structural growth of organs and tissues over fat accumulation to a greater extent in fish with additional illumination in this period. These changes were accompanied by an increased growth rate of juvenile salmon in September and October under two light conditions compared with the control and those in August.

Keywords: photoperiod, lipids, Atlantic salmon, aquaculture

ЦИТИРОВАТЬ:

Немова Н.Н., Нефедова З.А., Пеккоева С.Н., Воронин В.П., Руоколайнен Т.Р., Мурзина С.А. Влияние фотопериода на липидный спектр молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(5): 622–630.

DOI: 10.31857/S0869813920050064

TO CITE THIS ARTICLE:

Nemova N.N., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N., Voronin V.P., Ruokolainen T.R., Murzina S.A. Effect of the Photoperiod on Lipid Spectrum of Young Atlantic Salmon *Salmo salar* L. Russian Journal of Physiology. 106(5): 622–630.

DOI: 10.31857/S0869813920050064

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 5, с. 631-653

<u>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ</u> ПО ЛИПИДОЛОГИИ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДНОГО СОСТАВА И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЯДЕРНЫХ И БЕЗЪЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

© 2020 г. В. В. Ревин¹, Н. В. Громова^{1, *}, Э. С. Ревина¹, И. П. Грунюшкин¹, Т. П. Кузьменко¹, Т. О. Ошкина¹, С. С. Бочкарева¹

¹Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия *E-mail: nataly grom@mail.ru

> Поступила в редакцию 26.02.2020 г. После доработки 02.04.2020 г. Принята к публикации 04.04.2020 г.

Проведено сравнительное исследование свойств ядерных и безъядерных эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии. Определяли фосфолипидный и жирнокислотный состав индивидуальных фосфолипидов, содержание свободных жирных кислот в составе безъядерных и ядерных эритроцитов при помощи тонскослойной хроматографии. Методом лазерной интерференционной микроскопии изучали морфометрические характеристики ядерных и безъядерных эритроцитов и распределение гемоглобина. Методом спектроскопии комбинационного рассеяния изучали конформационные изменения гемопорфирина ядерных и безъядерных эритроцитов в условиях гипоксии. Показано, что в условиях гипоксии в мембранах как ядерных, так и безъядерных эритроцитов происходят изменения в фосфолипидном и жирнокислотном составе, ведущие к накоплению лизоформ фосфолипидов, диацилглицерола и свободных жирных кислот, а также к повышению степени насыщенности жирных кислот в составе фосфолипидов. Данные изменения свидетельствуют о структурных перестройках в мембране безъядерных и ядерных эритроцитов и, вследствие этого о функциональных изменениях как со стороны эритроцита в целом, так и основного кислородтранспортного белка эритроцитов – гемоглобина.

Ключевые слова: эритроциты, мембрана, фосфолипиды, жирные кислоты, гемоглобин

DOI: 10.31857/S0869813920050106

В результате многочисленных исследований детально доказана роль изменений сердечно-сосудистой и дыхательной систем в развитии кислородной недостаточности тканей, тогда как значение кислородтранспортной функции крови в возникновении гипоксии, развитии и прогрессировании гипоксически обусловленных состояний изучена недостаточно. В настоящее время считается, что одним из основных механизмов возникновения сердечно-сосудистых заболеваний является нарушение структуры и функции эндотелия сосудов [1, 2].

При этом первичные звенья патогенеза эндотелиальной дисфункции, в частности, возможная роль гемической и тканевой гипоксии в ее развитии остаются недостаточно исследованными. Так, не уделено серьезного внимания одному из важнейших звеньев системы транспорта кислорода — гемоглобину эритроцитов. В то же время известно, что изменение морфологических и функциональных характеристик эритроцитов существенно влияет на эффективность переноса кислорода в организме, определяя развитие многих патологических состояний [3–5].

Также важной причиной нарушений кислородтранспортной системы может быть изменение свойств гемоглобина, определяющих его сродство к кислороду, связанное с нарушением конформации гемопорфирина [6–8].

Важными составляющими в регуляции функциональных характеристик эритроцитов и находящегося в нем гемоглобина являются состояние и динамика липидного бислоя мембран. В зрелом эритроците человека нет ядра, при действии протеаз и липаз разрушаются рибосомы и митохондрии [9]. Как известно, основная (кислородтранспортная) функция эритроцитов не является энергозависимой [10]. Тем не менее, для поддержания стабильности мембран эритроцитов важное значение имеет способность клеток к синтезу АТФ [11–13].

Утрата ядра и митохондрий, таким образом, может играть определенную роль в перераспределении гемоглобина в клетке и тем самым влиять на его кислородтранспортные способности, а лекарственные средства, усиливающие метаболическую активность эритроцита, могут способствовать усилению кислородтранспортных свойств, что можно установить в сравнительном эксперименте на ядерных и безъядерных эритроцитах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Постановка эксперимента

Объектом исследования служили эритроциты периферической крови человека, полученные из цельной крови доноров на Республиканской станции переливания крови. Донорами являлись практически здоровые люди (n = 39) мужского пола в возрасте от 25 лет до 39 лет (средний возраст 32.1 г.). Их средние гематологические показатели: RBC ($10^{12}/\pi$) – 4.68 ± 0.09; Гб – 134.6 ± 4.56 г/л. Исследование проведено с разрешения локального этического комитета при Мордовском государственном университете в соответствии с принципами Good Clinical Practice (протокол № 12 от 17 сентября 2014 г.). Информированное согласие доноров на участие в исследовании получено.

Кровь забирали утром натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки, после чего из венозной крови получали эритроцитарную взвесь.

Также в качестве объекта исследования использовали эритроциты крови половозрелых голубей (*Columba livia*, 29 птиц) в возрасте 4—8 лет массой 300 г. При работе с птицами полностью соблюдали международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Получение суспензии эритроцитов

В качестве антикоагулянта применялся 3Na-цитрат, конечная концентрация составляла 13 мM, pH = 7.35. Форменные элементы крови осаждали центрифугированием 10 мин при 1000 g. Плазму и лейкоцитарный слой отбрасывали, осадок ресуспендировали в десятикратном объеме среды промывания и инкубации эритроцитов, которая содержала (мМ): 10 KH₂PO₄, 3.5 KCl, 1.5 MgCl₂, 145 NaCl, 6 глюкозы, pH = 7.4 [14]. Осаждали эритроциты центрифугированием при 1000 g 15 мин (температура 4°C). Процедуру промывания повторяли трехкратно. Полученный осадок эритроцитов разводили средой промывания в соотношении 1 : 5 (V : V). Суспензию эритроцитов хранили в холодильнике при температуре 4°C не более 6 ч. В течение этого времени эритроциты использовали для проведения дальнейших экспериментов.

Процедура получения эритроцитов голубя не отличалась от процедуры получения эритроцитов человека.

Инкубация эритроцитов

Эритроцитарную массу хорошо размешивали и отбирали 10 мл в инкубационную камеру. Время инкубации составляло 60 мин. В инкубационной камере поддерживалась стабильная температура 37°С (в случае с ядерными эритроцитами голубя – 40°С).

Для создания экспериментальной гипоксии мы использовали пропускание (барботаж) азота через инкубационную среду с эритроцитами [15]. За основу была взята модифицированная методика Wood с соавт. [16] и Ramser с соавт. [16, 17]. Использована установка, разработанная инженерами нашей кафедры. Инкубация эритроцитов проводилась в пробирках, герметично закрытых силиконовыми пробками. Газовую смесь, содержащую N₂ и 0.04% CO₂ (ООО Торговая компания "ПРОМКОМПЛЕКТ-С") осторожно пропускали через суспензию эритроцитов через входные отверстия, просверленные в силиконе (от которых в суспензию опускались тонкие капилляры). Из пробирок газ удалялся через выходные отверстия. Скорость подачи газовой смеси составляла 5 см³/мин. Процедура продувки газа проводилась при температуре 37° С (в случае эритроцитов голубя 40° С) с использованием водяной бани.

После инкубации эритроциты осаждались центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин, после чего небольшую часть осадка ресуспендировали в среде промывания, приготавливали препараты для микроскопии, другая часть использовалась для получения мембран.

Выделение мембран из эритроцитов человека

Осадок эритроцитов подвергался лизису в охлажденном растворе 5 мМ NaH_2PO_4 (pH = 8.0; $T = 4^{\circ}C$). Соотношение осадка эритроцитов к лизирующему раствору составляло 1 : 20 (V : V).

Смесь оставляли на 10 мин при 4°С. После этого центрифугировали при 20000 g в течение 50 мин (температура 0°С). Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок ресуспендировали в лизирующем растворе. Центрифугировали при 20000 g в течение 50 мин (температура 0°С). Процедуру повторяли трехкратно [18].

Выделение мембран из эритроцитов голубя

Выделение мембран из эритроцитов голубя проводили по методу, описанному в статье [19]. Эритроциты голубя подвергались лизису в охлажденном растворе 5 мМ NaH₂PO₄ (pH = 8,0; $T = 4^{\circ}$ C). Спустя 15 мин центрифугировали при 3100 g в течение 10 мин, супернатант отбрасывали. В пробирки с осадком добавляли раствор Na₂HPO₄, ресуспендировали и снова центрифугировали при 3100 g в течение 30 мин. Цикл повторялся не менее 7 раз. Осадок промывали лизирующим буфером до получения мембран белого цвета.

Экстракция и хроматографическое разделение липидов мембран эритроцитов

Экстракцию липидов из эритроцитарных мембран проводили по методу Блайя— Дайера [20].

Хроматографическое разделение проводили в тонком слое силикагеля, нанесенного на стеклянную пластинку [21–23]. Использовали стандартные пластинки HPTLCSilicagel 60 F254 (Merck Германия). Образцы, предназначенные для разделения, наносили с помощью автоматического аппликатора AutomaticTCL-Sanipler 4 (Gamag, Швейцария) на расстоянии 0.7–1 см от краев пластины по 20 мкл в виде полосы (одномерное разделение). Для обнаружения липидов нами был использован метод, основанный на окрашивании их парами йода, удобный благодаря своей универсальности и отсутствию разрушающего действия на липиды [24].

Обнаружение фосфолипидов проводили методом Васьковского [25]. Отдельные фракции фосфолипидов идентифицировали с использованием значений Rf специфических окрашивающих агентов и свидетелей.

Холинсодержашие фосфолипиды обнаруживали с помощью реагента Драгендорфа. Для обнаружения аминосодержаших фосфолипидов (ФЭА, ФС) использовали нингидриновый реактив [26].

Обнаружение свободных жирных кислот (СЖК) проводили с помошью бромкрезолового зеленого [24].

Количественное определение фосфолипидов осуществляли с помошью денситометрического автоматизированного комплекса CAMAG TLC Scanner 4 (Швейцария) [22, 23]. Детектирование осуществляли с помощью TCL Scanner 4 и программного обеспечения winCATS в режиме поглощения при 360 нм с дейтериевой лампой. Содержание фосфолипидов выражали отношением неорганического фосфора индивидуальных фосфолипидных фракций к суммарному неорганическому фосфору всех фосфолипидных фракций.

Определение жирнокислотного состава индивидуальных фосфолипидов

Метиловые эфиры жирных кислот (ЖК) индивидуальных липидов и СЖК анализировали методом газовой хроматографии (ГХ). Метилирование ЖК проводили по методу Моррисона и Смита [27]. Разделение метиловых эфиров ЖК проводили на газовом хроматографе SHIMADZU GC-2010Plus AF (Япония). Анализ и обработку результатов хроматографических исследований проводили методом внутреннего стандарта.

Лазерная интерференционная микроскопия

Структурные изменения в эритроцитах, перераспределение гемоглобина и филаментов, обеспечивающих взаимодействие гемоглобина с внутренней стороной плазматической мембраны, изучали методом лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) на автоматизированном интерференционном микроскопе МИИ-4М (Россия) [28, 29].

В ходе исследования биологические объекты размещались на зеркальной подложке, от которой отражается проходящий через клетку свет. В результате фиксируется двойной сдвиг фазы луча когерентного источника света в каждой точке объекта, а с помощью дополнительной волны от того же источника формируется интерференционное изображение клетки. Для исследования получали изображения 10 участков с монослойным расположением клеток в интерференционном канале и отраженном свете в каждой пробе. Полученные изображения эритроцитов обрабатывали с помощью программы FIJI [30].

Состояние эритроцитов человека оценивали, регистрируя среднюю величину оптической разности хода (OPX) и площадь фазового изображения эритроцита. Для получения достоверного результата показатели рассчитывали, используя не менее 100 клеток от каждого образца.

Дополнительно рассчитывали фазовый объем и физическую высоту эритроцитов, а также плотность упаковки гемоглобина в одном эритроците по значениям оптической разности хода, плотности гемоглобина, показателям преломления гемоглобина, эритроцитов и среды выделения.

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния

Исследование конформации и свойств гемоглобина проводили с использованием рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) на приборе InVia-Renishaw (Великобритания) с короткофокусным высокосветосильным монохроматором (фокусное расстояние не более 250 мм) [31–34]. Для возбуждения рамановских спектров использовался лазер (длина волны 532 нм, максимальная мощность излучения 100 мВт, объектив 100×). Регистратор данных – ССD-детектор (1024 × × 256 пикселей с пельтье-охлаждением до – 70°С) с решеткой 1800 штр/мм. Оцифрованные спектры обработаны в программе WIRE 3.3. Произведены коррекция базовой линии, сглаживание спектров.

При изучении конформации Гб суспензия эритроцитов помещалась в запаянные капилляры, диаметром 1 мм, которые устанавливались в держатель спектрометра. Выписывались полосы спектра гемоглобина при возбуждении лазером 532 нм и соотнесение полос с колебаниями связей порфирина. Для каждой пробы измерения проводили троекратно, полученные значения усредняли.

