

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Ермоленко Екатерина Владимировна

**Состав, биологическая активность и способ выделения
1-*O*-алкил-глицеринов из кальмара и морских звезд**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Латышев Николай Алексеевич

ВЛАДИВОСТОК – 2016

Оглавление

Список используемых сокращений.....	5
Введение	7
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1. История исследований липидов с простой эфирной связью	12
1.2 Номенклатура	14
1.3 Распространение в природе нейтральных липидов с простой эфирной связью.....	15
1.3.1 Распространение 1- <i>O</i> -алкил-2,3-диацил-глицеринов в морских беспозвоночных....	16
1.3.2 Распределение 1- <i>O</i> -алкил-2,3-диацил-глицеринов в жире печени хрящевых рыб и пищеварительных желез головоногих моллюсков	18
1.3.3 Распределение 1- <i>O</i> -алкил-2,3-диацил-глицеринов в растениях	20
1.3.4 Распределение 1- <i>O</i> -алкил-2,3-диацил-глицеринов у млекопитающих.....	20
1.4 Состав алкильных фрагментов в нейтральных липидах с простой эфирной связью	20
1.5 Полярные липиды с простой эфирной связью	22
1.5.1 Распределение плазмалогенов в тканях млекопитающих.....	22
1.6 Биосинтез липидов с простой эфирной связью и заболевания, вызванные его нарушением	23
1.6.1 Биосинтез липидов с простой эфирной связью.....	23
1.6.2 Болезни, связанные с нарушениями в биосинтезе липидов с простой эфирной связью	26
1.7 Токсичность 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов	28
1.7.1 Эксперименты на животных	28
1.7.2 Исследования токсичности 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов на добровольцах	28
1.8 Биологическая активность 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов.....	29
1.8.1 Влияние 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов на проницаемость гематоэнцефалического барьера	29
1.8.2 Иммуностимулирующее действие 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов.....	30
1.8.3 1- <i>O</i> -алкил-глицерины при онкологических заболеваниях.....	31
1.8.4 Респираторные заболевания.....	33
1.8.5 Нейродегенеративные заболевания.....	33
1.8.6 Плазмалоген-замещающая терапия.....	34
1.8.7 Антибактериальные и противогрибковые свойства 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов	36
1.9 Методы выделения	36
1.9.1 Низкотемпературная кристаллизация из органических растворителей	37
1.9.2 Комплексообразование с мочевиной	38

1.9.3 Хроматографические методы	40
1.9.4 Разделение $\Delta 4$ и $\Delta 5$ полиненасыщенных жирных кислот химической модификацией через образование йод-лактонов.....	41
1.10 Методы анализа.....	44
1.10.1 Анализ 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов.....	44
1.10.2 Анализ производных плазмалогенов	45
1.10.3 Анализ молекулярных видов липидов с простой эфирной связью	46
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	48
2.1 Растворители и реактивы	48
2.2 Биологический материал.....	48
2.3 Экстракция и гидролиз липидов.....	49
2.4 Получение метиловых эфиров жирных кислот и диметилацеталей для газожидкостной хроматографии	50
2.5 Получение производных 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов для газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием	50
2.6 Выделение 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов и полиненасыщенных жирных кислот из жира командорского кальмара	51
2.6.1 Кристаллизация 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов из ацетона	51
2.6.2 Кристаллизация жирных кислот с мочевиной	51
2.6.3 Йод-лактонизация	51
2.6.3.1 Селективное образование γ -йод-лактонов докозагексаеновой кислоты	51
2.6.3.2 Селективное образование δ -йод-лактонов эйкозапентаеновой кислоты.....	52
2.6.4 Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот	53
2.7 Аналитические методы	53
2.7.1 Тонкослойная хроматография.....	53
2.7.2 Газожидкостная хроматография метиловых (этиловых) эфиров жирных кислот и диметилацеталей	54
2.7.3 Газожидкостная хроматография-масс-спектрометрия.....	54
2.7.4 Анализ 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов тандемной масс-спектрометрией с прямым вводом образца в ионный источник	55
2.8 Определение противогрибковой активности 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов	55
2.9 Определение противоопухолевой активности 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов	56
2.9.1 Определение цитотоксичности 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов и пролиферации клеток.....	56
2.9.2 Неопластическая трансформация клеток (метод мягких агаров).....	57

2.10 Определение включения 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов и полиненасыщенных жирных кислот в липиды печени крыс	57
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	59
3.1 Состав и содержание 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов в морских беспозвоночных	59
3.2 Состав липидов пищеварительной железы кальмара.....	61
3.3 Масс-спектрометрический анализ 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов.....	63
3.3.1 Масс-спектрометрия стандартного образца	64
3.3.2 Масс-спектрометрический анализ 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов из морских организмов и синтетического октил-глицерина	68
3.4 Противогрибковые свойства 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов	69
3.5 Противоопухолевая активность 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов.....	72
3.5.1 Цитотоксичность.....	72
3.5.2 Пролиферация	72
3.5.3 Неопластическая трансформация клеток.....	73
3.6 Включение 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов и <i>n</i> -3 полиненасыщенных жирных кислот в липиды печени крыс	75
3.7 Выделение 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов и <i>n</i> -3 полиненасыщенных жирных кислот.....	77
3.7.1 Щелочной гидролиз липидов пищеварительной железы кальмара	77
3.7.2 Кристаллизация 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов из ацетона	78
3.7.3 Выделение эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот из смеси свободных жирных кислот после отделения 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов.....	81
3.7.3.1 Фракционирование жирных кислот с мочевиной.....	81
3.7.3.2 Йод-лактонизация	84
3.7.3.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография	86
3.7.4 Способ комплексного выделения 1- <i>O</i> -алкил-глицеринов, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот из липидов пищеварительной железы кальмара	88
Заключение.....	92
ВЫВОДЫ.....	94
Список литературы	95

Список используемых сокращений

Методы

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГЖХ-МС – газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ТСХ – тонкослойная хроматография

ESI – распыление в электрическом поле

Вещества

1-*O*-алкил-ГФ – 1-*O*-алкил-*sn*-глицеро-3-фосфат

АГ – 1-*O*-алкил-глицерины

АДАГ – 1-*O*-алкил-2,3-диацилглицерины

АК – 5Z,8Z,11Z,14Z-эйкозатетраеновая кислота, арахидоновая кислота, 20:4n-6

АМВ – амфотерицин В

ДАГ – 1,2-диацилглицерин

ДГАФ – дигидроацетонфосфат

ДГК – 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-докозагексаеновая кислота, 22:6n-3

ДМА – диметилацетали

ЖК – жирные кислоты

КОТ – клотримазол

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот

НЖК – насыщенные жирные кислоты

ОГ – октил-глицерин

ПКС – протеинкиназа С

плазманил-ФЭ – 1-*O*-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин

плазманил-ФХ – 1-*O*-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин

плазманил-ФЭ – 1-*O*-(1Z-алкенил)-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин

плазманил-ФХ – 1-*O*-(1Z-алкенил)-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

СЖК – свободные жирные кислоты

ТАГ – триацилглицерины

ТМС-АГ – триметилсилильные производные 1-*O*-алкил-глицеринов

ФАТ – фактор активации тромбоцитов, 1-*O*-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин

ФЛ – фосфолипиды

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭ – фосфатидилэтаноламин

ЭПК – 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-эйкозапентаеновая кислота, 20:5n-3

ЭЭЖК – этиловые эфиры жирных кислот

FAR – редуктаза жирных кислот

MTS-реагент – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид

γ-ЙЛ-ДГК – γ-йод-лактон докозагексаеновой кислоты

δ-ЙЛ-ЭПК – δ-йод-лактон эйкозапентаеновой кислоты

Прочие сокращения

БА – болезнь Альцгеймера

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

bFGF – основной фактор роста фибробластов

Введение

Актуальность проблемы. Морские организмы являются объектами, богатыми разнообразными соединениями липидной природы, обладающими биологической активностью. Это позволяет рассматривать морские организмы не только как сырье для пищевой промышленности, но и как источник уникальных природных соединений с высоким фармакологическим потенциалом, среди которых особое место занимают 1-*O*-алкил-глицерины (АГ) и *n*-3 полиненасыщенные жирные кислоты (*n*-3 ПНЖК).

АГ являются предшественниками в биосинтезе фосфолипидов – структурных компонентов всех клеточных мембран, усиливают иммунный ответ организма, стимулируют гемопоэз, ингибируют рост опухолевых клеток, подавляют рост некоторых видов патогенных микроорганизмов [1]. Результаты многочисленных исследований, связанных с различными аспектами биологической активности АГ, стимулировали изучение состава, химической структуры и перспективных источников АГ. Анализ литературы показал, что среди морских организмов липиды с простой эфирной связью не являются редкостью; в некоторых хрящевых рыбах и моллюсках их содержание может быть очень велико [2, 3]. Для проведения развернутых биомедицинских и диетологических исследований необходимо было разработать эффективные методы выделения алкильных липидов из морских источников.

n-3 ПНЖК, в частности 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-эйкозапентаеновая (20:5*n*-3, ЭПК) и 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-докозагексаеновая (22:6*n*-3, ДГК) кислоты, являются обязательными компонентами клеточных мембран функционально важных тканей организма. В качестве предшественников сигнальных молекул эти ПНЖК участвуют в регуляции многих функций в организме. Известна связь этих кислот с сердечнососудистыми и нейродегенеративными заболеваниями. При внутриутробном развитии и в первые годы жизни детей ДГК абсолютно необходима для формирования нейронов мозга и элементов зрительной системы [4].

С каждым годом открываются новые биохимические механизмы участия АГ и n-3 ПНЖК в физиологических и патологических процессах в организме человека. Возрастающие потребности профилактической медицины и диетологии показали необходимость разработки новых способов комплексного выделения АГ и n-3 ПНЖК. В Дальневосточном регионе России наиболее перспективными источниками АГ и n-3 ПНЖК могут быть липиды некоторых массовых видов беспозвоночных.

Цель работы заключалась в определении состава АГ в некоторых видах морских беспозвоночных, тестировании их биологической активности, а также разработке способа комплексного выделения высокоочищенных АГ и n-3 ПНЖК.

Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести анализ химической структуры, состава и распределения АГ в некоторых видах морских звёзд и в липидах пищеварительной железы командорского кальмара.

2. Разработать метод анализа общего профиля АГ в липидах морских беспозвоночных.

3. Провести определение биологической активности АГ и n-3 ПНЖК.