Для анализа конформации гематопорфирина гемоглобина использовали определенные характерные полосы спектра КР, которые позволяют исследовать конформацию гематопорфирина в дезоксигемоглобине (д-Гб) и способность д-Гб связывать лиганды, а также конформацию гематопорфирина в оксигемоглобине (о-Гб) и способность о-Гб сбрасывать кислород.

В работе для анализа конформации и O_2 -связывающих свойств Гб использованы следующие полосы спектров КР крови (указаны положения максимумов): 1355, 1375, 1550, 1580 см⁻¹.

Использование отношений КР-пиков, а не их абсолютных значений обусловлено тем, что абсолютное значение интенсивности спектра зависит от количества гемоглобина и, следовательно, эритроцитов в пробе и в области фокусировки лазера. Внутренняя нормировка пиков (на интенсивности других полос) обеспечивает то, что анализируемые параметры в разных пробах не зависят от количества гемоглобина, а определяются только его конформацией и относительным содержанием его различных форм.

Характер спектров комбинационного рассеяния гемопорфирина гемоглобина [35] позволяет определять степень окисления входящего в него атома железа, его спиновое состояние и наличие лигандов, отражает изменения в структуре глобина, приводящие к деформации гемопорфирина и влияющие на кислородсвязывающие свойства гемоглобина [36].

Интенсивности полос спектра 1355 и 1375 см⁻¹обусловлены симметричными колебаниями пиррольных колец в молекулах дезоксигемоглобина и гемоглобина, связанного с лигандами [37]. Поскольку количество O₂ в крови на 3–4 порядка превосходит содержание других лигандов (например, NO или CO), то интенсивность полосы 1375 см⁻¹ определяется в основном содержанием оксигемоглобина. Таким образом, отношение интенсивностей I₁₃₇₅/(I₁₃₅₅ + I₁₃₇₅) пропорционально относительному количеству оксигемоглобина в крови.

Интенсивности полос 1550 и 1580 см⁻¹ характеризуют спиновое состояние железа в дезокси- и окси-форме соответственно и, таким образом, являются маркерами, оценивающими структурные характеристики железа в простетической группе. Это позволяет, используя отношения интенсивностей полос I_{1355}/I_{1550} и I_{1375}/I_{1580} , оценивать способность молекул гемоглобина в эритроцитах связывать и отдавать молекулы кислорода с учетом внутреннего состояния молекул гемоглобина. Разделив одно отношение на другое (I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580}), можно получить характеристику, отражающую сродство молекул гемоглобина к кислороду в нативных эритроцитах. Также методом КР-спектроскопии осуществляли контроль за созданием гипоксических условий в среде инкубации эритроцитов [38].

Статистическая обработка результатов

При проведении статистической обработки результатов эксперимента первоначально оценивали нормальность распределения значений для каждого из образцов с помощью критерия Гири [39]. После этого оценивали однородность дисперсии, затем проводили ANOVA и ANOVA для повторных измерений. В случае статистически значимых различий между средними значениями мы использовали постфактум метод анализа сравнения средних Тьюки [40].

Результаты исследований представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения (Mean ± SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение фосфолипидного и жирнокислотного состава индивидуальных фосфолипидов, содержания свободных жирных кислот и диацилглицерина в условиях нормы и гипоксии. Исследование степени окисленности липидов

В нашей работе мы исследовали фосфолипидный состав мембран эритроцитов, а также степень их окисленности в условиях нормы и гипоксии.

Из мембран эритроцитов были выделены 7 фракций фосфолипидов – фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилсерин (ФС), сфингомиелин, лизофосфатидилхолин (ЛФХ), лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭА), фосфатидилинозитол (ФИ). Кроме этого, были выделены такие метаболиты фосфолипидов, как диацилглицерол (ДАГ), являющийся вторичным посредником фосфоинозитидного цикла и образующийся из фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата под действием фосфолипазы С, и СЖК [41].

В ходе эксперимента было установлено, что в эритроцитах (как безъядерных, так и ядерных) в условиях недостаточного содержания кислорода в среде инкубации происходят изменения в количественном составе фосфолипидов и их метаболитов (табл. 1).

Возможно, что в условиях гипоксии происходит активация фосфолипаз в эритроцитах, что, в свою очередь, приводит к расщеплению ФЭА, ФХ и ФС. Это также подтверждается накоплением в условиях гипоксии ДАГ и СЖК (их количество увеличивалось на 47.8 и 34.2% соответственно по сравнению с контролем).

При исследовании ядерных эритроцитов голубя были выделены те же фракции ФЛ, что и из мембран эритроцитов человека. В ходе эксперимента прослеживались те же закономерности, что и при исследовании эритроцитов человека (табл. 1).

В условиях недостатка кислорода наблюдалось снижение содержания ФЭА, ФХ, ФС и ФИ по сравнению с контролем на 45.1, 36.5, 38.5 и 58.4% соответственно. Минимальное снижение наблюдалось для СМ (табл. 1). Также в ядерных эритроцитах происходило накопление продуктов превращения фосфолипидов – ЛФЭА и ЛФХ, однако, в сравнении с эритроцитами человека в большей степени, практически в 2 раза по сравнению с контролем, увеличилось количество ЛФХ. Кроме этого, наблюдалось увеличение количества ДАГ и СЖК на 53.3 и 32.4% соответственно.

Очевидно, что выявленные изменения в составе липидов цитоплазматической мембраны эритроцитов – снижение содержания ФЭА, ФХ, ФС, ФИ, СМ и увеличение содержания лизофосфолипидов, а также метаболитов липидов могут влиять на структурные и функциональные свойства мембраны клетки [30].

Для лучшего понимания характера и степени участия отдельных фосфолипидов в функциях как общих для всех клеток, так и специфических для эритроцитов, необходимо более глубокое изучение молекулярного строения отдельных фосфоли**Таблица 1.** Изменение липидного состава мембран эритроцитов человека и голубя в условиях нормы и недостатка кислорода

Условия эксперимента Experimental conditions	Безъядерные эри Nuclear-free	атроциты ($n = 39$) erythrocytes	Ядерные эритг Nuclear er	ооциты (<i>n</i> = 29) Tythrocytes
ФЛ и метаболиты, мкг/мг липидов PL and metabolites, µg/mg lipids	контроль control	гипоксия hypoxia	контроль control	гипоксия hypoxia
ФЭА РЕА	190.3 ± 8.1	68.3 ± 2.8**	186.5 ± 8.8	166.8 ± 3.6*
ФХ РС	230.8 ± 9.3	118.2 ± 3.6*	233.1 ± 10.4	148.4 ± 5.4**
ФС PS	36.6 ± 1.3	20.4 ± 1.6**	57.84 ± 5.6	35.1 ± 1.6*
ФИ PI	82.5 ± 3.8	77.6 ± 6.2**	77.4 ± 2.1	32.4 ± 2.4*
CM SM	158.4 ± 6.3	146.2 ± 9.5*	165.3 ± 7.6	155.6 ± 11.6*
ЛФХ LPC	17.3 ± 0.4	23.7 ± 1.7**	18.6 ± 0.6	36.4 ± 1.8**
ЛФЭА LPEA	19.8 ± 0.7	37.8 ± 2.4**	19.8 ± 0.8	29.2 ± 2.5**
ДАГ DAG	17.5 ± 0.5	25.5 ± 1.1**	15.5 ± 0.7	$23.4 \pm 0.8*$
СЖК FFA	38.4 ± 1.3	51.6 ± 2.2*	37.7 ± 1.4	49.1 ± 1.3**

Table 1. Changes in the lipid composition of human and pigeon erythrocyte membranes under normal and lack of oxygen conditions

*p ≤ 0.05 достоверно по отношению к контролю;

* $p \le 0.05$ reliably in relation to control;

 $p^{*} = 0.01$ достоверно по отношению к контролю.

** $p \le 0.01$ reliably in relation to control.

пидов и, прежде всего, их жирных кислот как самого переменного компонента фосфолипидов [42].

При изучении состава ЖК фосфолипидов мембран эритроцитов человека было выявлено, что они включали миристиновую (С14:0), миристолеиновую (С14:1), пальмитиновую (С16:0), пальмитолеиновую (С16:1), стеариновую (С18:0), олеиновую (С18:1), линолевую (С18:2), линоленовую (С18:3), арахиновую (С20:0), гондо-иновую (С20:1), эйкозодиеновую (С20:2), бегеновую (С22:0), эруковую (С22:1), лигноглицериновую (С24:0) кислоты (табл. 2).

Для каждой фракции фосфолипидов существует свой жирнокислотный профиль. Тем не менее, общим для всех фракций фосфолипидов является высокое содержание стеариновой и олеиновой кислот. К минорным относится линоленовая незаменимая жирная кислота с максимальным содержанием во фракции фосфатидилхолина.

Анализ жирнокислотного состава липидов эритроцитов показал, что в контрольном образце во фракции ФХ были обнаружены все перечисленные выше

Таблица 2. Жирнокислотный состав фракций фосфолипидов и СЖК безъядерных эритроцитов (% от общего количества) $M \pm$ SD (n = 39)

Table 2.	Fatty acid	composition	of fractions	of phosphc	olipids and	FFA of	f nuclear-free	erythrocytes
(% of tot	al) $M \pm SE$	O(n = 39)						

	ЖК FA															
Фракции ФЛ PL fractions	Условия эксперимента Experimental conditions	C14:00	C14:01	C16:00	C16:01	C18:00	C18:01	C18:02	C18:03	C20:00	C20:01	C20:02	C22:00	C22:01	C24:00	K _{Hac} D _{sat}
×o	Kohrpoль Control	$^{14.04\pm}_{\pm0.16}$	0	$26.56 \pm \pm 0.11$	${}^{0.95\pm}_{\pm0.05}$	$20.01 \pm \pm 1.09$	$\begin{array}{c} 0.63 \pm \\ \pm \ 0.03 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.83 \pm \\ \pm \ 0.09 \end{array}$	${}^{1.78\pm}_{\pm0.05}$	$\begin{array}{c} 3.83 \pm \\ \pm 0.04 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.38 \pm \\ \pm \ 0.09 \end{array}$	$\begin{array}{c} 16.50\pm\\\pm0.32\end{array}$	$^{12.59\pm}_{\pm0.48}$	0	$\begin{array}{c} 6.31 \pm \\ \pm \ 0.09 \end{array}$	0.81
Φď	Гипоксия Нурохіа	${}^{15.79\pm}_{\pm0.16^*}$	0	$28.97 \pm 28.97 \pm 0.38^{*}$	${}^{0.75\pm}_{\pm0.06*}$	22.36± ±0.17*	$\begin{array}{c} 0.56 \pm \\ \pm \ 0.03 \end{array}$	1.90 ± ± 0.06*	$\begin{array}{c} 1.77 \pm \\ \pm \ 0.04 \end{array}$	${}^{4.06\pm}_{\pm0.02^*}$	$\begin{array}{c} 1.41 \pm \\ \pm \ 0.04 \end{array}$	${}^{14.23\pm}_{\pm0.07^*}$	$^{13.58\pm}_{\pm0.24*}$	0	7.89± ±0.08**	0.86
U SO	Kohrpoль Control	$^{11.54\pm}_{\pm0.39}$	${}^{0.02\pm}_{\pm0.001}$	$^{17.82\pm}_{\pm0.27}$	2.88 ± ± 0.17	13.06 ± ± 1.96	$13.6 \pm \pm 0.22$	${}^{9.42\pm}_{\pm0.08}$	0	$13.65 \pm \pm 0.11$	$2.99 \pm \pm 0.08$	$\begin{array}{c} 1.51 \pm \\ \pm \ 0.09 \end{array}$	$5.30 \pm \pm 0.16$	$\begin{array}{c} 7.56 \pm \\ \pm \ 0.07 \end{array}$	0	0.63
₽ ²	Гипоксия Нурохіа	${}^{18.44\pm}_{\pm0.88*}$	${}^{0.62\pm}_{\pm0.03^*}$	$19.68 \pm 0.33^{*}$	$0.03 \pm 0.001^{**}$	${}^{8.44\pm}_{\pm0.18^*}$	$10.7 \pm \pm 0.16*$	$6.82 \pm \pm 0.11^{*}$	0	$13.23 \pm 0.08*$	$2.88 \pm \pm 0.06*$	$3.96 \pm \pm 0.07*$	$6.6 \pm \pm 0.09^{*}$	0	0	0.84
A A	Kontponb Control	$15.86 \pm \pm 0.27$	$^{1.18\pm}_{\pm0.01}$	0	$\begin{array}{c} 0.31 \pm \\ \pm \ 0.02 \end{array}$	17.37 ± ± 1.55	${}^{0.24\pm}_{\pm0.02}$	$2.01 \pm \pm 0.07$	$0.92 \pm \pm 0.02$	0	$\begin{array}{c} 1.09 \pm \\ \pm \ 0.08 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.13 \pm \\ \pm \ 0.22 \end{array}$	19.82 ± ± 1.11	35.60 ± 2.67	0	0.61
θ	Гипоксия Нурохіа	$17.15 \pm \pm 0.68$	$2.97 \pm \pm 0.07^{**}$	$5.38 \pm 0.19^{*}$	$\begin{array}{c} 0.32 \pm \\ \pm \ 0.01 \end{array}$	25.81 ± ± 0.92**	$1.81 \pm 0.02^{**}$	4.88± ±0.29*	$1.56 \pm \pm 0.09^{*}$	$4.25 \pm 0.03^{*}$	$1.76 \pm \pm 0.09^{*}$	$2.31 \pm \pm 0.06*$	26.15 ± ± 1.78*	0	${}^{5.74\pm}_{\pm0.05^*}$	0.87
И	Kontpoль Control	$6.74 \pm \pm 0.18$	${}^{0.91\pm}_{\pm0.06}$	$8.19 \pm \pm 0.42$	$^{11.83\pm}_{\pm0.34}$	$^{19.30\pm}_{\pm0.35}$	$0.22 \pm \pm 0.01$	$2.60 \pm \pm 0.09$	$1.26 \pm \pm 0.07$	$12.37 \pm \pm 0.31$	$\begin{array}{c} 1.54 \pm \\ \pm 0.06 \end{array}$	$3.39 \pm \pm 0.12$	${}^{19.70\pm}_{\pm0.25}$	$\begin{array}{c} 4.53 \pm \\ \pm \ 0.02 \end{array}$	$8.56 \pm \pm 0.11$	0.77
⊕ -	Гипоксия Нурохіа	${}^{10.08\pm}_{\pm0.18^*}$	$1.60 \pm 0.06^{*}$	$10.47 \pm 0.33^{*}$	${5.16 \pm \atop \pm 0.15^{*}}$	15.29 ± ± 1.14*	${}^{0.30\pm}_{\pm0.01^*}$	$0.98 \pm 0.08*$	1.27 ± 20.07	25.31 ± ± 0.48**	$1.16 \pm \pm 0.04*$	$3.61 \pm \pm 0.19$	$^{11.76\pm}_{\pm0.18^*}$	0	$^{13.94\pm}_{\pm0.69*}$	0.89
XX Ar	Kohtpoль Control	$11.26 \pm \pm 0.12$	${}^{0.22\pm}_{\pm0.02}$	$22.25 \pm \pm 0.61$	$4.73 \pm \pm 0.12$	${}^{21.43\pm}_{\pm0.54}$	${}^{0.36\pm}_{\pm0.02}$	$5.77 \pm \\ \pm 0.12$	$\begin{array}{c} 1.45 \pm \\ \pm \ 0.09 \end{array}$	$^{12.36\pm}_{\pm0.36}$	$0.32 \pm \pm 0.01$	$\begin{array}{c} 3.01 \pm \\ \pm \ 0.16 \end{array}$	$^{18.72\pm}_{\pm0.15}$	$\begin{array}{c} 0.40 \pm \\ \pm \ 0.01 \end{array}$	${}^{2.33\pm}_{\pm0.22}$	0.86
で 出	Гипоксия Нурохіа	$8.44 \pm \pm 0.18^{*}$	$1.56 \pm \pm 0.08^{**}$	29.06 ± ± 0.59**	1.60 ± ± 0.09**	18.61 ± ± 0.92*	$0.33 \pm \pm 0.01*$	$3.03 \pm \pm 0.09*$	0	20.77 ± ± 0.29**	$0.44 \pm \pm 0.02^{*}$	9.02 ± ± 0.28**	$14.63 \pm 0.11^{*}$	$0.61 \pm \pm 0.03*$	0	0.88

*p ≤ 0.05 достоверно по отношению к контролю;

* $p \le 0.05$ reliably in relation to control;

** $p \le 0.01$ достоверно по отношению к контролю;

** $p \le 0.01$ reliably in relation to control.

жирные кислоты, кроме миристолеиновой и эруковой. Основной вклад в их количество вносят C16:0, C18:0, C20:2. Коэффициент насыщенности ФХ составил 0.81.

Во фракции ФС отсутствовали линоленовая и лигноглицериновая кислоты. Коэффициент насыщенности ФС составил 0.63. Во фракции ФЭА среди всех ЖК наибольший процент составила C22:1 — эруковая кислота. Отсутствовали C12:0, C16:0, C20:0, C24:0. Коэффициент насыщенности составил 0.61.

Качественный состав ЖК фосфоинозитидов был таким же, как в названных выше фракциях. Из насыщенных кислот наибольшее количество составили C18:0 (стеариновая), C22:0 (бегеновая). Из ненасыщенных в наибольшем количестве была обнаружена C16:1 — пальмитолеиновая. Коэффициент насыщенности ФИ составил 0.77. Насыщенные СЖК были представлены в основном С16:0 и С18:0. Из ненасыщенных обнаружены С16:1, С18:2 и С20:2. Коэффициент насыщенности СЖК составил 0.86.

Во фракции ФХ при инкубации эритроцитов в условиях гипоксии качественных изменений в составе ЖК не произошло. Увеличилось количество практически всех насыщенных кислот. Как следствие, коэффициент насыщенности увеличился до 0.86. В составе жирнокислотной фракции ФС не были обнаружены линоленовая и эруковая кислоты, а также насыщенная лигноцериновая кислота. Появилась миристоолеиновая кислота. Количество насыщенных кислот с длинными цепями уменьшилось, либо осталось почти на контрольном уровне. Значительно снизилось содержание стеариновой кислоты. Из ненасыщенных кислот почти до нуля уменьшилось содержание пальмитолеиновой, не обнаружено эруковой, но более чем в три раза увеличилось количество эйкозадиеновой кислоты. Коэффициент насыщенности ФС составил 0.84. Во фракции ФЭА при инкубации в условиях гипоксии изменился качественный состав насыщенных ЖК. Появились пальмитиновая, арахиновая, лигноцериновая кислоты, среди ненасыщенных не была обнаружена эруковая кислота. Увеличилось содержание насыщенных ЖК – С18:0 и С22:0. Коэффициент насыщенности ФЭА составил 0.87. В составе фосфоинозитидов при инкубации в условиях гипоксии по сравнению с контрольной фракцией в составе насыщенных ЖК качественных изменений не было обнаружено. Не обнаружена ненасышенная эруковая кислота. В количественном составе отмечены следующие изменения: увеличилось количество арахиновой кислоты, значительно уменьшилось содержание стеариновой и бегеновой. Из ненасыщенных кислот значительно уменьшилось содержание пальмитолеиновой и нервоновой кислот. Коэффициент насыщенности увеличился до 0.89. В составе СЖК после инкубации в условиях гипоксии не было обнаружено линоленовой и лигноцериновой кислот. Отмечено значительное снижение количества стеариновой, миристиновой, бегеновой кислот. В отличие от контроля во фракции ненасыщенных кислот обнаруживалась миристолеиновая кислота. В три раза уменьшилось содержание пальмитолеиновой кислоты и повысилось количество эйкозадиеновой кислоты. Коэффициент насыщенности составил 0.88 (табл. 2).

Анализ жирнокислотного состава липидов эритроцитов голубя показал, что в контрольном образце во фракции ΦX были обнаружены все перечисленные выше ЖК за исключением миристолеиновой и эруковой. Основной вклад в количество ЖК вносят C16:0, C18:0, C20:0, C20:2 (табл. 3).

Коэффициент насыщенности ФХ составил 0.82. Во фракции ФС общий жирнокислотный состав был аналогичен вышеописанному, однако среди ЖК не были обнаружены линоленовая и лигноглицериновая. Коэффициент насыщенности ФС составил 0.61. Во фракции ФЭА в общий жирнокислотный состав наибольший вклад вносит эруковая кислота. В значительном количестве были представлены C12:0, C16:0, C20:2, C21:0 кислоты. Коэффициент насыщенности 0.91. Качественный состав ЖК фосфоинозитидов не отличался от такового ранее описанных фракций. В количественном составе из насыщенных кислот лидерами являлись C16:0, C18:0 и C22:0, из ненасыщенных – C16:1. Коэффициент насыщенности ФИ составил 0.73. Насыщенные СЖК были представлены в основном C16:0 и C18:0. Из ненасыщенных в наибольшем количестве были обнаружены C16:1, C18:2 и C20:2. Коэффициент насыщенности СЖК составил 0.85.

После инкубации эритроцитов в условиях гипоксии во фракции ФХ качественных изменений в составе ЖК не произошло. Увеличилось количество практически всех насыщенных кислот кроме стеариновой и бегеновой. Коэффициент насыщенности вырос до 0.85. При исследовании фракции ФС в условиях гипоксии в составе ЖК не были обнаружены линоленовая, эруковая, а также лигноцериновая

Таблица 3.	Жирнокисл	іотный соста	в фракций	фосфолипидо	в и СЖК	ядерных	эритроцитов
(% от обще	его количест	ва) $M \pm SD$ (я	n = 29)				

Table 3.	Fatty acid	composition	of fractions o	of phospholi	ipids and I	FFA of nuc	clear erythro	cytes (% of
total) M	\pm SD ($n =$	29)						

	ЖK FA																	
Фракции ФЛ PL fractions	Устовяля эксперимента Experimental conditions	C12:00	C14:00	C14:01	C16:00	C16:01	C18:00	C18:01	C18:02	C18:03	C20:00	C20:01	C20:02	C21:00	C22:00	C22:01	C24:00	K _{Hac} D _{sat}
ΦX PC	Kohtpoль Control	$\begin{array}{c} 1.02 \pm \\ \pm \ 0.11 \end{array}$	$\begin{array}{c} 7.21 \pm \\ \pm \ 0.64 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 18.3 \pm \\ \pm \ 0.69 \end{array}$	${}^{0.95\pm}_{\pm0.05}$	$^{19.10\pm}_{\pm0.49}$	${}^{0.53\pm}_{\pm0.03}$	$3.95 \pm \pm 0.11$	$^{1.91\pm}_{\pm0.19}$	${}^{20.91\pm}_{\pm0.99}$	${}^{1.08\pm}_{\pm0.12}$	${}^{8.03\pm}_{\pm0.54}$	0	$\begin{array}{c} 6.93 \pm \\ \pm \ 0.54 \end{array}$	0	$\begin{array}{c} 6.12 \pm \\ \pm \ 0.44 \end{array}$	0.82
	Гипоксия Нурохіа	$1.64 \pm \pm 0.11^{*}$	8.43 ± ± 0.457*	0	$^{20.06\pm}_{\pm0.84^{*}}$	${}^{0.88\pm}_{\pm0.04}$	${}^{19.23\pm}_{\pm0.54}$	${}^{0.58\pm}_{\pm0.03}$	${}^{2.63\pm}_{\pm0.14*}$	$\begin{array}{c} 1.85 \pm \\ \pm \ 0.10 \end{array}$	$24.81 \pm \pm 1.02^{*}$	$^{1.85\pm}_{\pm0.12^*}$	${}^{7.62\pm}_{\pm0.38^*}$	0	$\begin{array}{c} 7.02 \pm \\ \pm \ 0.68 \end{array}$	0	${}^{8.42\pm}_{\pm0.58*}$	0.85
ФС PS	Kohtpoль Control	0	$^{11.51\pm}_{\pm0.85}$	0	$^{15.32\pm}_{\pm0.65}$	$14.20 \pm \pm 0.44$	$^{13.74\pm}_{\pm0.47}$	${}^{0.98\pm}_{\pm0.05}$	${}^{3.81\pm}_{\pm0.12}$	0	$^{14.25\pm}_{\pm0.54}$	$\begin{array}{c} 2.51 \pm \\ \pm \ 0.19 \end{array}$	${}^{3.86\pm}_{\pm0.19}$	0	$\begin{array}{c} 8.34 \pm \\ \pm \ 0.69 \end{array}$	$\begin{array}{c} 5.82 \pm \\ \pm \ 0.35 \end{array}$	0	0.61
	Гипоксия Нурохіа	${}^{0.83\pm}_{\pm0.08^*}$	$^{18.61\pm}_{\pm0.45^*}$	$^{1.52\pm}_{\pm0.05}$	$^{19.72\pm}_{\pm0.81^*}$	1.71 ± ± 0.09**	$^{18.44\pm}_{\pm0.32^*}$	${}^{0.90\pm}_{\pm0.05}$	${}^{3.63\pm}_{\pm0.12}$	0	$20.72 \pm 0.56^{**}$	${}^{2.85\pm}_{\pm0.19*}$	$3.77 \pm \pm 0.14$	0	$^{10.68\pm}_{\pm0.36^*}$	0	0	0.82
ФЭА РЕА	Kontpoль Control	$^{15.17\pm}_{\pm0.56}$	${}^{9.33\pm}_{\pm0.58}$	${}^{0.93\pm}_{\pm0.04}$	$^{16.04\pm}_{\pm0.68}$	${}^{5.31\pm}_{\pm0.42}$	${}^{9.62\pm}_{\pm0.66}$	$2.37 \pm \pm 0.21$	${}^{3.01\pm}_{\pm0.11}$	${}^{3.62\pm}_{\pm0.11}$	${}^{7.32\pm}_{\pm0.65}$	${}^{0.63\pm}_{\pm0.06}$	${}^{9.62\pm}_{\pm0.5}$	${}^{4.81\pm}_{\pm0.32}$	$^{15.60\pm}_{\pm0.35}$	$16.33 \pm \pm 0.54$	$^{11.45\pm}_{\pm0.68}$	0.91
	Гипоксия Нурохіа	$^{14.05\pm}_{\pm0.65^*}$	${}^{10.72\pm}_{\pm0.23^*}$	${}^{0.97\pm}_{\pm0.02}$	$^{18.35\pm}_{\pm0.86^{*}}$	3.98 ± ± 0.19*	$^{16.22\pm}_{\pm0.31^*}$	$1.65 \pm \pm 0.10^{*}$	$^{3.85\pm}_{\pm0.13^{*}}$	${}^{3.74\pm}_{\pm0.21}$	${}^{6.25\pm}_{\pm0.41^*}$	${}^{0.68\pm}_{\pm0.05}$	$^{7.63\pm}_{\pm0.54^{*}}$	${}^{5.03\pm}_{\pm0.45}$	17.23 ± ± 0.47	0	${}^{10.10\pm}_{\pm0.77}$	0.84
ФИ PI	Kohtpoль Control	$\begin{array}{c} 4.11 \pm \\ \pm \ 0.21 \end{array}$	${}^{3.36\pm}_{\pm0.12}$	0	$^{12.74\pm}_{\pm0.56}$	$^{12.80\pm}_{\pm0.65}$	$^{19.42\pm}_{\pm0.54}$	${}^{0.86\pm}_{\pm0.04}$	$\begin{array}{c} 4.8 \pm \\ \pm \ 0.16 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.41 \pm \\ \pm \ 0.16 \end{array}$	${}^{8.95\pm}_{\pm0.48}$	${}^{2.85\pm}_{\pm0.21}$	${}^{4.70\pm}_{\pm0.25}$	$\begin{array}{c} 2.61 \pm \\ \pm \ 0.19 \end{array}$	$16.32 \pm \pm 0.47$	$\begin{array}{c} 4.25\pm\\\pm0.35\end{array}$	$\begin{array}{c} 6.25 \pm \\ \pm \ 0.34 \end{array}$	0.73
	Гипоксия Нурохіа	${}^{5.03\pm}_{\pm0.35^*}$	${}^{3.85\pm}_{\pm0.21*}$	0	$^{13.49\pm}_{\pm0.59^{*}}$	$6.35 \pm 0.25^{*}$	${}^{10.32\pm}_{\pm0.21*}$	${}^{0.70\pm}_{\pm0.05^*}$	$3.99 \pm \pm 0.12^{*}$	${}^{1.47~\pm}_{\pm~0.99*}$	18.01 ± ± 0.54**	$^{1.95\pm}_{\pm0.20^*}$	$4.00 \pm \pm 0.37$	${}^{3.05\pm}_{\pm0.32}$	${}^{10.38\pm}_{\pm0.11}{}^{**}$	0	$\begin{array}{c} 6.87 \pm \\ \pm \ 0.31 \end{array}$	0.86
C.XKK FFA	Kohtpoль Control	${}^{4.77\pm}_{\pm0.29}$	${}^{6.89\pm}_{\pm0.46}$	0	$^{15.32\pm}_{\pm0.39}$	$^{19.24\pm}_{\pm0.94}$	$^{19.65\pm}_{\pm0.44}$	${}^{0.96\pm}_{\pm0.02}$	${}^{3.21\pm}_{\pm0.15}$	$^{\rm 4.20\pm}_{\rm \pm0.18}$	8.74 ± 2.23	$4.00 \pm \\ \pm 0.37$	${}^{6.35\pm}_{\pm0.34}$	$^{4.85\pm}_{\pm0.45}$	$^{5.68\pm}_{\pm0.35}$	0	${}^{4.96\pm}_{\pm0.24}$	0.85
	Гипоксия Нурохіа	${}^{6.12\pm}_{\pm\ 0.54^*}$	$3.74 \pm \pm 0.24^{*}$	$0.86 \pm \pm 0.04^{*}$	18.63 ± ± 0.58**	$10.44 \pm 0.54^{*}$	$14.45 \pm 0.11^{**}$	0.44 ± ± 0.03**	$3.77 \pm \pm 0.14^{*}$	0	$^{12.03\pm}_{\pm0.23^*}$	$\begin{array}{c} 4.11 \pm \\ \pm \ 0.25 \end{array}$	$6.34 \pm \\ \pm 0.38$	${}^{6.90\pm}_{\pm0.44^*}$	${}^{6.22\pm}_{\pm0.47*}$	0	0	0.86