4. Разработать способ получения высокочистых АГ и n-3 ПНЖК из липидов морских организмов.

Научная новизна. Установлен состав, структура и распределение алкильных липидов в некоторых видах морских организмов. Показано, что жир пищеварительной железы кальмара *Berryteuthis magister* содержит высокие концентрации липидов с простой эфирной связью и n-3 ПНЖК. Это позволяет рассматривать жир пищеварительной железы кальмара, как перспективный источник для промышленного получения АГ и n-3 ПНЖК.

Впервые предложен метод идентификации АГ с использованием тандемной масс-спектрометрии в режиме прямого ввода образца в ионный источник.

Исследована противогрибковая активность АГ в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Показано, что эти соединения

ингибируют рост дрожжеподобных грибов и усиливают противогрибковую активность антимикотиков (клотримазол (КОТ) и амфотерицин В (АМВ)).

Впервые было проведено исследование противораковой активности природных и синтетических АГ на трех штаммах культуры клеток меланомы (SK-Mel-5, SK-Mel-28, RPMI-7951). Установлено, что в наибольшей степени исследуемые препараты ингибировали пролиферацию клеток и подавляли образование колоний клеток у штамма RPMI-7951.

Показано, что в организме крысы АГ включаются в биосинтез плазмалогенов, увеличивая их содержание в липидах печени.

Разработана научная основа комплексной переработки липидов пищеварительной железы кальмара, которая позволяет последовательно выделять высокоочищенные АГ и n-3 ПНЖК.

Практическая и теоретическая значимость работы. Предложена новая методика масс-спектрометрической идентификации АГ. Данная методика позволяет проводить быстрый анализ профиля АГ без предварительной дериватизации.

Установлено, что природные АГ обладают способностью усиливать действие противогрибковых препаратов и ингибировать рост дрожжеподобных грибов рода *Candida*, что делает возможным их использование в комбинированной терапии кандидозов.

АГ способны ингибировать пролиферацию и рост колоний штамма меланомы RPMI-7951, что позволяет применять их для профилактики одного из самых агрессивных видов меланомы.

Проведенные эксперименты на лабораторных животных показали, что вводимые с диетой АГ и n-3 ПНЖК увеличивают содержание плазмалогенов и ДГК в липидах печени. Недостаток плазмалогенов и ДГК в организме человека связывают с рядом нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона), введение АГ и n-3 ПНЖК может стать инструментом в плазмалоген-замещающей терапии при нейродегенеративных заболеваниях.

Разработан способ комплексного выделения АГ и n-3 ПНЖК из липидов пищеварительной железы промыслового кальмара *B. magister*. Особенностью предложенного способа является использование в качестве сырья многотоннажных отходов промышленной переработки кальмара.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Липиды морских звезд и кальмара отличаются по составу АГ. Липиды пищеварительной железы кальмара содержат высокие концентрации АГ.
2. Метод тандемной масс-спектрометрии позволяет быстро определять профиль природных АГ из морских источников.
3. АГ проявляют противогрибковую активность в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*.
4. Природные АГ и синтетический октил-глицерин (ОГ) проявляют противораковую активность на трех штаммах культуры клеток меланомы.
5. Вводимые с диетой АГ активно включаются в плазмалогены печени крыс.
6. Из липидов пищеварительной железы кальмара получены высокоочищенные АГ, среди которых главным компонентом был химиловый спирт (94 %). После выделения АГ получены индивидуальные эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты с чистотой более 99 %.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конференциях «Липидология – наука XXI века. I Международная научно-практическая Интернет-конференция» (Казань, 2013), «Питание и здоровье» (Москва, 2013), «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2014) и на 12-ой Международной конференции «Renewable Resources and Biorefineries» (Гент, Бельгия, 2016).

Публикации. По материалам диссертации были опубликованы три статьи в журналах, рецензируемых ВАК РФ, и шесть тезисов докладов в материалах научных конференций. Получен патент РФ № 2537252.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Содержание диссертации изложено на

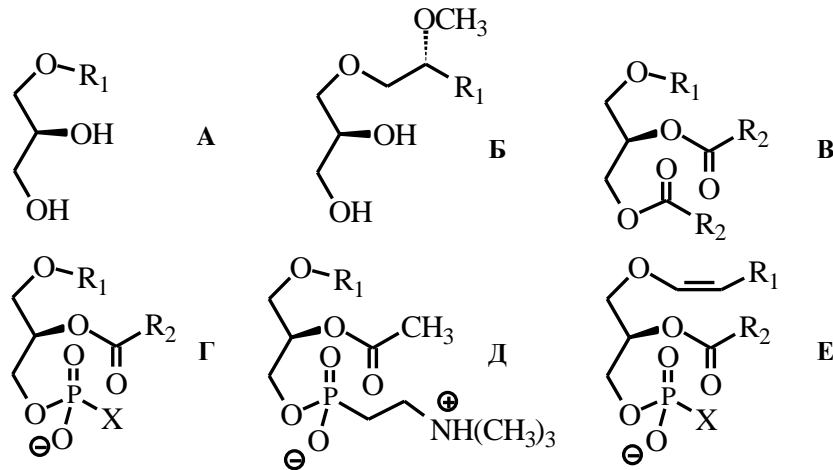
116 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 21 рисунок. Список литературы включает 205 источников.

Автор выражает глубочайшую благодарность и искреннюю признательность своему научному руководителю к.б.н. Н. А. Латышеву, а также сотрудникам экспериментально-технологического участка ИБМ ДВО РАН – к.б.н. С. П. Касьянову, Р. М. Султанову, Г. А. Бурениной. Автор благодарит и всегда будет помнить к.б.н. В. Г. Рыбина. Автор благодарен сотрудникам лаборатории сравнительной биохимии ИБМ ДВО РАН д.б.н. А. Б. Имбсу, д.б.н. В. И. Светашеву, к.б.н. В. И. Харламенко и В. П. Григорчук за содействие в работе. Автор благодарит к.м.н. Л. Ф. Накорякову, к.б.н. О. Г. Борзых и д.м.н. А. Д. Юцковского за помощь в проведении исследования противогрибковой активности выделенных соединений. Автор выражает благодарность д.х.н. С. П. Ермаковой, зав. лаб. химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, за проведение исследований по противораковой активности 1-*O*-алкил-глицеринов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственных заданий ФАНО России и при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых предприятий в научно-технической сфере по программе «СТАРТ» в рамках госконтрактов № 11110р/11535 от 01.10.2012 г. и № 158ГС3/11535 от 19.12.2014 г «Разработка технологии липидных препаратов из дальневосточных морских гидробионтов».

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Природные АГ и их метоксилированные производные, 1-*O*-(2-метоксиалкил)-глицерины (рис. 1, А, Б), являются биологически активными соединениями и структурными фрагментами широко распространенных 1-*O*-алкил-2,3-диацил-глицеринов (АДАГ) (рис. 1, В) и фосфолипидов (ФЛ) с простой эфирной связью (рис. 1, Г). Этим обстоятельством можно объяснить интерес как липидологов, так и медиков к этому классу соединений [1, 5].



где, R_1 – насыщенный или мононенасыщенный алкильный фрагмент; R_2 – насыщенный, мононенасыщенный или полиненасыщенный ацильный фрагмент; X – этаноламин, холин или серин

Рисунок 1 – Структуры основных липидов с простой эфирной связью (А – АГ, Б – 1-*O*-(2-метоксиалкил)-глицерины, В – АДАГ, Г – алкильные фосфолипиды, Д – фактор активации тромбоцитов, Е – плазмалогены)

Поскольку АГ являются предшественниками ряда важнейших для жизнедеятельности организма полярных липидов, таких как фактор активации тромбоцитов (ФАТ) (рис. 1, Д) и алкенильных ФЛ (плазмалогенов) (рис. 1, Е), в обзоре будут рассмотрены пути метаболизма АГ и наиболее важные аспекты участия как АГ, так и их производных в некоторых болезнях человека. Особое внимание будет уделено методам анализа липидов с простой эфирной связью и технологическим аспектам получения чистых препаратов АГ, ЭПК и ДГК.

1.1. История исследований липидов с простой эфирной связью

Исследования липидов с простой эфирной связью (этерных липидов) можно условно разделить на два основных этапа. Первый этап начался более ста лет

назад с работы, в которой было высказано предположение, что неомыляемая фракция общих липидов морской звезды *Asterias rubens* содержит класс нестероидных гидроксилсодержащих соединений, устойчивых в щелочной среде [6]. В 1922 году из липидов печени ската, акул и химер выделили три различных неомыляемых соединения, которые не гидролизировались в щелочной среде в отличие от соединений со сложноэфирной связью [7]. Эти соединения являлись гомологами, имели две свободные гидроксильные группы и длинный алифатический фрагмент. Тривиальные названия этих соединений были даны по названию их источников. Батиловый спирт (рис. 2, **A**) был выделен из липидов печени ската (подотряд Batoidei), селахиловый спирт (рис. 2, **Б**) из липидов печени акул (подотряд Selachoidei) и химиловый спирт (рис. 2, **В**) из липидов печени химер (семейство Chimaeridae). Позднее была установлена простая эфирная связь в этих соединениях [8] и определена оптическая конфигурация природных АГ [9]. К первому этапу необходимо также отнести и открытие простой эфирной связи в фосфолипидах в 1924 году с помощью гистохимических методов. Итоги этого этапа были освещены в обзоре [10].

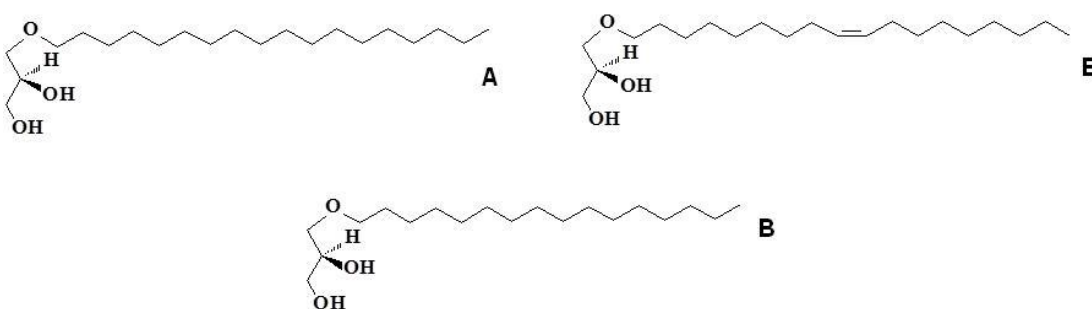


Рисунок 2 – Химическая структура батилового (**A**), селахилового (**Б**) и химилового (**В**) спиртов

Второй этап исследований липидов с простой эфирной связью, а именно, определение биологической активности, метаболизма и функциональной роли алкильных липидов в жизнедеятельности живых организмов, фактически начался после работы [11]. Авторы выделили неомыляемую фракцию липидов костного мозга телят, которую добавляли в диету детям с лейкемией в процессе курса

радиотерапии и наблюдали существенное ускорение созревания лейкоцитов. Эта работа послужила основанием для проведения исследования по защитному действию этерных липидов от радиационного воздействия, которое было заказано Комиссией по атомной энергии США [12].