*p ≤ 0.05 достоверно по отношению к контролю;

* $p \le 0.05$ reliably in relation to control;

 $p \le 0.05$ геналу и теланог се телану ** $p \le 0.01$ достоверно по отношению к контролю;

** $p \le 0.01$ reliably in relation to control.

кислоты. Обнаружена миристолеиновая кислота. Количественные изменения характеризовались увеличением числа насыщенных кислот с более короткой углеродной цепью. Из длинноцепочечных кислот увеличилось содержание арахиновой кислоты. Из ненасыщенных кислот практически до нуля уменьшилось содержание пальмитолеиновой кислоты, не было обнаружено эруковой и линоленовой кислот. Коэффициент насыщенности ФС составил 0.82. Во фракции ФЭА при инкубации в условиях гипоксии в составе насыщенных ЖК появились лауриновая, пальмитиновая, арахиновая кислоты. Среди ненасыщенных отсутствовала эруковая кислота (С22:1), которая в условиях нормоксии является основной ЖК данной фракции фосфолипидов. Увеличилось содержание насыщенных ЖК – С18:0 и С22:0, вновь обнаруживалась лигноцериновая кислота. Среди ненасыщенных значительно уменьшилось содержание олеиновой, пальмитолеиновой и эйкозадиеновой кислот, увеличилось количество линолевой кислоты. Коэффициент насыщенности составил 0.84. Во фракции фосфоинозитидов при гипоксии в составе насыщенных ЖК не была обнаружена эруковая кислота. Наблюдались следующие количествен-
CIABA

ные изменения состава ЖК: увеличилось содержание арахиновой кислоты, значительно уменьшился уровень стеариновой и бегеновой.

Среди ненасыщенных кислот уменьшилось содержание пальмитолеиновой кислоты. Коэффициент насыщенности увеличился до 0.86.

В составе фракции СЖК после инкубации в условиях гипоксии не были обнаружены С18:3 и С24:0. Отмечено значительное снижение количества стеариновой, миристиновой, и бегеновой кислот. В отличие от контроля во фракции ненасыщенных кислот обнаруживались миристолеиновая кислота. Уменьшилось содержание пальмитолеиновой кислоты. Коэффициент насыщенности в данных условиях составил 0.86.

Важным моментом нашей работы было изучение количества и состава диацилглицерола (ДАГ), играющего главную роль в регуляции активности фосфолипазы A_2 , протеинкиназы C и транспорта Ca²⁺. ДАГ придают важное значение как активатору протеинкиназы C, участвующей в усилении сигнала от возбужденного рецептора клеточной поверхности к белкам-исполнителям и фосфолипазе A_2 , и как источнику арахидоновой кислоты. ДАГ инициирует синтез ДНК и пролиферацию клеток, действуя как митоген, а также служит предшественником для ΦX , $\Phi \Im A$ и триацилглицеринов.

В жирнокислотном составе ДАГ эритроцитов человека нами были обнаружены и идентифицированы 17 ЖК: декановая (С10:0), гендекановая (С11:0), лауриновая (С12:0), миристиновая (С14:0), миристолеиновая (С14:1), пентадекановая (С15:0), пальмитиновая (С16:0), пальмитолеиновая (С16:1), стеариновая (С18:0), олеиновая (С18:1), линолевая (С18:2), линоленовая (С18:3), арахиновая (С20:0), эйкозодиеновая (С20:2), арахидоновая (С20:4), эйкозопентаеновая (С20:5), бегеновая (С22:0). Состав ДАГ в норме определяется в основном стеариновой (17.2%), арахиновой (21.4%), бегеновой (8.1%) насыщенными ЖК. Среди ненасыщенных наибольший удельный вес принадлежит линоленовой (4.4%), эйкозодиеновой (7.1%) и арахидоновой (14.3%) кислотам. Коэффициент насыщенности равен 1.60 (табл. 4).

При инкубации в условиях гипоксии содержание ДАГ увеличивалось. Это свидетельствует о том, что в мембране эритроцита при увеличении концентрации кальция происходит активация систем, которые ответственны за гидролиз фосфатидилинозитолбифосфата, продуктом которого и выступает ДАГ. По полученным данным можно судить об активации фосфолипазы С.

В эритроцитах голубя в жирнокислотном составе ДАГ нами были выделены и идентифицированы 15 ЖК: декановая (С10:0), гендекановая (С11:0), лауриновая (С12:0), миристиновая (С14:0), пентадекановая (С15:0), пальмитиновая (С16:1), стеариновая (С15:0), олеиновая (С18:1), линолевая (С8:2), линоленовая (С18:3), арахиновая (С20:0), эйкозодиеновая (С20:2), арахидоновая (С20:4), бегеновая (С22:0). Состав ДАГ эритроцитов голубя в норме определяется в основном пальмитиновой (35.8%), стеариновой (14.4%) миристиновой (5.2%) насыщенными кислотами. Среди ненасыщенных ЖК наибольший удельный вес принадлежит олеиновой (9.8%), арахидоновой (8.7%) и линолевой (7.8%) кислотам. Коэффициент насыщенности равен 1.95. При инкубации в условиях гипоксии наблюдался тот же эффект, что и для эритроцитов человека (табл. 4).

В эритроцитах голубя в жирнокислотном составе ДАГ нами были выделены и идентифицированы 15 ЖК: декановая (С10:0), гендекановая (С11:0), лауриновая (С12:0), миристиновая (С14:0), пентадекановая (С15:0), пальмитиновая (С16:1), пальмитолеиновая (С16:1), стеариновая (С18:0), олеиновая (С18:1), линолевая (С18:2), линоленовая (С18:3), арахиновая (С20:0), эйкозодиеновая (С20:2), арахидоновая (С20:4), бегеновая (С22:0). Состав ДАГ эритроцитов голубя в норме определяется в основном пальмитиновой (35.8%), стеариновой (14.4%) миристиновой (5.2%)

Жирные кислоты	Безъядерные эри Nuclear-free	троциты ($n = 39$) erythrocytes	Ядерные эритроциты (<i>n</i> = 29) Nuclear erythrocytes		
Fatty acids	контроль control	гипоксия hypoxia	контроль control	гипоксия hypoxia	
C10:00	3.95 ± 0.08	$5.22 \pm 0.17*$	4.83 ± 0.04	$7.43 \pm 0.64^{*}$	
C11:00	2.63 ± 0.09	$5.68 \pm 0.08^{**}$	3.83 ± 0.09	$6.37 \pm 0.74^{*}$	
C12:00	2.95 ± 0.05	$2.71\pm0.08^*$	4.89 ± 0.12	$6.35 \pm 0.33^{*}$	
C14:00	3.83 ± 0.04	$5.99\pm0.11^*$	5.20 ± 0.32	$11.48 \pm 0.89^{**}$	
C14:01	6.72 ± 0.04	$4.50\pm0.08^*$	0	0	
C15:00	6.56 ± 0.41	$8.36\pm0.56^*$	4.12 ± 0.22	$7.35 \pm 0.77*$	
C16:00	5.56 ± 0.09	$8.75\pm0.68*$	35.83 ± 0.99	$37.23 \pm 1.04*$	
C16:01	2.95 ± 0.10	$2.48\pm0.09^*$	3.85 ± 0.18	3.45 ± 0.36	
C18:00	17.23 ± 1.09	$25.01 \pm 0.44*$	14.44 ± 0.39	$21.60 \pm 0.93^*$	
C18:01	2.83 ± 0.09	$2.29\pm0.12^*$	9.83 ± 0.62	$6.21\pm0.87^*$	
C18:02	1.78 ± 0.05	$1.24 \pm 0.04^*$	7.81 ± 0.29	$5.23 \pm 0.58*$	
C18:03	4.38 ± 0.26	$3.79\pm0.16^*$	6.19 ± 0.11	$5.12\pm0.46^*$	
C20:00	21.41 ± 0.92	$26.60 \pm 2.43^*$	4.93 ± 0.12	$7.88\pm0.69^*$	
C20:02	7.12 ± 0.08	$5.53 \pm 0.06^{**}$	6.39 ± 0.16	$5.45 \pm 0.35^*$	
C20:04	14.32 ± 0.46	$13.11 \pm 0.51^{*}$	8.74 ± 0.58	$7.25\pm0.68^*$	
C20:05	2.65 ± 0.12	$2.88\pm0.08^*$	0	0	
C22:00	8.11 ± 0.21	$11.14 \pm 1.29*$	4.18 ± 0.13	$7.69 \pm 0.45^{**}$	
К _{нас} D _{sat}	1.60	1.85	1.95	2.1	

Таблица 4. Жирнокислотный состав ДАГ безъядерных и ядерных эритроцитов (% от общего количества) $M \pm SD$

Table 4. Fatty acid composition of DAG of nuclear-free erythrocytes and nuclear erythrocytes (% of total) $M \pm SD$

*p ≤ 0.05 достоверно по отношению к контролю;

* $p \le 0.05$ reliably in relation to control;

** $p \le 0.01$ достоверно по отношению к контролю;

** $p \le 0.01$ reliably in relation to control.

насыщенными кислотами. Среди ненасыщенных ЖК наибольший удельный вес принадлежит олеиновой (9.8%), арахидоновой (8.7%) и линолевой (7.8%) кислотам. Коэффициент насыщенности равен 1.95. При инкубации в условиях гипоксии наблюдался тот же эффект, что и для эритроцитов человека (табл. 4).

Таким образом, в условиях гипоксии в мембранах как ядерных, так и безъядерных эритроцитов происходят изменения в фосфолипидном и жирнокислотном составе, ведущие к накоплению лизоформ ФЛ, ДАГ и СЖК, а также к повышению степени насыщенности ЖК в составе ФЛ. Данные изменения свидетельствуют о структурных перестройках в мембране безъядерных и ядерных эритроцитов и вследствие этого о функциональных изменениях как со стороны эритроцита в целом, так и основного кислородтранспортного белка эритроцитов – гемоглобина [43, 44].



Рис. 1. 3D-модель эритроцита человека в условиях нормоксии. **Fig. 1.** 3D model of human erythrocyte under normoxia.

Изучение морфометрических характеристик структуры эритроцитов в условиях нормы и гипоксии

Для оценки структурных изменений эритроцитов были изучены методом лазерной интерференционной микроскопии морфометрические характеристики красных клеток крови. Установлено, что в условиях нормы эритроцит человека характеризуется нормальной дискоидной формой, четко просматривающейся на фазовом изображении (рис. 1).

Такая форма связана с равномерным распределением гемоглобина и, следовательно, относительно одинаковым показателем преломления.

В условиях гипоксии площадь эритроцитов относительно контроля увеличилась на 16.5%. ОРХ и объем эритроцитов уменьшились на 6.6 и 12.8% относительно контроля. Высота клеток и плотность упаковки гемоглобина увеличились на 13.5 и 41.4% соответственно (табл. 5).

После инкубации ядерных эритроцитов в условиях гипоксии площадь фазового изображения также увеличилась на 28.1% по сравнению с контрольным значением. ОРХ уменьшилась на 32.6%, также наблюдалось уменьшение фазового объема эритроцита на 13.2% относительно контроля (табл. 6).

В отличие от безъядерных эритроцитов показано снижение показателей геометрической высоты и плотности упаковки эритроцитов на 10.3 и 13.3% соответственно.