В научной литературе первой половины XX века, посвященной этерным липидам, можно отметить два не связанных между собой направления, которые касались нейтральных липидов и полярных ФЛ. Хотя исследования нейтральных этерных липидов начались намного раньше, чем полярных липидов, последние получили намного больше внимания у исследователей. Это было связано с важной ролью ФЛ в структуре и функционировании клеточных мембран, с участием в важнейших регуляторных механизмах, таких как апоптоз, регулирование транспорта метаболитов через мембраны клеток и активность мембран-связанных ферментов [13]. Открытие ФАТ, идентифицированного как 1-*O*-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, показало, что его метаболизм тесно связан с метаболизмом нейтральных этерных липидов [14]. ФАТ является многофункциональным клеточным посредником и включен в различные физиологические процессы человека. Он участвует в процессах активации тромбоцитов при астме, аллергии, ишемии и вовлечен во все провоспалительные реакции в организме млекопитающих [12, 15].

Дополнительным стимулом для исследований природных липидов послужило открытие взаимосвязи нарушений в биосинтезе алкильных липидов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезни Альцгеймера (БА) и Паркинсона, а также синдрома Дауна [16].

1.2 Номенклатура

Большинство природных липидов с простой эфирной связью содержат алкильную (*O*-алкил-) и алкенильную (*O*-алк-1-енил-) связь в *sn*-1 положении остатка глицерина [17]. Хиральный атом углерода расположен в *sn*-2 положении остатка глицерина. При *S* конфигурации алкильный фрагмент расположен в *sn*-1 положении, а при *R* конфигурации – в *sn*-3 положении глицерина.

Таким образом, обозначение 1-*O*-алкил-глицерин подразумевает, что алкильная цепь находится в *sn*-1 положении глицерина [18]. Природные АГ встречаются, как правило, в *S* конфигурации [9]. Исключением являются липиды с простой эфирной связью у археобактерий. Основным структурным компонентом этих липидов является археол, представляющий собой 2,3-*O*-дифитанил-глицерин [19].

В неполярных липидных фракциях животных АГ существуют в виде диэфиров жирных кислот (ЖК) в *sn*-2 и *sn*-3 положении (АДАГ). АГ также входят в состав ФЛ, содержащих в *sn*-2 положении ЖК, а в *sn*-3 положении глицерина остаток фосфорной кислоты с различными заместителями (преимущественно холином или этаноламином). По рекомендациям IUPAC алкильные и алкенильные липиды обозначаются терминами плазманильные (plasmanyl) и плазменильные (plasmenyl) липиды соответственно. 1-*O*-алкил-2-ацил-глицерофосфолипиды называются плазманил-ФЛ. К этому подклассу алкильных ФЛ относятся ФАТ, группа липидных медиаторов с мощной биологической активностью [17, 20]. 1-*O*-(1*Z*-алкенил)-2-ацил-глицерофосфолипиды, необходимые составляющие липидных мембран животных, называют плазменил-ФЛ или плазмалогенами. В полярных липидах алкильные или алкенильные заместители найдены, главным образом, в фосфатидилэтаноламине (ФЭ) и фосфатидилхолдине (ФХ), и, в меньшей степени, в фосфатидилинозитоле и фосфатидилсерине.

Большая часть полярных липидов с простой эфирной связью в живых организмах в *sn*-2 положении обогащены ПНЖК (22:6 n -3 или 5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*-эйкозатетраеновой кислотой, 20:4 n -6 (АК)). Эти липиды во многом определяют свойства клеточных мембран, выступают в качестве внутримолекулярных антиоксидантов и переносчиков этих кислот в различные органы и ткани [17].

1.3 Распространение в природе нейтральных липидов с простой эфирной связью

Липиды с простой эфирной связью широко представлены в различных организмах. Вероятно, это является следствием того, что алкоксиглицеролипиды

составляли важнейшую часть структурных элементов клеток самых ранних живых организмов на Земле – архебактерий. В составе липидов этих организмов обнаруживают этерные липиды, у которых в *sn*-2 и *sn*-3 положении глицерина расположены изопреноидные, изопропанильные или гидроксиизопреноидные спирты [21]. Эти соединения устойчивы к щелочному и кислотному гидролизу, что позволяет многим современным архебактериям выживать в экстремальных условиях среды, которые существовали на ранних этапах эволюции [22]. В ходе эволюционного развития живых организмов состав алкоксиглицеролипидов изменялся под влиянием смены температур, концентрации кислорода и pH среды обитания. Изменение температуры привело к замене изопреноидных цепей на алифатические радикалы, а изменение концентрации O₂ в атмосфере к замене простой эфирной связи на винильную и, далее, на сложноэфирную связь [22]. Архейные простые эфиры широко используются в практике, например, выступают в качестве антигенпереносящих агентов в липосомах (из-за их адьювантных свойств) [23, 24] и медицинских нано-смазках [25].

1.3.1 Распространение 1-О-алкил-2,3-диацил-глицеринов в морских беспозвоночных

В литературе имеется большой массив информации по распределению липидов с простой эфирной связью в морских организмах (см. обзор [5]). В таблице 1 представлены данные по содержанию АДАГ в нейтральных липидах некоторых морских беспозвоночных. Среди зоопланктонных организмов АДАГ были обнаружены только в липидах птеропод *Clione limacina* [26] и некоторых хищных ракообразных [27] в количествах 40 % и <1.5 % соответственно. Следует отметить, что содержание АДАГ в значительной степени зависит от сезона и стадий развития этих планктонных организмов. Высокое содержание АДАГ у *C. limacina* объясняется значительными суточными вертикальными миграциями, поскольку АДАГ помимо энергетической составляющей является фактором, обеспечивающим плавучесть животных [26]. Однако у антарктического криля *Euphasia superba* доля АДАГ составляла в общих липидах от 0.3 % до 0.6 %, хотя этот организм также совершает значительные суточные перемещения по

глубине [28]. АДАГ также были обнаружены в липидах кораллов и гидрокораллов [29, 30].

Таблица 1 – Содержание АДАГ в некоторых морских организмах

Вид	Содержание АДАГ, % от суммы всех компонентов липидов	Литература
Морские звезды		
<i>Solaster paxillatus</i>	85.0	[31]
<i>Asterias amurensis</i>	8.6	
<i>Distolasterias nippon</i>	6.0	[32]
<i>Patiria (Asterina) pectinifera</i>	3.2	
<i>Lysastrosoma anthosticta</i>	4.6	
Зоопланктон		
<i>Serolis pagenstecheri</i>	<1.5	[27]
<i>Serolis cornuta</i>	<1.5	
<i>Clione limacina</i>	10-40.0	[26],[33]
<i>Euphausia superba</i> Dana	0.3	[28]
Кораллы		
<i>Lobophytum crassum</i>	9.8	[30]
<i>Porites lutea</i>	7.5	
<i>Gersemia rubiformis</i>	9.7	[34]
<i>Xenia sp.</i>	7.7	[29]

Вопрос о происхождении этерных липидов у беспозвоночных не ясен. Высказано предположение, что АДАГ передается от простейших организмов по пищевым цепям [26]. В пользу этого предположения говорит сезонность в содержании АДАГ у зоопланктона. В работах [34, 35] предполагается, что этерные липиды в кораллах стабилизируют клеточные мембраны, снижая негативные последствия липолитических ферментов. Интересно, что содержание нейтральных липидов с простой эфирной связью у морских беспозвоночных в целом было выше, чем в липидах пресноводных беспозвоночных [36].

Морские звезды были первыми организмами, у которых обнаружены липиды с простой эфирной связью [6]. Последующие работы показали, что практически все исследованные иглокожие в тех или иных количествах содержат этерные липиды, причем как в нейтральных [32], так и в полярных липидах [37]. Количество АДАГ в нейтральных липидах у звезд колеблется в широких пределах от 85 % у *S. paxillatus* [31] до 3.2 % у *P. pectinifera* [32].

1.3.2 Распределение 1-О-алкил-2,3-диацил-глицеринов в жире печени хрящевых рыб и пищеварительных желез головоногих моллюсков

Жир печени акул считается наиболее богатым источником АДАГ. Акулий жир используется для получения биологически активных добавок с АДАГ в качестве действующего компонента. Наиболее известный БАД «Ecomer» (Швеция) получают из жира печени акулы, удаляя сквален и холестерин (содержание АГ 20 %).

Содержание АДАГ у акул не является постоянным, а изменяется не только между видами, но и среди особей одного вида, обитающих в дизъюнктивном ареале [38]. Такую изменчивость связывают с различными факторами окружающей среды, такими как глубина обитания и сезон вылова [39]. Некоторые глубоководные акулы обладают высоким соотношением веса печени к весу тела, например, у представителей рода *Squaliformes* соотношение веса печени к весу тела составляет 1:5 [40, 41]. Самым высоким содержанием АДАГ отличаются липиды печени акулы *Scymnodon plunketi* (табл. 2), в которых содержится 89 % АДАГ и только 10 % триацилглицеринов (ТАГ). В среднем глубоководные акулы, обитающие у берегов Тасмании, содержат 24 ± 7 % АДАГ, 65 ± 11 % сквалена и 10 ± 5 % ТАГ [41].

Функции АДАГ у хрящевых рыб до конца не известны. Но большую часть своего запаса энергии глубоководные акулы сохраняют в виде АДАГ, частично замещая в этом отношении ТАГ. Другая, не менее важная функция, как полагают, связана с отсутствием у акул плавательного пузыря. На примере глубоководных акул экспериментально было показано, что именно АДАГ за счет быстрого биосинтеза и меньшего удельного веса (0.87 г/см^3) по сравнению с удельным весом ТАГ (0.93 г/см^3) помогают совершать суточные вертикальные миграции [47]. Однако глубина обитания, по-видимому, не всегда является фактором, определяющим высокое содержание АДАГ в липидах печени акул. Например, некоторые виды глубоководных акул рода *Apristus*, совершающие вертикальные миграции, содержат АДАГ в пределах 1.5-13 % [41]. У

мелководных акул, скатов и химер, имеющих маленькую печень по отношению к общим размерам, содержание АДАГ также не превышает 1-2 % [48].

Таблица 2 – Содержание АДАГ в некоторых хрящевых рыбах и моллюсках

Вид	АДАГ, % от суммы липидов	Литература
Хрящевые рыбы (<i>Chondrichthyes</i>)		
<i>Scymnodon plunketi</i>	89	[41]
<i>Hexanchus griseus</i>	70	
<i>Somniosus microcephalus</i>	30	[42]
<i>Squalus acanthias</i>	Тихий океан	[38]
	Атлантический океан	
<i>Galeo cerdocuvier</i>	30	[43]
<i>Somniosus pacificus</i>	50	[2]
<i>Deania calcea</i>	19	
<i>Centroscymnus crepidat</i>	20	
<i>Etmopterus granulosus</i>	32	
Кальмары (<i>Teuthida</i>)		
<i>Moroteuthis robusta</i>	19	[44]
<i>Gonatopsis makko</i>	69.5	[3]
<i>Gonatopsis borealis</i>	27	[45]
<i>Berryteuthis magister</i>	49.1	[46]

Высокое содержание холестерина и сквалена в жире печени акул существенно ограничивают его использование в пищевой промышленности. Кроме того, рассеянность и малочисленность популяций, сложность в добыче, особенно глубоководных акул, ограничивают использование этих животных в качестве источника АДАГ для потребителя [41].

Головоногие моллюски, в отличие от глубоководных акул, являются объектами многотоннажного промысла. Среди беспозвоночных эти животные имеют наиболее высокое содержание АДАГ в липидах пищеварительной железы [3]. Авторы провели анализ липидов основных промысловых видов кальмара и показали, что липиды пищеварительной железы этих моллюсков являются наиболее богатым источником АДАГ после акул (табл. 2). Важной особенностью, которая отличает липиды пищеварительной железы кальмаров от липидов печени акул, является практически полное отсутствие сквалена и относительно высокие уровни стерина и его эфиров [3].

1.3.3 Распределение 1-О-алкил-2,3-диацил-глицеринов в растениях

В литературе есть несколько упоминаний присутствия следовых количеств АДАГ в липидах бобовых рода *Bauhinia* и в пыльце сосны *Pinus halepensis* [49]. Сообщалось о присутствии АДАГ в морских травах, однако при более тщательном анализе выяснилось, что источником нейтральных алкильных липидов в общих липидах, выделенных из высших морских растений, были эпифиты, паразитирующие на талломах [50].

1.3.4 Распределение 1-О-алкил-2,3-диацил-глицеринов у млекопитающих

У млекопитающих нейтральные липиды с простой эфирной связью менее распространены, чем алкильные и алкенильные ФЛ [51]. АДАГ у млекопитающих и человека были найдены в костном мозге [51], в молоке [52] и во многих опухолевых тканях [53]. Это подчеркивает важнейшую роль, которую играют эти соединения в жизнедеятельности человека [1]. Ранее было показано, что почки и сердце относительно богаты нейтральными АДАГ (1.7 % и 2.5 % соответственно), в то время как в мозге их содержание не превышает 0.15 %. Тем не менее, во всех исследованных тканях и клетках млекопитающих общее содержание ФЛ с простой эфирной связью намного превышает уровень АДАГ [54].

1.4 Состав алкильных фрагментов в нейтральных липидах с простой эфирной связью

Состав алкильных фрагментов в АДАГ был подробно исследован в жире акул [2, 55], кальмаров [3, 44, 45], в липидах костистых рыб и в культурах раковых клеток [51].

Состав АГ, полученных в результате щелочного гидролиза АДАГ, не так разнообразен, как состав ЖК в морских организмах. Как правило, алкильный остаток АГ содержит от 14 до 22 атомов углерода. Короткоцепочечные АГ (короче C14:0) находят в костистых рыбах в количествах менее 2 % [51], а длинноцепочечные АГ (>C22:0) были найдены в молоке и костном мозге человека [52, 56]. Спирты с нечетным числом атомов углерода в алкильной группе, полиненасыщенные и разветвленные спирты встречаются в незначительных концентрациях в липидах хрящевых рыб, головоногих моллюсков и

млекопитающих. Нечетные АГ и 1-*O*-пентадецил-глицерин (C15:0) составляют до 32 % и 21 % соответственно от всех АГ из липидов птероподы *C. limacine* [33]. C15:0 составляет менее 1 % в общих АГ из жира печени глубоководных акул *Somniosus microcephalus* (табл. 3) и *Centroscyllium plunketi* [42, 55]. Разветвленные алкильные фрагменты АГ составляют до 10 % от суммы АГ из молока жвачных животных; они образуются метанотрофными бактериями, которые участвуют в переваривании пищи в рубце жвачных животных [51].

Таблица 3 – Состав алкильных фрагментов АДАГ в липидах печени хрящевых рыб и кальмаров

Алкильный фрагмент	Акулы			Кальмары			
	<i>S. acantias</i> ¹	<i>S. microcephalus</i> ²	<i>S. pasificus</i> ³	<i>M. robusta</i> ⁴	<i>G. makko</i> ⁵	<i>G. borealis</i> ⁶	<i>B. magister</i> ⁷
C14:0	3.3	2.0	-	4.9	1.0	6.6	2.3
C14:1	0.4		-	0.1		1.1	
C15:0	0.6	0.7	-	1.4	0.5	1.6	0.5
C16:0	14.6	9.1	16.0	53.8	58.5	45.9	70.2
C16:1	10.4	10.8	7.0	1.1	0.5	8.6	1.8
C17:0	0.4	3.6	-	сл.	0.6	1.2	0.8
C17:1	1.1	-	-	сл.		0.1	0.1
C18:0	4.4	2.8	10.0	2.7	4.0	4.5	7.1
C18:1n-9	50.7	59.4	60.5	24.0	27.7	14.6	7.5
C18:1 n-7	4.8	-	-	-	-	-	4.5
C18:1n-5	0.5	-	-	-	-	-	0.9
C18:2	0.9	1.6	-	-	-	-	0.2
C19:0	-	1.5	-	-	-	1.1	0.2
C19:1	0.9	-	-	сл.	-	0.6	сл.
C20:1n-11	0.5	6.2	-	8.4	4.1	10.1	0.4
C20:1n-9	0.7	-	6.5	-	-	-	0.8
C20:1n-7	1.3	-	-	-	-	-	0.2
C22:1	-	2.2	-	1.5	-	1.8	-
∑ разв.	2.2	-	-	1.9	2.1	2.3	2.5
∑ нас.	28.3	19.7	27.0	64.8	64.6	63.1	83.6
∑ мононенас.	70.8	78.6	73.0	35.2	33.0	36.9	16.2
∑ полиненас.	0.9	1.6	-	-	-	-	0.2

разв. – разветвленные алкильные фрагменты (15:0i, 16:0i, 16:0ai, 17:0i, 17:0ai, 18:0i), нас. – насыщенные алкильные фрагменты, мононенас. – мононенасыщенные алкильные фрагменты, полиненас. – полиненасыщенные алкильные фрагменты, сл. – содержание компонента менее 0.2 %. ¹ [38]; ² [42]; ³ [2]; ⁴ [44]; ⁵ [3]; ⁶ [45]; ⁷ [46].

Практически у всех исследованных видов акул, беспозвоночных и млекопитающих сумма насыщенных и мононенасыщенных АГ составляла более 98 % от суммы всех АГ. Селахиловый спирт (C18:1n-9) является одним из самых распространенных ненасыщенных АГ в жире печени глубоководных акул

(табл. 3), где его содержание составляет от 35.0 % до 59.4 % [55], в то время как у беспозвоночных доля селацилового спирта не превышает 24.0 % [5]. В молоке млекопитающих содержание селацилового спирта находится в пределах от 17.7 % в коровьем молоке до 37.5 % в женском молоке [51].

Распределение химилового (C16:0) и батилового (C18:0) спиртов зависит от вида морского организма. В липидах хрящевых рыб содержание химилового спирта колеблется от 9.0 % до 36.0 % в зависимости от вида, в то время как уровень батилового спирта составляет 40.0-7.0 % [38]. Высокий уровень химилового спирта наблюдается в липидах пищеварительной железы кальмаров – от 45.9 % до 70.2 % (табл. 3). Количество химилового спирта от суммы АГ в молоке и опухолевых тканях человека составляет 25.0 % и 29.0 %, а батилового спирта – 22.0 % и 16.0 % соответственно [51].

1.5 Полярные липиды с простой эфирной связью

Разнообразие молекулярных видов ФЛ с простой эфирной связью определяется составом ЖК в *sn*-2 положении и составом алкильных (алкенильных) групп в положении *sn*-1. Важной особенностью плазмалогенов млекопитающих является повышенное, по сравнению с диацильными ФЛ, содержание ПНЖК в *sn*-2 положении, прежде всего, ДГК и АК. Известно, что главным транспортным звеном АК и ДГК в мозг является 1-*O*-(1*Z*-алкенил)-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламины (плазменил-ФЭ) [57]. Распределение плазманил-ФЛ и плазменил-ФЛ в полярных липидах органов и тканей млекопитающих имеет специфический характер. Алкенильные фрагменты встречаются в основном в ФЭ, которые являются необходимыми структурными компонентами клеточных мембран, прежде всего в нервных тканях. В сердечных мышцах алкенильные формы ФХ являются доминирующими [16].

1.5.1 Распределение плазмалогенов в тканях млекопитающих

Плазмалогены составляют около 15-20 % от общего количества ФЛ в клеточных мембранах и более 50 % от общего содержания ФЭ в тканях мозга, сердечных и скелетных мышц, в почках, легких и в клетках крови - нейтрофилах и эозинофилах [58]. В некоторых тканях мозга все ФЛ являются плазмалогенами,

из них почти 90 % во фракции – это плазменил-ФЭ [59]. Плазмалогены являются важными компонентами в липидных рафтах мембран, клеточного ядра, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и митохондрий, но отсутствуют в мембранах пероксисом. Они также сосредоточены в специализированных мембранах, таких как сарколеммы, миелиновые оболочки, в синаптических везикулах и секреторных гранулах [60]. Плазмалогены являются важным составляющим элементом сурфактанта легких, как основное звено защиты легких от токсического воздействия озона и других окислителей, поступающих с воздухом [61]. Несмотря на то, что печень млекопитающих – это основное место биосинтеза плазмалогенов, их содержание в этом органе минимально. Это может быть следствием быстрого транспорта с липопротеинами из печени с кровью в другие органы и ткани [16].