Изменение условий инкубации (гипоксия) приводило к появлению нарушений в морфологии эритроцитов. Фазовое изображение некоторых эритроцитов имело не гладкую тороидную форму, а "шероховатую", с выростами и выпуклостями, что связано с изменениями в структуре цитоскелета и перераспределением гемоглобина в цитоплазме. Эти изменения могут быть вызваны патологическими процессами в эритроцитах, которые обусловлены состоянием гипоксии. Трансформация дискоцита в эхиноцит (обратимая деформация эритроцита) начинается с нарушения контура двояковогнутой структуры эритроцита с последующим появлением грубых выростов сначала по окружности диска, а затем по всей поверхности клетки, после чего эритроцит принимает в основном сферическую форму. Образование сфероцита представляет собой пример необратимой деформации эритроцита (рис. 2).

Показатели Indicators	жения :yte,	h th		сая) и мкм	лобина
условия эксперимента experimental conditions	Площадь фазового изобра: эритроцита <i>S</i> , мкм ² Phase image area of crythroc S, µm ²	Оптическая разность хода ОРХ, нм The mean value of optical pa difference (OPD), Φ_{mean} , nr	Фазовый объем эритроцита V , мкм ³ Erythrocyte phase volume, V , μm^3	Физическая (геометрическ толщина эритроцита Z_{mean} Geometric mean height of the erythrocyte, Z_{mean} µm	Плотность упаковки гемог в эритроците, ти _{<i>Hb</i>} , пг Егуthrocyte hemoglobin packing density, pg
Контрольная проба, <i>n</i> = 39 Control, <i>n</i> = 39	52.20 ± 5.01	118.80 ± 3.00	85.55 ± 5.21	1.73 ± 0.55	29.59 ± 2.89
Гипоксия, <i>n</i> =39 Нурохіа, <i>n</i> = 39	61.50 ± 3.79*	110.68 ± 5.37*	72.92 ± 3.52*	1.96 ± 0.04*	41.84 ± 5.04*

Таблица 5. Морфометрические показатели эритроцитов человека в условиях нормо- и гипоксии ($M \pm$ SD)

Table 5. Morphometric characteristics of human erythrocytes in conditions normo- and hypoxia ($M \pm$ SD)

*p ≤ 0.05 достоверно по отношению к контролю;

* $p \le 0.05$ reliably in relation to control.

Таблица 6.	Морфом	метрические	показатели	эритроцитов	голубя в	условиях	нормо-	ИГЛ	ипо-
ксии ($M \pm$	SD)								

Table 6. Morphometric parameters pigeon erythrocytes in conditions normo and hypoxia ($M \pm SD$)

Показатели Indicators	мкм ²	д	V, _{МКМ} ³ um ³	I) MKM	н
условия эксперимента experimental conditions	Площаль фазового изображения эритроцита. S , Phase image area of erythrocyte, S , μm^2	Средняя оптическая разност хода, ОРХ, нм The mean value of optical path difference (OPD), Ф _{mean} , nm	Фазовый объем эритроцита, Erythrocyte phase volume, V, ₁	Физическая (геометрическая толщина эритроцита, Z_{mean} , Geometric mean height of the erythrocyte, Z_{mean} , μ m	Плотность упаковки гемоглобина в эритроците, п Erythrocyte hemoglobin packing density, pg
Контрольная проба, <i>n</i> = 29 Control, <i>n</i> = 29	121.90 ± 7.45	184.44 ± 9.24	296.80 ± 9.04	3.19 ± 0.04	106.38 ± 3.9
Гипоксия, <i>n</i> = 29 Нурохіа, <i>n</i> = 29	155.16±6.24*	124.44±5.23*	257.08±10.87*	2.86 ± 0.05*	92.17 ± 4.69*

*p ≤ 0.05 достоверно по отношению к контролю; *p ≤ 0.05 reliably in relation to control.



Рис. 2. 3D-модель (*A*) и профиль (*B*) эритроцита человека в условиях гипоксии (сфероцит). **Fig. 2.** 3D model (*A*) and profile (*B*) of human erythrocyte during incubation under hypoxia (spherocyte).

Также в ходе работы нами были получены фазовые 3D-изображения эритроцитов и поперечный срез эритроцита голубя. Эритроциты контрольного образца имели овальную форму, внутриклеточные структуры были равномерно распределены (рис. 3).

Мембрана эритроцитов имела ровную, гладкую поверхность. В центре эритроцита находится ядро. Поперечное сечение эритроцита голубя имеет два плеча и один максимум.

У эритроцитов, инкубированных в условиях гипоксии, в поперечном сечении мы наблюдали только один максимум, эритроциты изменяли свою форму, становились более шаровидными (рис. 4).

Некоторые эритроциты после инкубации в условиях гипоксии имели неровные края и шероховатую поверхность.

Выявленные в результате нашей работы нарушения различных морфометрических показателей эритроцитов будут отражаться и на функциональной способности гемоглобина, о чем свидетельствует изменение плотности упаковки гемоглобина как в безъядерных, так и ядерных эритроцитах.

Исследование конформационных свойств гематопорфирина гемоглобина и определение лигандсвязывающей способности гемоглобина в условиях нормы и гипоксии

Показатели кислородсвязывающей способности гемоглобина мы оценивали методом спектроскопии комбинационного рассеяния по конформационным изменениям гемопорфирина.



Рис. 3. 3D-модель (A) и профиль (B) эритроцита голубя в условиях нормоксии. **Fig. 3.** 3D model (A) and profile (B) of pigeon erythrocyte in normoxia.

Анализ спектров комбинационного рассеяния эритроцитов человека, инкубированных в условиях гипоксии, показал, что в эритроцитах уменьшается относительное количество о-Гб ($I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$) на 12.9% и способность гемоглобина сбрасывать лиганды (I_{1375}/I_{1580}) (рис. 5а).

При этом незначительно (на 8.2%) увеличилась способность гемоглобина сбрасывать лиганды. Более значительно (на 31.6%) повысилось сродство гемоглобина к лигандам, прежде всего к кислороду.

Показатели кислородсвязывающей способности гемоглобина ядерных эритроцитов отличались от таковых в случае безъядерных. Кроме этого, для ядерных эритроцитов мы обнаружили несколько иные изменения конформационного состояния гемопорфирина гемоглобина и соответственно показателей кислородсвязывающей способности гемоглобина эритроцитов (рис. 5*B*). Так, в условиях экспериментальной гипоксии относительная доля о-Гб ($I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$) в эритроцитах голубя достоверно не изменилась. Способность гемоглобина связывать лиганды при гипоксии снизилась на 10.1%, а способность выделять лиганды — на 32.8% (рис. 5*B*). При этом увеличилось на 33.9% сродство гемоглобина к лигандам ((I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пребывание ядерных и безъядерных эритроцитов в условиях гипоксии способствовало возникновению различных изменений как со стороны морфологии эрит-



Рис. 4. 3D-модель (*A*) и профиль (*B*) эритроцита голубя в условиях гипоксии. **Fig. 4.** 3D model (*A*) and profile (*B*) of pigeon erythrocyte in hypoxia.

роцита, состояния его мембран (в частности, липидного компонента), так и конформации кислородпереносящего белка – гемоглобина.

Показанные нами изменения в содержании ФИ и одновременное накопление ДАГ однозначно свидетельствуют об активации ФИ-цикла, и, следовательно, об усилении процессов образования вторичных мессенджеров, приводящих к активации протеинкиназы С, осуществляющей фосфорилирование и активацию большого числа внутриклеточных белков.

Как известно, для активации и функционирования фосфоинозитидного цикла необходимы ионы Ca^{2+} . Их поступление в условиях гипоксии показано в ряде работ [45–47].

Увеличение концентрации Ca^{2+} приводит к активации Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 , результатом действия которой является накопление в мембранах лизофракций фосфолипидов и СЖК [48–50].

Сведения об увеличении активности фосфолипаз в условиях гипоксии встречаются и в других источниках литературы [51–53].

В пользу данного факта свидетельствуют и наши результаты, свидетельствующие о снижении содержания одного из количественно преобладающих фосфолипидов мембраны эритроцитов — фосфатидилхолина. На его долю по разным данным может приходиться от 37 до 46% и выше от общего количества ФЛ [54].

Известно также, что он в большем количестве находится во внешней части липидного бислоя мембраны [48, 55–57].



 $1 I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ – относительное количество оксигемоглобина в крови;

- 2 I₁₃₅₅/I₁₅₅₀ относительная способность гемоглобина связывать лиганды (в том числе кислород);
- 3 I₁₃₇₅/I₁₅₈₀ способность гемоглобина сбрасывать лиганды;
- 4 (I₁₃₅₅/I₁₅₅₀)/(I₁₃₇₅/I₁₅₈₀) сродство гемоглобина к лигандам, прежде всего к кислороду.
- $1 I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ the relative amount of HbO₂ in the blood;
- $2 I_{1355}/I_{1550}$ the ability of the total Hb in the sample to bind ligands;
- $3 I_{1375}/I_{1580}$ the ability of Hb to isolate ligands;
- 4 $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ the affinity of Hb to ligands, primarily to O₂.

Рис. 5. Отношение амплитуд в спектре комбинационного рассеяния эритроцитов человека (*A*) и эритроцитов голубя (*B*) при инкубации в нормальных условиях и условиях гипоксии (* $p \le 0.05$ достоверно по отношению к контролю).

Fig. 5. The ratio of amplitudes in the Raman spectrum of human (A) and pigeon (B) erythrocytes during incubation under normal and hypoxic conditions (* $p \le 0.05$ significantly with respect to the control).

Поскольку в эритроцитарных мембранах чуть ли не половина фосфолипидов приходится на ΦX и при гипоксии происходит резкое изменение морфологических характеристик самой клеточной мембраны, можно однозначно утверждать, что доступность фосфатидилхолина для атаки фосфолипаз возрастает. Усиление биосинтетических процессов и, как следствие этого, накопление СЖК, в том числе и в условиях гипоксии, в эритроцитах невозможно.

Учитывая эти данные и изложенные соображения, мы полагаем, что одной из вероятных причин выявленных изменений в составе фосфолипидов, а также ДАГ и СЖК, является активация фосфолипаз С и А2.

Накопление лизоформ фосфолипидов (ЛФХ и ЛФЭА) и СЖК в условиях гипоксии может способствовать "разрыхлению" отдельных участков бислоя липидов мембраны эритроцитов [58].

Увеличение степени насыщенности фосфолипидов эритроцитов, сопровождаемое уменьшением содержания ненасыщенных ЖК, приводит к увеличению микровязкости мембран и возрастанию их кластерности. Все это также может оказывать влияние на изменение кислородсвязывающх свойства гемоглобина эритроцитов через изменение конформации гематопорфирина [59–61].

Многочисленные процессы, происходящие в липидном бислое мембраны, приводят к изменениям морфометрических характеристик эритроцитов в условиях экспериментальной гипоксии (появление эхиноцитов и сфероцитов с перараспределением и конденсацией гемоглобина в объеме клетки). Изменения морфологии эритроцита и, как следствие, распределения в нем гемоглобина существенно влияют на эффективность переноса O₂ в организме и являются признаком многих патологий, связанных с развитием гипоксии [36].

Выявленное нарушение конформации гематопорфирина гемоглобина в эритроцитах в условиях экспериментальной гипоксии приводит к установленному снижению кислородсвязывающей способности гемоглобина (например, снижению относительной способности гемоглобина связывать лиганды, способности гемоглобина сбрасывать лиганды, увеличению сродства гемоглобина к лигандам).

В дезокси-форме метиновые связи гемопорфирина растянуты и деформированы, а лиганды хуже связываются и удерживаются Гб, в оксигенированной форме данные связи, как и сама молекула гемопорфирина, менее деформированы и более компактны. Кроме того, изменяется геометрия пирролов гемопорфирина. В дезоксигемоглобине атом Fe выходит из плоскости порфиринового кольца из-за стерического отталкивания гистидина и атомов азота порфиринового цикла. С-концы глобина дважды соединены солевыми связями, тирозины зафиксированы в полостях между спиралями ван-дер-ваальсовыми и водородными связями, вся структура стабилизирована 2.3-БФГ с отрицательным зарядом.

Принимая во внимание тот факт, что возникновение гипоксии является достаточно распространенным (частым) явлением, возникающим и при физических нагрузках, и при разных формах патологий, можно полагать, что обнаруженные нами изменения в составе липидов и морфологической картине эритроцитарных клеток являются одним из компенсаторных механизмов, сохраняющих способность гемоглобина к транспорту кислорода.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 15-15-10025).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено с разрешения локального этического комитета при Мордовском государственном университете в соответствии с принципами Good Clinical Practice (протокол № 12 от 17 сентября 2014 года). При работе с птицами полностью соблюдали международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Upadhyay R. K. Emerging Risk Biomarkers in Cardiovascular Diseases and Disorders. J. Lipids. 2015.
 - https://doi.org/10.1155/2015/971453
- 2. *Pierson D.J.* Pathophysiology and Clinical Effects of Chronic Hypoxia. Respir. Care. 45(1): 39–53. 2000.
- D'Alessandro A., Xia Y. Erythrocyte adaptive metabolic reprogramming under physiological and pathological hypoxia. Curr. Opin. Hematol. 5. 2020. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000574
- 4. Järemo P., Jejcic A., Jelic V., Shahnaz T., Behbahani H., Oweling M., Winblad B. Alzheimer's Disease: Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate Content and Circulating Erythropoietin. Curr.