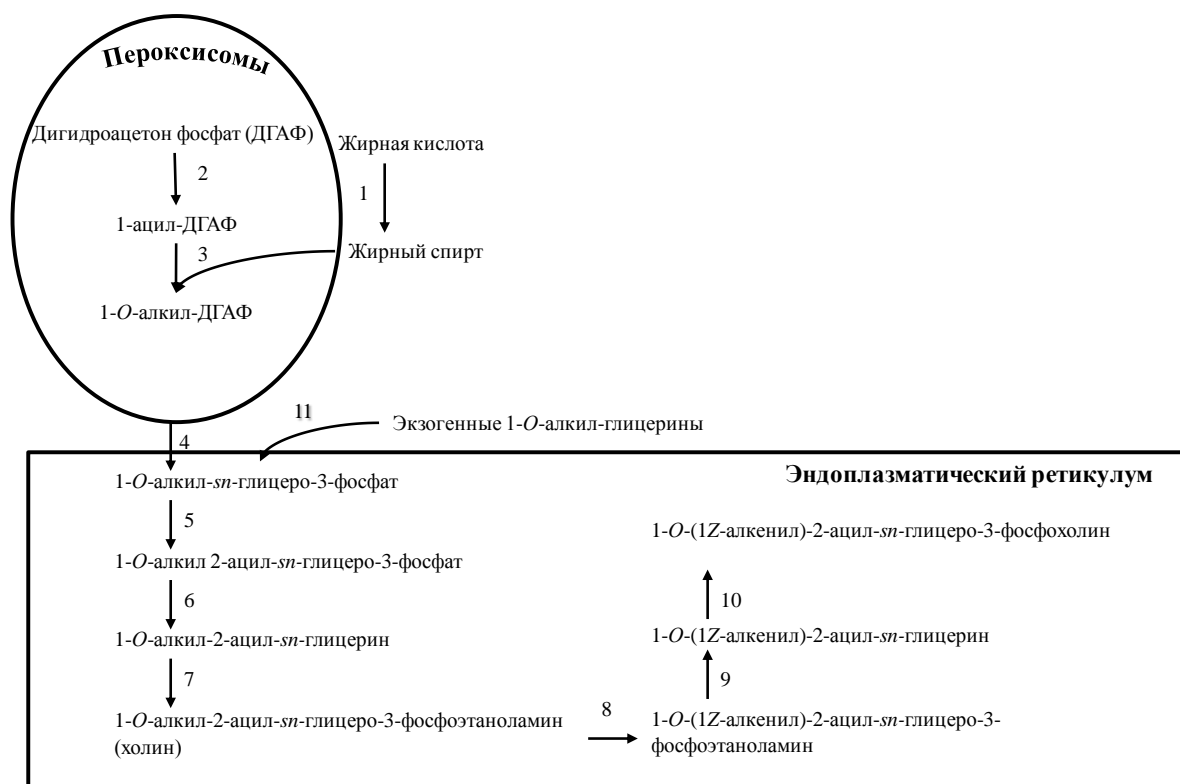
Особенно интересна возрастная динамика плазмалогенов в клетках и тканях человека. Здоровые новорожденные имеют значительно более низкое содержание плазмалогенов в эритроцитах, чем дети старшего возраста [62]. Общее количество плазмалогенов в мозге резко возрастает во время фазы миелинизации и достигает у человека максимального уровня примерно в возрасте 30 лет [58]. С возрастом общий уровень плазмалогенов в тканях у человека начинает снижаться, особенно в клетках мозга. Это связывают с нарушениями функционирования пероксисом печени, которые могут быть вызваны различными факторами среды – алкоголизмом, курением и воздействием токсикантов [63, 64].

1.6 Биосинтез липидов с простой эфирной связью и заболевания, вызванные его нарушением

1.6.1 Биосинтез липидов с простой эфирной связью

Липиды с простой эфирной связью играют важную роль, поскольку являются структурными компонентами мембран клеток головного мозга [59], сердца [65], легких и семенников [58], включены в биогенез костно-мышечных тканей [66]. Полярные этерные липиды являются основным донором АК и ДГК в мозге, окислительный метаболизм которых приводит к образованию вторичных мессенджеров – эйкозаноидов и докозаноидов [67].

Биосинтез этерных липидов, в том числе плазмалогенов, включает в себя как мембранные, так и растворимые цитозольные ферменты, однако не все из них охарактеризованы в деталях [68]. Тем не менее, большинство ферментативных стадий исследованы достаточно полно. Краткая схема биосинтеза липидов с простой эфирной связью приведена на рисунке 3.



Ферменты: 1 – ацилредуктазы FAR1 и FAR2 (Е.С. 1.2.1.n2), 2 - дигидроацетонфосфат ацилтрансфераза (Е.С. 2.3.1.42), 3 - алкил-дигидроацетофосфат синтаза (Е.С. 2.5.1.26), 4 - ацил/алкилдигидроацетонфосфат редуктаза (Е.С. 1.1.1.101), 5 - алкил/ацил-глицеро-3-фосфат ацилтрансфераза (Е.С. 2.3.1.-), 6 – фосфодидат фосфатаза (Е.С. 3.1.3.4), 7 – этаноламин (холин) фосфотрансфераза (Е.С. 2.7.8.1; Е.С. 2.7.8.2), 8 – плазманилэтаноламин десатураза (Е.С. 1.14.99.19); 9 – фосфолипаза С (Е.С. 3.3.2.5), 10 – холин фосфотрансфераза (Е.С.2.7.8.22), 11 – алкилглицерол киназа (Е.С. 2.7.1.93)

Рисунок 3 – Схема биосинтеза этерных липидов [16]

Синтез жирных спиртов в организме осуществляется при участии двух ключевых ферментов в биосинтезе липидов с простой эфирной связью – изоформ ацилредуктаз (FAR1 и FAR2), которые образуют из жирных кислот соответствующие жирные спирты. FAR1 и FAR2 отличаются субстратной специфичностью и различным распределением в тканях, FAR2 является менее распространенным ферментом и обладает специфичностью к насыщенным C16:0- или C18:0-CoA, в то время как FAR1 специфичен к мононенасыщенным и насыщенным аналогам C-16- или C-18-CoA [69].

Первая стадия в биосинтезе липидов с простой эфирной связью выполняется дигидроацетонфосфат ацилтрансферазой, пероксисомальным ферментом, который ацилирует поступающий из цитоплазмы в пероксисомы дигидроксиацетон фосфат (ДГАФ) с длинноцепочечным ацил-КоА. Второй реакцией, также проходящей в пероксисомах, является замещение ацильного радикала в ацил-ДГАФ на жирный спирт, с образованием 1-*O*-алкил-ДГАФ, катализируемой алкил-дигидроацетонфосфат синтазой [70]. В качестве кофактора у этого пероксисомального фермента выступает флавинадениндинуклеотид. Поскольку эти две реакции проходят исключительно в пероксисомах, то при нарушении работы последних, биосинтез этерных липидов в организме блокируется [16].

1-*O*-алкил-глицеро-3-фосфат (1-*O*-алкил-ГФ) образуется в результате восстановления кето-группы 1-*O*-алкил-ДГАФ в положении *sn*-2 при участии ацил/алкилдигроацетонфосфат редуктазы. Уникальность этого фермента заключается в том, что он локализован как в мембранах пероксисом, так и в мембранах эндоплазматического ретикулума [71]. 1-*O*-алкил-ГФ является важным соединением в биосинтезе этерных липидов, поскольку служит отправной точкой для биосинтеза всего разнообразия полярных алкил-содержащих ФЛ. На этой стадии может происходить фосфорилирование вводимого с диетой экзогенного АГ микросомальной алкилглицерол киназой при участии АТФ [68].

1-*O*-алкил-ГФ затем этерифицируется ацил-СоА по положению *sn*-2 алкил/ацил-глицеро-3-фосфат ацилтрансферазой с образованием 1-*O*-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфата или плазманил-фосфатидной кислоты. Далее фосфатная группа удаляется фосфатазой с образованием 1-*O*-алкил-2-ацил-*sn*-глицерина, который может быть преобразован до 1-*O*-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолamina (плазманил-ФЭ) или 1-*O*-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (плазманил-ФХ) соответствующей фосфотрансферазой.

Образование соответствующих плазмалогенов из плазманил-ФЭ и плазманил-ФХ происходит по следующему механизму: алкильный фрагмент в плазманил-ФЭ в положении *sn*-1 дегидрируется между 1 и 2 атомом углерода с

помощью цитохром b5-зависимой микросомальной системы транспорта электронов и плазманилэтаноламин десатуразы, приводя к образованию плазманил-ФЭ. Однако, поскольку в организме отсутствует фермент, напрямую дегидрирующий алкильный фрагмент в плазманил-ФХ, синтез 1-*O*-(1*Z*-алкенил)-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (плазманил-ФХ) происходит только после гидролиза плазманил-ФЭ с образованием 1-*O*-(1*Z*-алкенил)-2-ацил-*sn*-глицерина, который затем модифицируется холин фосфотрансферазой и цитидиндифосфохолином [72].

1.6.2 Болезни, связанные с нарушениями в биосинтезе липидов с простой эфирной связью

Пероксисомы являются многофункциональными органеллами, присутствующими практически во всех эукариотических клетках. Эти органеллы весьма пластичны и быстро реагируют на клеточные сигналы или сигналы окружающей среды через изменение размера, количества, морфологию и функции [73]. Эти органеллы были названы "пероксисомами" по присутствию в них оксидаз и каталаз, участвующих в метаболизме перекиси водорода [74]. В работе [75] было показано, что большое количество пероксисом содержится в тканях с активным метаболизмом липидов, таких как печень, мозг, слизистая оболочка кишечника и жировая ткань. Экспериментально было определено, что пероксисомы способны синтезировать липиды и, как следствие, укрепилась концепция о важной роли пероксисом в метаболизме липидов [76]. Пероксисомы участвуют в β -окислении длинноцепочечных ПНЖК с образованием ДГК через цикл Шпрехера [77]. Процесс α -окисления разветвленных ЖК, синтез этерных ФЛ и желчных кислот проходят только в пероксисомах и важны для гомеостаза организма.

Дефицит липидов с простой эфирной связью в организме млекопитающих, в том числе и человека, обычно вызван пероксисомальной дисфункцией (БА, болезнь Паркинсона, синдром Зельвегера, ризомелическая точечная хондродисплазия). Первые два фермента биосинтеза дигидроацетонфосфат ацилтрансфераза и алкил-дигидроацетонфосфат синтаза локализованы в

пероксисомах. Блокирование биосинтеза алкильного фрагмента может привести к полной остановке биосинтеза плазмалогенов и регуляторных вторичных мессенджеров ФАТ и лизо-ФАТ. Кроме того недостаток плазменил-ФЭ в липидных рафтах нейронов центральной нервной системы является одним из важнейших факторов нарушения баланса процессов образования токсичных растворимых амилоидных пептидов Аβ38 (не образующих амилоидных бляшек) и нерастворимых пептидов Аβ42 (образующих амилоидные бляшки) в сторону увеличения последних при БА [78]. Заболевания, при которых происходит снижение уровня плазмалогенов в тканях, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Заболевания с нарушениями биосинтеза плазмалогенов [79]

Заболевание	Комментарий
Генетические пероксисомальные расстройства	
Ризомиелическая хондродисплазия	Тип 1 и Тип 2: мутация дигидроацетонфосфат ацилтрансферазы Тип 3: мутация алкил-дигидроацетонфосфат синтазы
Синдром Зельвегера	Генетические дефекты, связанные с топологией ферментов дигидроацетонфосфат ацилтрансферазы и алкил-дигидроацетонфосфат синтазы в пероксисомах
Неврологические заболевания	
Болезнь Альцгеймера	Нарушение синтеза плазмалогенов в пероксисомах печени Поврежденные пероксисомы в нейронах мозга Уменьшение уровня плазменил-ФЭ в плазме крови Уменьшение уровня плазменил-ФЭ в белом веществе мозга на ранних стадиях болезни Уменьшение уровня плазменил-ФЭ в белом веществе мозга в зависимости от тяжести болезни Сокращение уровня плазменил-ФЭ, ФЭ и ФС в эритроцитах
Болезнь Паркинсона	Уменьшение уровня плазменил-ФЭ в плазме крови
Лейкодистрофии	Снижение уровня плазменил-ФЭ в лимфоцитах и фибробластах
Болезнь Ниманна-Пика тип С	Снижение уровня плазменил-ФЭ в мозге
Синдром Дауна	Уменьшение уровня плазменил-ФЭ в мозге
Рассеянный склероз	Снижение уровня плазмалогенов в белом веществе мозга

Отсутствие дигидроацетонфосфат ацилтрансферазы или алкил-дигидроацетонфосфат синтазы вызывает гипомиелинизацию в центральной нервной системе, структурные изменения в яичках, которые сопровождаются мужским бесплодием, и послеродовую катаракту, которая, в конечном итоге, приводит к слепоте [80].

1.7 Токсичность 1-О-алкил-глицеринов

1.7.1 Эксперименты на животных

Исследования токсичности АГ и их эфиров были начаты в 1959 г [81]. Мышам в течение 2 лет добавляли в диету акулий жир с содержанием АДАГ 18 %, за весь период наблюдения не было выявлено токсических эффектов. Другое исследование показало, что введение в диету 4.4 г жира акулы на кг веса мышей в течение 18 суток не обнаруживало токсического действия [82]. Автор отметил, что в жире присутствуют компоненты, вызывающие раздражающее действие на пищеварительный тракт мышей, что объяснили высоким уровнем сквалена в жире. Проверку на токсичность батилового спирта в диете также осуществляли на собаках и крысах; во всех экспериментах было показано отсутствие токсичности. Подкожные и интраперитонеальные инъекции батилового спирта в количествах от 5 до 10 мг/кг веса животных также не выявили признаков токсичности АГ [7].

1.7.2 Исследования токсичности 1-О-алкил-глицеринов на добровольцах

Нескольким пациентам с пероксисомальными расстройствами вводили с диетой суспензию, содержащую по 400 мг батилового спирта и 200 мг дезоксихолата натрия в 100 мл воды. Каждый пациент получал 5-10 мг/кг батилового спирта в сутки в течение 2 месяцев [83]. Нарушений гомеостаза и признаков токсичности не было обнаружено. Пероральное введение батилового спирта в суспензии было использовано при лечении наследственных заболеваний у двух детей с неонатальной аденолейкодистрофией и одного ребенка с фиброзом [84]. Диагноз был подтвержден биохимически по отсутствию в фибробластах детей фермента алкил-дигидроацетонфосфат синтазы. Длительность курса приема батилового спирта составляла от нескольких месяцев до 2 лет. За весь срок введения батилового спирта не было отмечено проявлений токсичности, к 3 годам дети практически догнали сверстников по интеллектуальному развитию.

Расширенное исследование на токсичность различных по структуре АГ в связи с их поверхностно активными свойствами было проведено в рамках

разработки новых косметологических продуктов на мышах и добровольцах [85]. Длительность исследования при приеме с диетой составляла от нескольких дней до месяца. При этом не было отмечено негативных последствий при дозах от 100 мг/сутки для мышей и 2 г/сутки для человека. Нанесение АГ (химилловый и батилловый спирты) на слизистые оболочки глаз и носоглотки также не выявили признаков токсичности и аллергических реакций.

1.8 Биологическая активность 1-О-алкил-глицеринов

В Скандинавской народной медицине жир печени *S. microcephalus* (гренландской акулы) считался основным диетическим средством, помогающим при различных заболеваниях. Жир акул использовался для заживления ран, при лечении язвенной болезни, воспалениях толстой кишки и артритах [5]. Липиды с простой эфирной связью обладают иммуностимулирующим действием через активацию макрофагов [86] и оказывают антиангиогенный эффект [87]. Спектр их действия также включает в себя антибактериальную и противогрибковую активности [88, 89]. Введение АГ в рацион свиней повышало подвижность сперматозоидов и степень оплодотворения [90]. На культуре клеток почек собак было показано, что АГ ингибируют протеинкиназу С (ПКС), что снижает степень пролиферации клеток *in vitro* [91].

1.8.1 Влияние 1-О-алкил-глицеринов на проницаемость гематоэнцефалического барьера

В работе [92] исследовали пространственное распределение в клетках мозга введенных в сонную артерию маркеров флуоресценции флуоресцеина натрия и родамина В200 (RB 200) вместе с 1-О-пентил-глицерином (С5:0) здоровым крысам и животным с привитой С6 глиомой мозга. Использование флуорофоров позволило наблюдать проникновение маркеров в клетки мозга и показало увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в глиому мозга по сравнению с тканями мозга здоровых крыс при внутривенном введении С5:0.

Дифференциальная проницаемость через ГЭБ противоракового препарата метатрексата с 200 мМ С5:0 исследовалась с различными по размерам маркерами флуоресценции [93]. Выяснение механизмов, которые позволяют усиливать

проницаемость ГЭБ, проводили при инкубации с различными по длине цепи АГ. Одновременное введение противоракового препарата и С5:0 (200 мМ) увеличивало концентрации метатрексата в ипсилатеральном отделе мозга по сравнению с контрольной группой без С5:0. Аналогичные результаты были получены при исследовании противоопухолевого действия одновременного внутривенного введения цисплатина (2-4 мг/кг) или карбоплатина (20 мг/кг) крысам с различными типами глиомы мозга (С6 и RG2). Внутривенная химиотерапия цисплатином или карбоплатином показала регрессию обеих опухолей. После введения химиотерапевтических препаратов в сочетании с С5:0 или 2-О-гексил-глицерином подавление опухоли было намного сильнее, чем при введении препаратов без АГ. Таким образом, усиление проницаемости ГЭБ при использовании С5:0 увеличивает концентрации цисплатина и метотрексата, а также антибиотиков ванкомицина и гентамицина в опухолях мозга [94], что позволяет значительно снизить количество вводимых токсичных препаратов. Следует отметить, что уже через 5-120 минут после введения АГ проницаемость ГЭБ снижалась до начальных значений. Авторы отмечают, что по сравнению с введением только метотрексата добавление АГ увеличивало степень проникновения химиопрепарата в зависимости от количества от 1.1 до 300 раз. Наибольшую транспортную активность при преодолении ГЭБ в ряду С6:0, С7:0 и С8:0, проявляли 1-О-гептил-АГ и 1-О-октил-АГ [94, 95]. Таким образом, введение АГ совместно с цитостатиками является эффективным и нетоксичным методом открытия ГЭБ и транспортировки их в клетки мозга.

1.8.2 Иммуностимулирующее действие 1-О-алкил-глицеринов

АГ и алкильные лизо-ФЛ значительно активизируют цитотоксические макрофаги, что приводит к повышению Fc-рецепторного фагоцитоза естественных киллеров, макрофагов, нейтрофилов и тучных клеток. Это усиливает гуморальный иммунный ответ и отдаляет реакцию гиперчувствительности [96]. В эксперименте по кормлению крыс-самок АГ в концентрациях 10, 50 и 250 пмоль в течение 8-10 недель авторы наблюдали изменение уровня АГ в молоке и последующее развитие определенных иммунных

реакций у потомства [52]. Отмечено значительное увеличение периферийных гранулоцитов крови и уровня иммуноглобулинов (IgG и IgM) в плазме, что свидетельствует об участии АГ в развитии иммунного ответа у новорожденных крысят.

В работе [97] показали, что применение липидов печени гренландской акулы нормализует уровень естественных киллеров (больших гранулярных лимфоцитов), вызывает образование активных форм кислорода, необходимых для образования лейкоцитов в крови у людей, страдающих ревматоидным артритом.

В работе [98] давали по девять капсул препарата «Биомарин» («Biomarin 570», Швеция), содержащих 50 % АДАГ, в день в течение 30 дней 10 здоровым добровольцам и наблюдали, что «Биомарин» повышает уровень С1q белка системы комплемента, увеличивает иммунорегуляторный индекс CD4/CD8 с 1.3 до 1.8 и усиливает адаптивный иммунный ответ через активацию клеток Т-хелперов в лимфоцитах. Это исследование не выявило каких-либо побочных эффектов, доказав что «Биомарин» является безопасным, эффективно поддерживающим врожденный иммунитет препаратом.

Диета добровольцев, в которую включали жир акулы (3.6 г АДАГ и 750 мг n-3 ПНЖК/день), увеличивала ответ нейтрофилов к бактериям, повышался уровень цитокина-1, белка С4 в системе комплемента С4 и общий антиоксидантный статус сыворотки крови [99].