Alzheimer. Res. 16(9): 834–835. 2019.

https://doi.org/10.2174/1567205016666190827120108

- Cadiz L., Bundgaard A., Malte H., Fago A. Hypoxia enhances blood O2 affinity and depresses skeletal muscle O₂ consumption in zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 234: 18–25. 2019.
- https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.003
- Liu J., Qiang Y., Alvarez O., Du E. Electrical Impedance Characterization of Erythrocyte Response to Cyclic Hypoxia in Sickle Cell Disease. ACS Sens. 4(7): 1783–1790. 2019. https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00263
- 7. *Li X., Li W., Feng S., Wang R.* Research progress on mechanism in adaptation of hemoglobin to plateau hypoxia. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 48(6): 674–681. 2019.
- Rifkind J.M., Mohanty J.G., Nagababu E., Salgado M.T., Cao Z. Potential Modulation of Vascular Function by Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Released From Erythrocytes. Front. Physiol. 9: 690. 2018. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00690
- 9. *Moras M., Lefevre S.D., Ostuni M.A.* From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. Front. Physiol. 8:1076. 2017.
- 10. González-Alonso J., Mortensen S.P., Dawson E.A., Secher N.H., Damsgaard R. Erythrocytes and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of erythrocyte count and oxygenation state of haemoglobin. J. Physiol. 572(Pt 1): 295–305. 2006.
- 11. Yachie-Kinoshita A., Nishino T., Shimo H., Suematsu M., Tomita M. A Metabolic Model of Human Erythrocytes: Practical Application of the E-Cell Simulation Environment. J. Biomed. Biotechnol. 2010:642420. 2010.
- Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin. Biochemistry. (Mosc). 83(12): 1575–1593. 2018. https://doi.org/10.1134/S0006297918120155
- Yamaguchi T., Fukuzaki S. ATP effects on response of human erythrocyte membrane to high pressure. Biophys. Physicobiol. 16: 158–166. 2019. https://doi.org/10.2142/biophysico.16.0 158
- 14. Соломадин И.Н., Маров Н.В., Бенедиктова Н.И., Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Токсическое действие Ap25-35 и фуллерена С60 на эритроциты. Известия РАИ. Серия биол. 4: 507–512. 2008. [Solomadin I.N., Marov N.V., Benediktova N.I., Kosenko Ye.A., Kaminskiy YU. G. Toxic effect of Ar 25–35 and fullerene C60 on red blood cells. Russ. Izvestiya RAI. Seriya biol. 4: 507–512. 2008. (In Russ)].
- Perez-Guaita D., Veij M. de, Marzec K.M., Almohammedi A.R.D., McNaughton D., Hudson A.J., Wood B.R. Resonance Raman and UV-Visible Micros-copy Reveals that Conditioning Red Blood Cells with Repeated Doses of Sodium Di-thionite Increases Haemoglobin Oxygen Uptake. Chem. Select. 2(11): 3342–3346. 2017.
- 16. *Wood B.R., Tait B., Mc Naughton D.* Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte. Biochim. Biophys. Acta. 1539 (1–2): 58–70. 2001.
- 17. *Ramser K., Wenseleers W., Dewilde S., Van Doorslaer S., Moens L.* The combination of resonance Raman spectroscopy, optical tweezers and microfluidic systems applied to the study of various heme-containing single cells. J. Spectrosc. 22(4): 287–295. 2008.
- 18. *Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.* The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100:119-30. 1963.
- 19. *Watts C., Wheeler K.P.* Partial separation of a sodium-dependent transport system for amino acids in avian erythrocyte membranes. FEBS Lett. 94(2): 241–244. 1978.
- 20. *Bligh E.A., Dyer W.* Rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37(8): 911–917. 1959.
- 21. Эванз У.Г., Морре Д.Д., О'Брайтман Э., Санделиус А.С., Бейлез Э.М., Ричардсон П.Дж., Лузио Дж.П., Хиггинс Д.А., Джонс О.Т., Эрнест Ю.П., Мак-Нэми М.Дж., Финдлей Дж.Б., Башфорд К.Л., Шуберт Д., Сивапрасадарао А. Биологические мембраны. Методы. Пер. с англ. Дж.Б. Финдлей, У.Г. Эванз (Ред.). М. Мир. 1990. [Evans W.G., Morre D.D., O'Brightman E., Sandelius A.S., Beylez E.M., Richardson P.J., Lusio J.P., Higgins D.A., Jones O. T., Ernest J.P., McNemy M.J., Findlay J.B., Bashford K.L., Schubert D., Sivaprasadarao A. Biologicheskiye membrany. Metody [Biological membranes. Methods. Findlay J.B. Evans W.G. (Eds.)]. Moscow. Mir. 1990. (In Russ)].
- 22. *Handloser D., Widmer V., Reich E.* Separation of phospholipids by HPTLC an investigation of important parameters. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 31: 1857–1870. 2008.
- 23. *Reich E., Schibli A.* A standardized approach to modern high performance tlm-layer chromatography (HPTLC). J. Planar Chromatogr.–Mod. TLC. 6(17): 438–443. 2004.
- 24. *Кирхнер Ю*. Тонкослойная хроматография. М. Мир. 1981. [Kirkhner Yu. Tonkosloynaya khromatografiya [Thin -layer chromatography]. Moscow. Mir. 1981. (In Russ)].

- 25. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis. J. Chromatogr. 114(1): 129–141. 1975.
- Marinetti G.V., James A.T., Morris L.J. New Biochemical Separations. Van Nostrand. Princeton. N. J. 1964.
- 27. Morrison W.R., Smith. M.L. Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from lipid with boron fluoride-methanol. J. Lipid. Res. 5: 600-608. 1964.
- Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. Bull. Exp. Biol. Med. 145(3): 382–385. 2008.
- Yusipovich A.I., Parshina1 E.Yu., Brysgalova1 N.Yu., Brazhe A.R., Brazhe N.A., Lomakin A G., Levin G.G., Maksimov G.V. Laser interference microscopy in erythrocyte study. J. Appl. Phys. 105(10): 102037. 2009.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods. 28.9(7): 676–682. 2012.
- Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced raman spectroscopy. Biophys. J. 97(12): 3206–3214. 2009.
- 32. Brazhe N.A. Brazhe N.A., Ba?zhumanov A.A., Parshina E.Iu., Iusipovich A.I., Akhalaia M.Ia., Iarlykova Iu.V., Labetskaia O.I., Ivanova S.M., Morukov B.V., Maksimov G.V. Studies of the blood antioxidant system and oxygen-transporting properties of human erythrocytes during 105-day isolation. Aviakosm. Ekolog. Med. 45(1): 40–45. 2014.
- Revin V.V., Gromova N.V., Revina E.S., Martynova M.I., Seikina A.I., Revina N.V., Imarova O.G., Solomadin I.N., Tychkov A.Yu., Zhelev N. Role of Membrane Lipids in the Regulation of Erythrocytic Oxygen-Transport Function in Cardiovascular Diseases. Biomed Res. Int. 2016(1): 1– 11. 2016.
- 34. *Maksimov G.V., Maksimova N.V., Churin A.A., Orlov S.N., Rubin A.B.* Study on conformational changes in hemoglobin protoporphyrin in essential hypertension. Biochemistry. (Mosc.). 66(3): 295–299. 2001.
- 35. *Mityanina V.A., Parshina E.Yu, Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Selischeva A.A.* Oxygen-binding characteristics of erythrocyte in children with type I diabetes mellitus of different duration. Bull. Exp. Biol. Med. 153(4): 508–512. 2012.
- 36. Yusipovich A.I., Braze N.A., Luneva O.G., Parshina E.Y., Churin A.A., Rodnenkov O.V., Maksimov G.V. Changes in the state of hemoglobin in patients with coronary heart disease and patients with circulatory failure. Bull. Exp. Biol. Med. 155(2): 233–235. 2013.
- Rodnenkov O.V., Luneva O.G., Ulyanova N.A., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I. Erythrocyte membrane fluidity and haemoglobin haemoporphyrin conformation: features revealed in patients with heart failure. Pathophysiology. 11(4): 209–213. 2005.
- Sidorenko S.V., Luneva O.G., Novozhilova T.S., Alekseeva N.V., Rodnenkov O.V., Deev L.I., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. Hemolysis and ATP Release from Human and Rat Erythrocytes under Conditions of Hypoxia: A Comparative Study. Biochemistry (Moscow), Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology. 12(2): 114–120. 2018.
- 39. Geary R.C. Testing for Normality. Biometrika. 34(3/4): 209–242. 1947.
- 40. *Tukey J.W.* Comparing individual means in the analysis of variance. Biometrics. 5(2): 99–114. 1949.
- 41. *Watts C., Wheeler K. P.* Protein and lipid components of the pigeon erythrocyte membrane. Biochem. J. 173(3): 899–907. 1978.
- 42. Корженевский Д.А. Селищева А. А. Определение фосфолипидного состава эритроцитов человека в норме методом ВЭЖХ с детектором светорассеяния. Бюлл. экс. биол. мед. 147(4): 473–476. 2009. [Korzhenevsky D.A. Selishcheva A.A. Determination of the phospholipid composition of human red blood cells in normal by HPLC with a light scattering detector. Bull. Exp. Biol. Med. 147(4): 473–476. 2009. [In Russ)].
- 43. *Revin V.V., Filatova S.M., Syusin I.V., Yazykova M.Y., Revina E.S., Gromova N.V., Devyatkin A.A.* Study of correlation between state and composition of lipid phase and change in erythrocytes structure under induction of oxidative processes. Int. J. Hematol. 101(5): 487–496. 2015.
- 44. Revin V.V., Gromova N.V., Revina E.S., Mel'nikova N.A., Balykova L.A., Solomadin I.N., Tychkov A.Yu., Revina N.V., Gromova O.Yu., Anashkina I.V., Yakushkin V.A. Study of the Structure, Oxygen-Transporting Functions, and Ionic Composition of Erythrocytes at Vascular. Biomed. Res. Int. 2015: 973973. 2015.
- 45. *Tiffert T., Etzion Z., Bookchin R.M., Lew V.L.* Effects of deoxygenation on active and passive Ca²⁺ transport and cytoplasmic Ca²⁺ buffering in normal human red cells. J. Physiol. 464: 529–544. 1993.

- 46. Wang J., Kimcorresponding D. Activation of voltage-dependent K⁺ channels strongly limits hypoxia-induced elevation of [Ca²⁺]i in rat carotid body glomus cells. J. Physiol. 596(15): 3119–3136. 2018.
- 47. Grygorczyk R., Orlov S. N. Effects of Hypoxia on Erythrocyte Membrane Properties—Implications for Intravascular Hemolysis and Purinergic Control of Blood Flow. Front. Physiol. 8: 1110. 2017.
- 48. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Федорова Т.С., Кравец Е.Б., Иванов В.В., Жаворонок Т.В., Часовских Н.Ю., Чудакова О.М., Бутусова В.Н., Яковлева Н.М. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы. Бюлл. Сибирск. медицины. 2: 62–68. 2006. [Novitsky VV., Ryazantseva N.V., Stepovaya Ye.A., Fyodorova T.S., Kravets Ye.B., Ivanov V.V., Zhavoronok T.V., Chasovskikh N.Yu., Choudakova O.M., Butusova V.N., Yakovleva N.M. Moleculardisturbances of erythrocytes membrane during pathology of different genesis are the typical reaction of the organism: contours of the problem. Bull. Siberian Med. 2: 62–68. 2006. [In Russ)].
- 49. Michiels C., Renard P., Bouaziz N., Heck N., Eliaers F., Ninane N., Quarck R., Holvoet P., Raes M. Identification of the phospholipase A(2) isoforms that contribute to arachidonic acid release in hypoxic endothelial cells: limits of phospholipase A(2) inhibitors. Biochem. Pharmacol. 63(2): 321–332. 2002.
- 50. Wu H., Bogdanov M., Zhang Yu., Sun K., Zhao S., Song A., Luo R., Parchim N.F., Liu H., Huang A., Adebiyi M.G., Jin J., Alexander D.C., Milburn M.V., Idowu M., Juneja H.S., Kellems R.E., Dowhan W., Xiaa Ya. Hypoxia-mediated impaired erythrocyte Lands' Cycle is pathogenic for sickle cell disease. Sci. Rep. 6: 29637. 2016.
- 51. Дещекина М.Ф., Танаева Г.В., Демин В.Ф. Состояние перекисного окисления липидов и липидного состава плазмы у новорожденных, перенесших острую и хроническую гипоксию. Педиатрия. 2: 22–25.1988. [Deshchekina M.F., Tanaeva G.V., Demin V.F. State of lipid peroxidation and plasma lipid composition in newborns undergoing acute and chronic hypoxia. Pediatriya. 2: 22–25. 1988. (In Russ)].
- 52. Лоскутова Е.В., Воронцова И.А., Вахитов Х.М., Валеева И.Х., Полякова О.И., Вахитова Л.Ф., Шибалова О.Н., Нуриахметова И.Т., Шарафутдинова Э.А., Сафиуллин Т.Р. Состояние системы липопероксидации у недоношенных новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию. Рос. вестник перинатол. и педиатрии. 63(5): 135–138. 2018. [Loskutova E.V., Vorontsova I.A., Vahitov H.M., Valeeva I.H., Polyakova O.I., Vahitova L.F., Shibalova O.N., Nuriahmetova I.T., Sharafutdinova E.A., Safiullin T.R. The Condition of the Lipoperoxidation System in Premature Newborns After Perinatal hypoxia. Ross. Vestnik Perinatol. Pediatrii. 63(5): 135–138. 2018. (In Russ)].
- 53. Ишутина Н.А., Дорофиенко Н.Н., Болелова С.М. Фракционный состав фосфолипидов мембран эритроцитов у беременных с бронхиальной астмой. Бюлл. физиол. патол. дыхания. 31. 60–62. 2009. [Ishutina N.A., Dorofienko N.N., Bolelova S M. Fractional phospholipid composition of erithrocytes membranes in pregnant women with bronchial asthma. Fraktsionnyy sostav fosfolipidov membrane eritrotsitov u beremennykh s bronkhial'nov astmoy. Bull. Physiol. Respirat. Pathol. 31: 60–62. 2009. (In Russ)].
- 54. Sunyakina O.A., Konoplya N.A., Sergeeva S.L., Barsuk A.A. Protein-lipid composition of erythrocyte membranes and metabolism in chronic endometritis. In the world of scient. Discover. Ser. A. 5(1–2): 14–27. 2017.
- 55. *Virtanen J.A., Cheng K.H., Somerharju P.* Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 4964–4969. 1998.
- 56. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск. Изд-во Томск. Универ. 2004. [Novitsky V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A. Fiziologiya i patofiziologiya eritrotsita. [Physiology and pathophysiology of an erythrocyte]. Tomsk. Publishing House Tomsk. Univer. 2004. (In Russ)].
- 57. *Daleke D.L.* Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. J. Lipid Res. 44: 233–242. 2003.
- 58. *Mills J.K., Needham D.* Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition. Biochim. Biophys. Acta. 1716(2): 77–96. 2005.
- 59. *Shaklai N., Yguerabide J., Ranney H.M.* Interaction of hemoglobin with red blood cell membranes as shown by a fluorescent chromophore. Biochemistry. 16(25): 5585–5592. 1997.
- 60. Walder J.A., Chatterjee R., Steck T.L., Low P.S., Musso G.F., Kaiser E.T., Rogers P.H., Arnone A. The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. 259(16): 10238–10246. 1984.
- 61. Chen Q., Balazs T.C., Nagel R.L., Hirsch R.E. Human and mouse hemoglobin association with the transgenic mouse erythrocyte membrane. FEBS Lett. 580(18): 4485–4490. 2006.