1.8.3 1-О-алкил-глицерины при онкологических заболеваниях

В 1967 году было показано, что в клетках Эрлиха содержание липидов с простой эфирной связью было выше, чем в нормальных тканях [100]. Впоследствии было определено, что в большинстве опухолевых тканей этерные липиды присутствуют в повышенных количествах [101, 102]. Использование природных АГ в лечении лейкемии у детей подтвердило предположение, что увеличение содержания алкильных липидов связано с защитными функциями организма при раке [56].

Сравнительное исследование вводимых перорально очищенных природных АГ и жира печени акулы мышам с привитой карциномой легких Льюиса (3LL)

показало, что АГ снижали метастазирование на $64 \pm 8 \%$, тогда как эффект от жира составил $30 \pm 9 \%$ по сравнению с контролем. На 5-й день приема АГ в опухоли снизилось содержание фактора роста эндотелиальных клеток, что свидетельствует об антиангиогенном действии, уменьшились скорости васкуляризации и метастазирования опухолей у мышей [87]. Жир акулы на 5 день приема не проявлял активности.

В работе [103] оценивалось влияние АГ на клеточные линии карциномы яичников человека (OVP-10), рака молочной железы (MCF-7) и трех клеточных линии рака простаты (DU-145, PC-3 и PCA-2b). Клетки обрабатывались препаратом «Ecomer», содержащим 20 % АГ в дозировке от 0.1 мг/мл до LD-50. Увеличение апоптоза клеток простаты DU 145, PC-3 и PCA-2B наблюдалось уже при небольших дозах 0.1 и 0.5 мг/мл, в то время как в клетках рака молочной железы апоптотические клетки появились после введения более высоких концентраций препарата. Это исследование показывает, что процессы апоптоза или некроза, вызванные АГ, могут протекать по различным механизмам.

Исследование пролиферации, вызванной фактором роста фибробластов (bFGF) в эндотелиальных клетках, показало, что чистые АГ влияли на рост клеток эндотелия без цитотоксических эффектов, снижали пролиферацию клеток в зависимости от концентрации и времени через ингибирование bFGF [104]. Это исследование объясняет антиангиогенный эффект АГ.

Один из наиболее вероятных механизмов участия АГ в подавлении роста и метастазирования злокачественных тканей заключается в регуляции активности изоформ ПКС 1-О-алкил-2-ацилглицерином. Это соединение, которое образуется при включении АГ в мембранные ФЛ, является аналогом 1,2-диацилглицеринов (ДАГ), эндогенного активатора ПКС [105]. 1-О-алкил-2-ацилглицерины конкурентно ингибируют активность ПКС, что приводит к торможению каскада BRAF/MEK/MAPK/ERK [106]. Этот путь является основным в пролиферации эндотелиальных клеток при ангиогенезе, фосфорилировании проонкогена и транскрипционного фактора p53 [107].

1.8.4 Респираторные заболевания

Дефицит плазмалогенов тесно связан с хронической обструктивной болезнью легких. Исследование большой группы больных показало статистически значимую корреляцию между дефицитом плазмалогенов в легких с токсическим действием озона и курением. У больных хронической обструктивной болезнью легких отмечено снижение активности алкил-дигидроацетонфосфат синтазы, первого фермента в каскаде биосинтеза алкильных липидов в легочной ткани [108]. В норме плазмалогены составляют около 2 % от общих ФЛ в сурфактанте легких и являются основным барьером, препятствующим действию озона на альвеолы. Плазмалогены, главным образом плазменил-ФЭ, входящие в состав сурфактанта, выполняют защитные функции в качестве антиоксиданта, защищая легкие от активных форм кислорода [61].

Пониженные уровни плазмалогенов в трахее и аспиратах у недоношенных детей увеличивают риск развития бронхолегочной дисплазии [109]. У детей, получавших препараты сурфактанта с повышенным содержанием плазменил-ФЭ до 2 %, снижалось поверхностное натяжение и вязкость аспиратов, что улучшало респираторные показатели [110].

1.8.5 Нейродегенеративные заболевания

Дефицит плазмалогенов в тканях мозга обнаруживается при различных нейродегенеративных расстройствах. К ним относятся болезни Альцгеймера [59], Паркинсона [111], Ниманна-Пика типа С [112] и синдром Дауна [113]. На трансгенных мышцах и посмертных анализах тканей головного мозга человека показано, что, независимо от причин возникновения нейродегенеративных расстройств, все они сопровождаются дефицитом плазмалогенов в мозге, и их общее снижение ускоряет протекание заболеваний [80, 114].

Особенно рельефно это проявляется при начале и развитии БА. Патопатология БА включает в себя несколько факторов: накопление нейрофибриллярных клубков, образованных при избыточном фосфорилировании тау-белков, отложение амилоидных бляшек, образованных из пептида Аβ42, и ингибирование холинэргического механизма [115, 116]. Все эти нарушения

наблюдаются на фоне оксидативных и воспалительных повреждений мозга. В настоящее время исследования показывают, что дефицит и, как следствие, дисфункция пероксисом является специфическим маркером для БА [114]. Резкое снижение уровня плазмалогенов было обнаружено в белом (до 40 мол. %) и в сером (до 10-30 мол. %) веществах головного мозга на ранних стадиях БА на моделях экспериментальных животных [59]. Показано снижение содержания ДГК в мозге больных БА, что также является результатом нарушения биосинтеза ДГК в пероксисомах печени [117]. Это приводит к общему дефициту ДГК-содержащих плазменил-ФЭ у больных БА. Дефицит ДГК приводит к снижению уровней образованного из ДГК нейропротектина D1, что усиливает окислительный стресс в нейронах и стимулирует накопление токсического пептида A β 42 [118]. Дефицит плазменил-ФЭ в сером веществе вызывает нарушения в структуре, функциях синапсов, ингибирует синтез нейромедиаторов и приводит к снижению познавательных функций и к деменции [16].

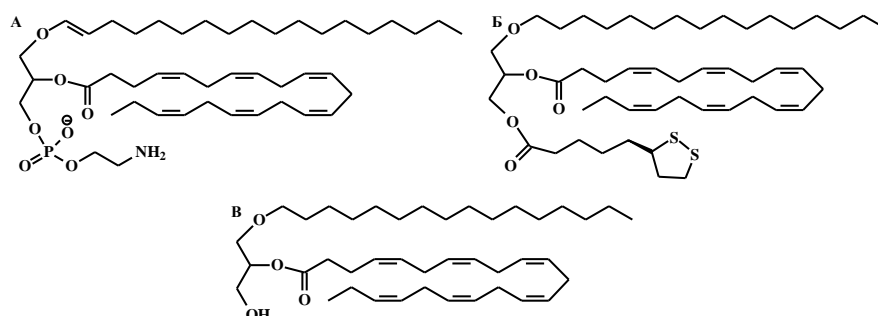
Другим важным фактором, на который оказывает влияние недостаток плазменил-ФЭ при БА, является повышение концентрации свободного холестерина в мембранах. Следствием этого является увеличение скорости образования токсического нерастворимого пептида A β 42 [78]. Плазменил-ФЭ регулируют содержание холестерина в липидных рафтах мембран нейронов: увеличение уровня плазменил-ФЭ активирует отток холестерина из нейронов [119].

1.8.6 Плазмалоген-замещающая терапия

Период полураспада плазмалогенов в организме человека составляет от 30 минут в сером веществе мозга до нескольких дней в миелиновой оболочке. Скорость биосинтеза плазменил-ФЭ и плазменил-ФХ микросомальной фракцией мозга крыс из C-¹⁴гексадеканола составляет 27.3 нмоль•г⁻¹•мин⁻¹ и 21.5 нмоль•г⁻¹•мин⁻¹ соответственно, и время включения более 50 % субстрата составляет 60 минут. Таким образом, введение эндогенного жирного спирта стимулирует образование плазменил-ФЛ, однако он не позволяет обходить пероксисомальный фермент алкил-дигидроацетонфосфат синтазу [120].

Тем не менее, как показано в работе [121], диетические АГ могут полностью исключить из процесса биосинтеза плазменил-ФЛ пероксисомальные стадии. Экспериментально показано, что после введения 1-2 % 1-*O*-гептадецил-глицерина с диетой крысам от 40 % до 60 % предшественника включается в плазменил-ФЭ в большинстве тканей животных [122]. Подобный подход получил свое подтверждение при лечении детей с неонатальной лейкодистрофией [84].

В настоящее время предложен ряд синтетических и полусинтетических препаратов в качестве предшественников плазмалогенов, имеющих в составе алкильный фрагмент в положении *sn*-1 и ДГК в положении *sn*-2 молекулы глицерина (рис. 4). Например, предложен синтетический препарат PPI 1011, у которого в положении *sn*-1 расположен алкильный фрагмент C16:0, в *sn*-2 положении – ДГК, в *sn*-3 – липоевая кислота. После введения препарата PPI 1011 (100 мг/кг) с диетой наблюдалось увеличение уровня плазмалогенов в мозге, глазах и надпочечниках [123]. Эти данные показали, что алкильный фрагмент, как и ДГК активно включаются в метаболизм и могут восстанавливать уровень плазмалогенов в организме человека.



А - 1-*O*-(1*Z*-алкенил)-2-докозагексаноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин [125]

Б – PPI-1011 (*sn*-1 - C16:0, *sn*-2 – ДГК, *sn*-3 – липоевая кислота) [123]

В – 1-*O*-алкил-2-докозагексаноил-*sn*-глицерин [126]

Рисунок 4 – Синтетические и полусинтетические плазмалогены в плазмалоген-замещающей терапии

Морские моллюски очень богаты плазменил-ФЛ и являются популярными продуктами питания во многих странах. В исследовании [124] показано, что более 80 % плазмалогенов из диеты всасываются в кишечнике, приводя к увеличению концентрации плазмалогенов в плазме крови. В настоящее время появились

работы, в которых именно диета, в состав которой входят морепродукты, является наиболее приемлемым источником плазмалогенов для человека [125].

Таким образом, введение с диетой природных АГ, ДГК или плазмалогенов может быть профилактическим фактором для предупреждения ранних стадий БА и купировать симптомы недостатка плазмалогенов при деменции и ряде других нейродегенеративных заболеваниях.

1.8.7 Антибактериальные и противогрибковые свойства 1-О-алкил-глицеринов

Исследования антибактериальной активности синтетического АГ – 1-О-додecil-глицерина (C12:0), показало его способность ингибировать рост ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, таких как *Streptococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes sp* [88, 127]. Изучение механизма действия C12:0 на *Streptococcus mutants* ВНТ проводилось в работе [128]. Авторами было показано, что механизм действия C12:0 заключается в активировании мурамидазы, фермента разрушающего клеточную стенку бактерий. Кроме того, как было показано на примере дрожжеподобных грибов родов *Candida* и *Cryptococcus*, АГ способны подавлять рост грибов и усиливать действие противогрибкового препарата АМВ [89].