Comparative Characteristics of the Lipid Composition and Morphofunctional Indicators of Nuclear and Non-Nuclear Erythrocytes under Conditions of Hypoxia

V. V. Revin^{*a*}, N. V. Gromova^{*a*}, ^{*}, E. S. Revina^{*a*}, I. P. Grunyushkin^{*a*}, T. P. Kuzmenko^{*a*}, T. O. Oshkina^{*a*}, and S. S. Bochkareva^{*a*}

^aNational Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia *e-mail:nataly_grom@mail.ru

A comparative study of the properties of nuclear and non-nuclear erythrocytes in experimental hypoxia. The phospholipid and fatty acid composition of individual phospholipids, the content of free fatty acids in the composition of nuclear-free and nuclear red blood cells were determined by thin-layer chromatography. The method of laser interference microscopy was used to study the morphometric characteristics of nuclear and nuclear-free red blood cells and the distribution of hemoglobin. Conformational changes in the hemoporphyrin of nuclear and nuclear-free red blood cells under hypoxia were studied by Raman spectroscopy. It has been shown that under conditions of hypoxia, changes in the phospholipid and fatty acid composition occur in the membranes of both nuclear and non-nuclear erythrocytes, leading to the accumulation of lysoforms of phospholipids, diacylglycerol and free fatty acids, as well as to an increase in the degree of saturation of fatty acids in phospholipids. These changes indicate structural changes in the membrane of nuclear-free and nuclear red blood cells and, as a result of this, functional changes both on the part of the red blood cell in general and the main oxygen-transporting protein of red blood cells — hemoglobin.

Keywords: red blood cells, membrane, phospholipids, fatty acids, hemoglobin

ЦИТИРОВАТЬ:

Ревин В.В., Громова Н.В., Ревина Э.С., Грунюшкин И.П., Кузьменко Т.П., Ошкина Т.О., Бочкарева С.С. Сравнительная характеристика липидного состава и морфофункциональных показателей ядерных и безъядерных эритроцитов в условиях гипоксии. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(5): 631–653.

DOI: 10.31857/S0869813920050106

TO CITE THIS ARTICLE:

Revin V.V., Gromova N.V., Revina E.S., Grunyushkin I.P., Kuzmenko T.P., Oshkina T.O., Bochkareva S.S. Comparative Characteristics of the Lipid Composition and Morphofunctional Indicators of Nuclear and Non-Nuclear Erythrocytes Under Conditions of Hypoxia. Russian Journal of Physiology. 106(5): 631–653.

DOI: 10.31857/S0869813920050106

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 5, с. 654-662

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК БЕЛКОВ NAP-22 И GAP-43 У КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

© 2020 г. А. С. Альдекеева¹, С. Я. Резник², Ю. С. Крайнова¹, Н. З. Клюева^{1, *}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия ²Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: KluevaNZ@infran.ru

> Поступила в редакцию 05.02.2020 г. После доработки 18.03.2020 г. Принята к публикации 19.03.2020 г.

Цель исследования — выявить различия в двигательной активности крыс линии SHR и WKY и оценить уровень экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43 в нейронах теменной коры и гиппокампа. Двигательную активность крыс линий SHR и WKY (4 животных в каждой группе) фиксировали телеметрическим методом в течение 3 суток. Уровни экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43 в нейронах теменной коры и гиппокампа у других групп крыс этих линий (по 10 животных каждой линии) определялись методом ПЦР в реальном времени. Работа выполнена с использованием животных из Биоколлекции ИФ РАН. Найдено, что двигательная активность крыс линии SHR была выше, чем крыс линии WKY, но статистически эти различия были достоверны только во время темновой фазы. Уровень экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43 у крыс линии SHR был ниже, чем у крыс линии WKY как в теменной коре, так и в гиппокампе. Заключается, что большая подвижность крыс линии SHR отражает характерную для крыс этой линии гиперактивность, что делает их удобной моделью синдрома дефицита внимания с гиперактивностью. Изменения в уровне экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43 могут быть связаны с поведенческими нарушениями.

Ключевые слова: крысы линии SHR, крысы линии WKY, суточная ритмика, двигательная активность, белок NAP-22, белок GAP-43 **DOI:** 10.31857/S0869813920050015

В последнее время крысы со спонтанной гипертензией (линии SHR) широко используются в качестве экспериментальной модели синдрома дефицита внимания с гиперактивностью у детей (СДВГ). При сравнении крыс линий SHR с их нормотензивным контролем, линией WKY, наблюдаются выраженные межлинейные отличия [1–3]. Крысы линии SHR имеют более высокий уровень двигательной активности в целом, а также отличаются по распределению активности в темное и светлое время суток (световую и темновую фазу) от крыс линии WKY [4, 5]. Однако механизмы возникновения таких отличий и возможные молекулярные и клеточные процессы, влияющие на уровень активности, остаются недостаточно исследованными. СДВГ – это широко распространенное, хроническое, неврологическо-поведенческое расстройство развития, которое проявляется с раннего детского возраста и выражается в нарушениях концентрации внимания и гиперактивности (встречается примерно у 5% детского населения [6]), у взрослых может перерасти в снижение интеллекта и трудности с восприятием информации. Для крыс

линии SHR характерны генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке, проявляющиеся в изменении структуры и функционирования кальциевых каналов разных типов [7], что приводит к перегрузке цитозоля клеток несвязанными ионами Ca^{2+} . Также у этих животных имеются серьезные отличия в обмене катехоламинов [8].

Структуры, осуществляющие реализацию и регуляцию суточных ритмов, включают разнообразные осцилляторы, важнейшим из которых является супрахиазматическое ядро гипоталамуса [9], функционирование которого играет ведущую роль в поддержании энергетического баланса, сна, терморегуляции, пищевого поведения и двигательной активности [10].

Ранее было показано, что крысы линии SHR демонстрируют отличия в уровне двигательной активности по сравнению с крысами линии WKY, и максимальные межлинейные различия отмечаются в возрасте от 4 до 16 недель. В этом возрасте в тесте открытое поле у крыс линии SHR была существенно выше горизонтальная и вертикальная активность, общая измеренная длина пробега [5].

Другим следствием нарушения обмена кальция в клетке у крыс линии SHR являются изменения в уровне экспрессии мPHK таких мажорных субстратов протеинкиназы С (ПКС), как белки GAP-43 и NAP-22. Среди широкого спектра функций этих белков в мозге — регуляция концентрации кальмодулина, ускорение роста аксонов, усиление ветвления нервных окончаний, регуляция высвобождения нейротрансмиттера [11]. Исследуемые белки участвуют в кальциевом пути передачи внутриклеточного сигнала, непосредственно взаимодействуя с протеинкиназой С и кальмодулином. В предыдущих исследованиях мы обнаружили, что в раннем постнатальном онтогенезе содержание этих белков в различных структурах головного мозга, в частности в теменной коре и гиппокампе, у крыс линии SHR достоверно выше, чем у крыс линии WKY [12]. Это указывает на изменение кальций-зависимых каскадов передачи внутриклеточного сигнала. Известно также, что содержание ионов кальция в нейронах супрахиазматического ядра, регулирующего суточные ритмы, само подчиняется этим ритмам [13].

Кроме того, показано, что структуры гиппокампа непосредственно влияют на суточную ритмику двигательной активности. Разрушение этой структуры ведет к нарушению динамики двигательной активности, характерной для этих животных [14]. Также, в реализации ритма локомоторной активности у крыс, кроме супрахиазматического ядра, участвуют структуры дорсального отдела стриатума и теменной коры [15].

Таким образом, цели настоящего исследования — анализ суточного распределения двигательной активности крыс со спонтанной гипертензией (линии SHR) и крыс линии WKY (нормотензивный контроль), а также оценка влияния нарушений обмена кальция в нейронах у этих животных на изменение уровня экспрессии мPHK белков NAP-22 и GAP-43, задействованных в кальций-зависимых каскадах передачи внутриклеточного сигнала в теменной коре и гиппокампе, что связано с непосредственным участием их в формировании суточной ритмики двигательной активности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали 4 взрослых самца линии SHR массой 180–250 г, АД выше 170 мм рт. ст., и 4 взрослых самца линии WKY такой же массы, АД ниже 125 мм рт. ст. (в качестве контроля) в возрасте 12–14-ти недель. Регистрация АД у всех животных производилась манжеточным методом перед и после эксперимента (с помощью окклюзионной манжетки и электроманометра "ELEMA"). Рассчитывалось среднее значение системного АД по результатам трех последних измерений. Для оценки

уровня двигательной активности был разработан специальный биотелеметрический комплекс, в камерах которого в процессе опыта поддерживалась температура 20°С, длительность светового дня составляла 12 ч (с 10:00 до 22:00). Все клетки были сконструированы согласно санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию вивариев от 6 апреля 1973 г. со свободным доступом к еде и воде. Крысы получали сухой корм производства ЗАО "Гатчинский комбикормовый завод" (рецепт № ПК-120 сх_1492 для лабораторных животных) и обычную питьевую воду. Работа выполнена с использованием животных из Биоколлекции ИФ РАН, при проведении экспериментов соблюдались все требования комиссии по контролю по содержанию и использованию лабораторных животных при Институте физиологии им И.П. Павлова РАН. Это исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации, Международными стандартами по работе с лабораторными животными, и с разрешения комиссии по биоэтике ФГБУН "Институт физиологии имени И.П. Павлова" РАН (протокол № 01/08 от 01.08.19 г.).

Регистрация двигательной активности

Двигательную активность крыс регистрировали в течение трех суток методом телеметрии с использованием установленных по бокам клеток оптических датчиков барьерного типа, которые фиксировали прерывание луча при перемещении крысы из одной части клетки в другую. Высота расположения и чувствительность датчиков были рассчитаны таким образом, чтобы, по возможности, исключить ложные срабатывания. Сигналы от всех датчиков собирались аппаратно и обрабатывались на компьютере, суммирующем число пересечений по 5-минутным интервалам, а затем эти данные были усреднены для световой и темновой фаз трех дней наблюдения за каждой особью.

Исследование уровня экспрессии мРНК белков – мажорных субстратов ПКС

В этом опыте использовали другие группы самцов линии SHR массой 180-250 г и самцов линии WKY той же массы и возраста, содержащиеся в таких же условиях. Для определения уровня экспрессии мРНК этих белков в образцах нервной ткани (теменная кора и гиппокамп) животные были декапитированы под легким эфирным наркозом с последующим забором проб. Из образцов нервной ткани крыс обеих линий была выделена суммарная мРНК с помощью набора Quick-RNA[™] MiniPrepKit (ZymoResearch, США) согласно протоколу исследования. Далее осуществляли синтез комплементарной ДНК обратной транскрипцией. Уровни экспрессии NAP-22 и GAP-43 определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров на амплификаторе АНК-32 (ИАП РАН, Россия). В качестве референса для нормировки результатов амплификации использовали ген β-актина. В табл. 1 приведены последовательности праймеров и зондов для детекции транскриптов генов NAP-22, GAP-43 и β-актина. Условия проведения ПЦР: 1. 95°С 300 с – 1 цикл; 2. 60°С 40 с, 95°С 15 с – 50 циклов. Количественное выражение результатов проводилось с помощью расчета разницы экспрессии исследуемого гена относительно нормировочного гена по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$ [16]. Всего в этом опыте использовано по 10 самиов каждой линии.

Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки результатов (сравнения линий) использовали критерий Манна–Уитни, для графического представления данных по двигательной активности — медианы и квартили. Все статистические вычисления были проведены с помощью программы SYSTAT 10.2.

Ген белков Gene	Праймеры и зонды Primers and probes	Последовательность (5'-3') Sequence (5'-3')			
	rNAP22-F2	AACTCCAAGATGGGAGGCAAG			
NAP-22	rNAP22-R2	CAGCCTTCTTGTCTTTGTCCTT			
	rNAP-22 probe ROX	(ROX)CTACAATGTGAACGACGAGAAGGCCA(BHQ-2)			
GAP-43	GAP43-up	GAAGAGAGGAGGAAAGGAGAG			
	GAP43-low	TCAACCTGTTTGGTTCTTCTCATA			
	rGAP43 probe ROX	(ROX)CAGCATGGTGGTATGTTCCCCTGCC(BHQ-2)			
β-актин	Rat_ACTB_u	AGCCATGTACGTAGCCATCCA			
	Rat_ACTB_1	TCTCCGGAGTCCATCACAATG			
	Rat_ACTB_Pr_up2	(FAM)TGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC(RTQ1)			

Таблица 1. Праймеры и зонды для детекции транскриптов генов белков NAP-22, GAP-43 и β -актина **Table 1.** Primers and probes for the detection of the NAP-22, GAP-43 and β -actin genes transcripts

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные о средней двигательной активности каждой особи каждой из двух линий во время световой и темновой фаз опыта представлены на рис. 1. На этом рисунке хорошо видны и межлинейные различия (двигательная активность SHR выше, чем WKY) и различия между особями одной линии. При этом межлинейные различия в двигательной активности статистически достоверны по критерию Манна–Уитни в темную (p < 0.05), но не в светлую (p > 0.05) фазы суточного цикла.



Рис. 1. Двигательная активность крыс линий SHR и WKY. Каждый символ соответствует одной особи. Приведены медианы и квартили двигательной активности за час трехдневных наблюдений для световой и темновой фаз суточного цикла (*n* = 36).

Fig. 1. Locomotor activity of SHR and WKY strain rats. Each symbol corresponds to one individual. Medians and quartiles of hourly locomotor activity for the light and dark phases of the 3 days of observations are shown (n = 36).



Рис. 2. Уровни экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43 в нейронах теменной коры (*A*) и гиппокампа (*B*) крыс линий SHR и WKY. Каждый символ соответствует одной особи. **Fig. 2.** The expression levels of mRNA of NAP-22 and GAP-43 proteins in the neurons of the parietal cortex (*A*) and hippocampus (*B*) of SHR and WKY strain rats. Each symbol corresponds to one individual.

Из рис. 2 видно, что уровни экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43 в нейронах теменной коры и гиппокампа крыс линии SHR ниже, чем у крыс линии WKY. Достоверность этих межлинейных различий по критерию Манна—Уитни достаточно высока (p < 0.01) и для обоих белков и для обеих структур головного мозга.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наличие индивидуальных внутрилинейных различий у крыс со спонтанной гипертензией можно объяснить тем, что генетически детерминированные нарушения обмена кальция у этих животных могут проявляться в разной степени в зависимости от выраженности нарушений функционирования молекулярных механизмов, обеспечивающих поддержание постоянной концентрации ионов кальция в цитоплазме. Наши исследования показали, что и у крыс линии WKY (нормотензивный контроль) могут частично проявляться генетически детермированные нарушения обмена кальция в клетке, что может проявляться в обнаруженных различиях между отдельными особями. Следует отметить, что у некоторых животных могут включаться компенсаторные механизмы (например, связанные с изменением уровня поступления экзогенного кальция), и может меняться степень вовлечения внутриклеточных механизмов, участвующих в обмене кальция (например, активность кальциевых АТФаз).

Изменения уровня экспрессии мРНК белков, основных субстратов ПКС в нейронах теменной коры и гиппокампа, могут косвенно отражать изменения функционирования соответствующего кальций-зависимого каскада передачи внутриклеточного сигнала в нейронах этих структур. Наличие у крыс линии SHR таких изменений подтверждает, что генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетках этих животных [7, 17] могут затрагивать не только функционирование структур сердечно-сосудистой системы (в том числе гладкомышечных клеток сосудистой стенки и кардиомиоцитов), но и структур ЦНС. Также у крыс со спонтанной гипертензией, из-за низкого уровня содержания ионов кальция во внеклеточной среде, начинается выработка в паращитовидных железах особого паратиреоидного гипертензивного фактора (ПГФ, представляющего собой связанный с фосфолипидом олигопептид), который исследовался в первой декаде 21 века. ПГФ специфически воздействует на систему адренорецепторов, является пролонгированным вазопрессором, повышает чувствительность к экзогенным катехоламинам, и, возможно, замедляет их катаболизм [18]. Воздействие ПГФ осуществляется на фоне существенных различий в активности гипоталамо-гипофизарной адреналовой оси по сравнению с крысами линии WKY [8]. Можно полагать, что наблюдаемые нами эффекты являются также следствием вышеописанных изменений функционирования адренергической системы в теменной коре и гиппокампе, и полученные нами данные могут использоваться для количественной оценки воздействия тех или иных фармакологических агентов (в частности, адреностимуляторов и адреноблокаторов).

Особенности обмена белка NAP-22 у крыс со спонтанной гипертензией могут быть полезны для понимания значения этого белка, которое, учитывая его многообразную регуляторную функцию [11], представляет собой интересный предмет исследований. Эти данные полезны для понимания особенностей функционирования кальций-зависимых каскадов передачи внутриклеточного сигнала в условиях генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке. Белки NAP-22 и GAP-43 в процессе онтогенеза активно участвуют в образовании нейронных сетей, а у взрослых животных в обеспечении процессов нейропластичности, и нарушения или изменения их обмена в нейронах могут свидетельствовать о нарушениях этих процессов [19], что, в свою очередь, может оказаться одним из механизмов реализации характерных для СДВГ поведенческих нарушений [20]. Исследование белков – основных субстратов ПКС открывает возможности для ранней диагностики (в том числе пренатальной и ранней постнатальной) этого заболевания и поиска новых приемов для нормализации таких отклонений. В отличие от GAP-43 белок NAP-22 не является исключительно нейроспецифичным, поэтому исследование его обмена обладает более высокой диагностической ценностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Двигательная активность крыс линии SHR выше, чем у крыс линии WKY. Уровни экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43 в нейронах теменной коры и гиппокампа крыс линии SHR ниже, чем у крыс линии WKY.

Исследование белков – основных субстратов ПКС позволяют выявить связь наблюдаемых молекулярных закономерностей именно с генерализованной патологией, что и имеет место у крыс линии SHR – генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетках, общее повышение артериального давления, а также такие симптомы СДВГ, как гиперактивность, импульсивность, сложности с обучением. Полученные нами данные дополняют характеристику крыс линии SHR в качестве модели СДВГ по динамике распределения двигательной активности, а также в качестве животных с генетически детерминированными нарушениями метаболизма катехоламинов и кальция в клетках.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РФ 47 ГП "Научно-технологическое развитие Российской Федерации" (2019–2030 гг.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sagvolden T., Johansen E.B. Rat models of ADHD. In: Stanford C., Tannock R. (Eds.) Behavioral neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and its treatment. Berlin/Heidelberg. Springer. 2012: 301–315.2012. https://doi.org/10.1007/7854 2011 126
- Fan X., Bruno K.J., Hess E.J. Rodent models of ADHD In: Stanford C., Tannock R. (Eds.) Behavioral neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and its treatment. Berlin/Heidelberg. Springer. 273–300. 2012. https://doi.org/10.1007/7854_2011_121
- Tsai M.L., Kozłow2ska A., Li Y.S., Shen W.L., Huang A.C.W. Social factors affect motor and anxiety behaviors in the animal model of attention-deficit hyperactivity disorders: A housingstyle factor. Psychiatry Res. 254: 290–300. 2017. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.05.008
- Lai C.T., Chen C.Y., Kuo T.B., Chern C.M., Yang C.C. Sympathetic hyperactivity, sleep fragmentation, and wake-related blood pressure surge during late-light sleep in spontaneously hypertensive rats. Am. J. Hyperten. 29(5): 590–597. 2015. https://doi.org/10.1093/ajh/hpv154
- Hsieh Y.L., Yang C.C. Age-series characteristics of locomotor activities in spontaneously hypertensive rats: a comparison with the Wistar–Kyoto strain. Physiol. Behav. 93(4–5): 777–782. 2008. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.032
- Заваденко Н.Н. Синдром дефицита внимания и гиперактивности: новое в диагностике и лечении. Вестник Северн. (Арктического) федер. универ. Серия: Мед.-биол. науки. 1: 31–39. 2014. [Zavadenko N.N. Attention deficit hyperactivity disorder: new in the diagnosis and treatment. – Vestnik Severn. (Arkticheskogo) federal. univer. Seriya: Mediko-Biol. Sci. 1: 31– 39. 2014. (In Russ)].
- 7. Cox R.H., Rusch N.J. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. Microcirculation. 9(4): 243–257. 2002. https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800140
- Berg T. Altered β1-3-adrenoceptor influence on α2-adrenoceptor-mediated control of catecholamine release and vascular tension in hypertensive rats. Front. Physiol. 6: 120. 2015. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00120
- 9. *Takahashi J.S.* Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. Nat. Rev. Genetics. 18(3): 164. 2017.
- https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150
- Huang W., Ramsey K.M., Marcheva B., Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. J. Clin. Invest. 121 (6): 2133–2141. 2011. https://doi.org/10.1172/JCI46043
- Mosevitsky M.I. Nerve ending "signal" proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. Int. Rev. Cytol. 245: 245–325. 2005. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)45007-X
- 12. Клоееа Н.З., Руденко Е.Д., Альдексееа А.С., Плеханов А.Ю., Чернышев Ю.И., Антонова О.С. Влияние солевой нагрузки на уровень обмена белка NAP 22 мажорного субстрата протеинкиназы С в гиппокампе и теменной коре крыс со спонтанной гипертензией. Артер. гипертенз. 23(4): 325–331. 2017. [Кlyueva N.Z., Rudenko E.D., Aldekeeva A.S., Plekhanov A.Y., Chernyshev Y.I., Antonova O.S. Metabolism of the major protein kinase C substrate NAP-22 in hippocampus and parietal cortex of spontaneously-hypertensive rats: the impact of dietary salt load. Arter. Hypertens. 23(4): 325–331. 2017. [In Russ]]. https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-4-325-331
- Enoki R., Ono D., Kuroda S., Honma S., Honma K.I. Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. Scient. Rep. 7: 41733. 2017. https://doi.org/10.1038/srep41733(2017)
- 14. Арушанян Э.Б., Попов А.В. Современные представления о роли супрахиазматических ядер гипоталамуса в организации суточного периодизма физиологических функций. Успехи физиол. наук. 42(4): 39–58. 2011. [Arushanyan E.B., Popov A.V. Modern ideas about

the role of the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the organization of daily periodism of physiological functions. Advanc. Physiol. Sci. 2011; 42(4): 39–58. 2011. (In Russ)].

- Natsubori A., Honma K., Honma S. Dual regulation of clock gene Per2 expression in discrete brain areas by the circadian pacemaker and methamphetamine-induced oscillator in rats. Eur. J. Neurosci. 39(2): 229–240. 2014. https://doi.org/10.1111/ejn.12400
- Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. Nat. Protoc. 3(6): 1101–1108. 2008. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73
- Cox R.H., Fromme S. Expression of calcium channel subunit variants in small mesenteric arteries of WKY and SHR. Am. J. Hypertens. 28(10): 1229–1239. 2015. https://doi.org/10.1093/ajh/hpv024
- 18. Чурина С.К., Клюева Н.З., Антонова О.С., Руденко Е.Д., Петрова Е.И., Макаров В.Л., Борисова И.Ю. Генетически детерминированные механизмы развития артериальной гипертензии при дефиците экзогенного кальция (паратиреоидный гипертензивный фактор). Артер. гипертенз. 20(5): 343–348. 2014. [Churina S.K., Klyueva N.Z., Antonova O.S., Rudenko E.D., Petrova E.I., Makarov V.L., Borisova I.Y. Genetically determined mechanisms of arterial hypertension related to dietary calcium deficiency (parathyroid hypertensive factor). Arter. Hypertens. 20(5): 343–348. 2014. https://doi.org/10.18705/1607-419X-2014-20-5-342-348 (In Russ)].
- Kropotova E., Klementiev B., Mosevitsky M. BASP1 and its N-end fragments (BNEMFs) dynamics in rat brain during development. Neurochem. Res. 38(6): 1278–1284. 2013. https://doi.org/10.1007/s11064-013-1035-y
- Zhou R., Bai Y., Yang R., Zhu Y., Chi X., Li L., Chen L. Abnormal synaptic plasticity in basolateral amygdala may account for hyperactivity and attention-deficit in male rat exposed perinatally to low-dose bisphenol-A. Neuropharmacology. 60(5): 789–798. 2011. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.031

Locomotor Activity and Expression Levels of mRNA of NAP-22 and GAP-43 Proteins in Rats With Spontaneous Hypertension

A. S. Aldekeeva^a, S. Ya. Reznik^b, Yu. S. Kraynova^a, and N. Z. Klyueva^{a,*}

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia ^bZoological Institute, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia *e-mail: KluevaNZ@infran.ru

The aim of the study. To reveal the differences in locomotor activity between the rats of SHR and WKY strains and to estimate expression levels of mRNA of NAP-22 and GAP-43 proteins in the neurons of the parietal cortex and hippocampus. Materials and methods. Locomotor activity of the rats of SHR and WKY strains (4 individuals per strain) was recorded by telemetry during 3 days. Expression levels of mRNA of NAP-22 and GAP-43 proteins in the neurons of the parietal cortex and hippocampus were estimated by realtime PCR in other rats of the strains (10 individuals per strain). The study was conducted on animals from the Biological collection of I.P. Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences. Results. Locomotor activity of SHR rats was high than that of WKY rats although this difference was statistically significant only during the dark phase. Expression levels of mRNA of NAP-22 and GAP-43 proteins in SHR rats was lower than that of WKY rats both in parietal cortex and in hippocampus. Conclusions. High locomotor activity of SHR rats results from hyperactivity of this strain. Thus, these rats can be a good model for the investigations on attention-deficit hyperactivity disorder. Changes in expression levels of mRNA of NAP-22 and GAP-43 can be connected with behavioral disorders.

Keywords: rats of SHR and WKY strains, daily rhythm, locomotor activity, protein NAP-22, protein GAP-43

661

ЦИТИРОВАТЬ:

Альдекеева А.С., Резник С.Я., Крайнова Ю.С., Клюева Н.З. Двигательная активность и уровни экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43 у крыс со спонтанной гипертензией. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(5): 654-662. DOI: 10.31857/S0869813920050015

TO CITE THIS ARTICLE:

Aldekeeva A.S., Reznik S.Ya., Kraynova Yu.S., Klyueva N.Z. Locomotor Activity and Expression Levels of mRNA of NAP-22 and GAP-43 Proteins in Rats With Spontaneous Hypertension. Russian Journal of Physiology. 106(5): 654–662.

DOI: 10.31857/S0869813920050015