1.9 Методы выделения

Для выделения АГ и концентрирования ПНЖК предложено несколько методов. Некоторые из них являются общими для этих классов соединений. На практике чаще всего используются низкотемпературная кристаллизация, образование аддуктов с мочевиной, молекулярная дистилляция, различные виды хроматографии, суперкритическая экстракция и ферментативные методы. Каждый из выше перечисленных методов имеет свои преимущества и недостатки, поэтому в промышленности используют различные методы, дополняющие друг друга. Следует отметить, что как жирные кислоты, так и АГ в природных липидных смесях входят в состав молекул ТАГ и АДАГ. Поэтому первой стадией в любом из перечисленных выше способов, за исключением ферментативных методов, является получение свободных жирных кислот (СЖК) и АГ. Это

достигается щелочным или кислотным гидролизом липидов с образованием СЖК и неомыляемых веществ (АГ, стероидов, углеводов, жирных спиртов) [129].

1.9.1 Низкотемпературная кристаллизация из органических растворителей

Кристаллизация из органических растворителей при низких температурах используется в настоящее время, как первичная стадия концентрирования ПНЖК. Простота аппаратного оформления и низкие энергозатраты делают этот метод самым распространенным в технологических схемах для отделения насыщенных жирных кислот (НЖК).

Метод низкотемпературной кристаллизации применяется для соединений, которые хорошо растворимы в органических растворителях при температуре выше 0 °С, но ограничено растворимы в этих же растворителях при отрицательных температурах, вплоть до -80 °С [130]. Растворимость жирных кислот и АГ в органических растворителях снижается с увеличением молекулярной массы и растет с увеличением количества двойных связей [131].

Растворимость наиболее значимых для организма жирных кислот и их сложных эфиров в различных органических растворителях хорошо известна [132, 133]. На основе этих данных были даны рекомендации по оптимизации условий для низкотемпературного разделения жирных кислот: 1. В одних и тех же растворителях длинноцепочечные НЖК менее растворимы, чем короткоцепочечные; 2. ПНЖК более растворимы, чем мононенасыщенные и диеновые кислоты с одинаковой длиной цепи; 3. *Транс*-изомеры ЖК менее растворимы, чем их *цис*-изомеры; 4. Кислоты нормального строения менее растворимы, чем разветвленные кислоты.

Температуры кристаллизации жирных кислот из органических растворителей значительно меняются в зависимости от длины цепи и степени ненасыщенности. Используя эти свойства и изменяя температурные условия кристаллизации из растворителей, жирные кислоты успешно разделяют по степени ненасыщенности [134]. Такой подход был использован и для выделения АГ из жира пищеварительной железы кальмара [135]. При низких температурах длинноцепочечные насыщенные АГ, которые имеют более высокие температуры

плавления, кристаллизуются, в то время как основная масса сопутствующих соединений, холестерин и сквален, остаются в жидкой фазе. Комбинируя виды растворителей, температуру и время кристаллизации можно получить фракцию обогащенную насыщенными АГ.

1.9.2 Комплексообразование с мочевиной

Фракционирование СЖК через образование комплекса с мочевиной применяется уже более 50 лет в аналитическом, препаративном и промышленных вариантах. Метод основан на образовании мочевиной в присутствии алифатических соединений гексагональных кристаллов с каналами внутри, в которые могут входить вещества линейной структуры (насыщенные и, в меньшей степени, мононенасыщенные жирные кислоты), образуя так называемые аддукты (рис. 5). Для образования аддуктов алифатические молекулы должны иметь в своей цепи более 4 атомов углерода, и сама углеродная цепь должна быть линейной [136].

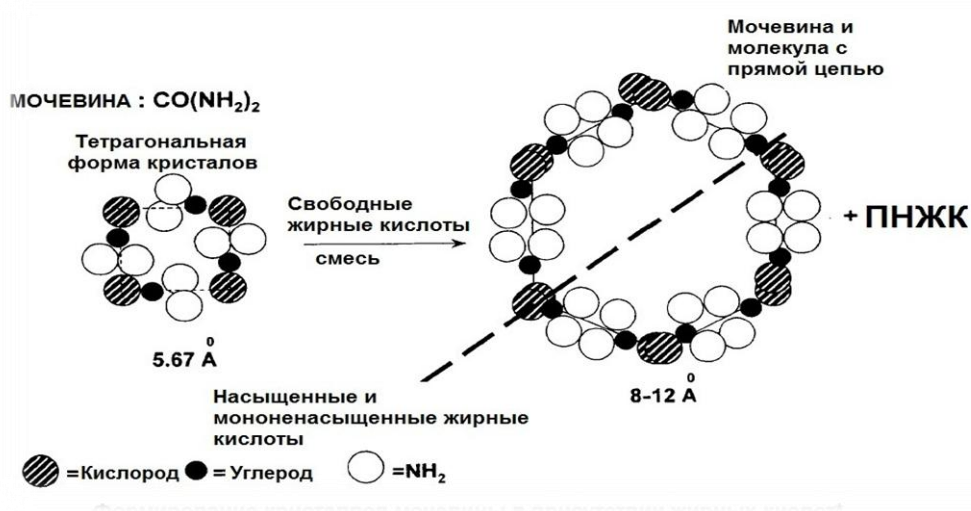


Рисунок 5 – Структура кристаллов мочевины и механизм формирования аддуктов мочевины и насыщенных жирных кислот [137]

Образование аддуктов ЖК с мочевиной находится в прямой зависимости от структуры молекул ЖК, что лежит в основе практического использования этого метода [138]. Двойные связи изменяют геометрию молекулы ЖК, затрудняя

вхождение в полость кристалла мочевины. Молекулы с *транс* двойными связями с большей вероятностью образуют аддукты, чем *цис*-изомеры.

Ключевым параметром процесса является тип растворителя. Растворитель должен быть недорогим, безопасным и хорошо растворять как мочевины, так и жирные кислоты. В наибольшей степени этим критериям отвечает этанол или водный раствор этанола [139].

Важным фактором при фракционировании с мочевиной является скорость образования аддуктов. В большинстве работ используется медленный процесс охлаждения, поскольку быстрое снижение температуры приводит к сосаждению тетрагональных кристаллов мочевины (рис. 5), не образующих аддуктов, что снижает эффективность процесса [140]. Однако в работе [141] показано, что быстрое охлаждение с 60 °С до 20 °С в течение одной минуты может быть использовано для фракционирования.

Содержание и соотношение жирных кислот в продукте, из которого необходимо извлечь ПНЖК различаются в широких пределах, что вызывает необходимость подбирать условия в каждом конкретном случае. Например, соотношение мочевины : жирные кислоты зависит от общей концентрации насыщенных кислот. Поэтому компромисс между чистотой продукта и выходом конечного продукта – необходимое условие при реализации данного метода. В нескольких теоретических работах описывается методология расчета параметров процесса с учетом состава исходных жирных кислот, необходимой степени обогащения, вида растворителя и температуры [139, 142].

Мягкие условия (низкие температуры, невысокая стоимость реактивов) и простое аппаратное оформление делают возможным технологическое масштабирование процесса. Метод фракционирования с мочевиной широко используется при получении обогащенных ПНЖК из различных источников, в том числе из липидов кальмара [143], но прежде всего, при получении концентратов ЭПК и ДГК из животных и рыбных жиров [129]. Однако для концентрирования АГ данный метод практически не используется.

1.9.3 Хроматографические методы

Хроматографические методы позволяют разделять ЖК или их эфиры в соответствии с их длиной цепи и количеством двойных связей, используя в качестве сорбента различные модификации силикагеля. Колоночная хроматография низкого давления широко используется для разделения и очистки соединений в лабораторной практике. Для разделения ПНЖК в виде метиловых (этиловых) эфиров по количеству двойных связей применяется колоночная хроматография в варианте с силикагелем, импрегнированным азотнокислым серебром. Ионы Ag^+ в составе азотнокислого серебра, нанесенного на поверхность силикагеля, образуют в нейтральных системах комплекс с двойными связями жирной кислоты. Таким образом, чем больше двойных связей в молекуле кислоты, тем выше ее сродство к сорбенту. Выделение этиловых эфиров ЭПК (>95 %) и ДГК (>99 %) из рыбного жира на силикагеле с нитратом серебра было осуществлено в работе [144].

Колоночная хроматография на силикагеле использовалась для выделения АГ из липидов печени акулы *Centrophorus squamosus* в работе [145]. Липиды подвергались щелочному гидролизу с последующей этерификацией. В результате получали смесь липидов, в состав которой входили сквален, метиловые эфиры жирных кислот, холестерин и АГ. После элюирования этой смеси с колонки с силикагелем системой растворителей гептан-диэтиловый эфир получили фракцию чистых суммарных АГ, основным компонентом которой был селажировый спирт (76 %). Другие авторы осуществляли выделение АГ колоночной хроматографией из липидов мягких кораллов [146, 147].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в настоящее время является как рутинным аналитическим методом, так и способом для получения высокоочищенных препаратов индивидуальных ПНЖК в препаративных количествах [129] и в промышленном масштабе [148]. Следует отметить, что в зависимости от исходного состава жирных кислот метод ВЭЖХ экономически эффективен только в комбинации с другими методами предварительного концентрирования ПНЖК. Комбинация методов

кристаллизации с мочевиной и последующей ВЭЖХ на колонках с неполярной фазой сорбента позволила выделить из морских микроводорослей АК, ЭПК и ДГК с концентрацией >90 % [149, 150, 151].

1.9.4 Разделение $\Delta 4$ и $\Delta 5$ полиненасыщенных жирных кислот химической модификацией через образование йод-лактонов

Единственным методом, использующим химическую модификацию ПНЖК для их разделения, является метод йод-лактонизации. Йод-лактоны образуются только при *цис* конфигурации двойных связей, что было использовано для разделения пространственных изомеров ненасыщенных кислот [152].

Механизм образования йод-лактонов основан на присоединении йода по двойной связи в $\Delta 4$ или $\Delta 5$ положениях, с замыканием пяти- или шестичленного лактонного кольца по 4-ому или 5-ому атому углерода ненасыщенной кислоты (рис. 6). Одним из достоинств реакции йод-лактонизации является восстановление исходной конфигурации и двойной связи ненасыщенных кислот после раскрытия йод-лактона, что использовалось для разделения *цис*- и *транс*-изомеров в органическом синтезе [152].

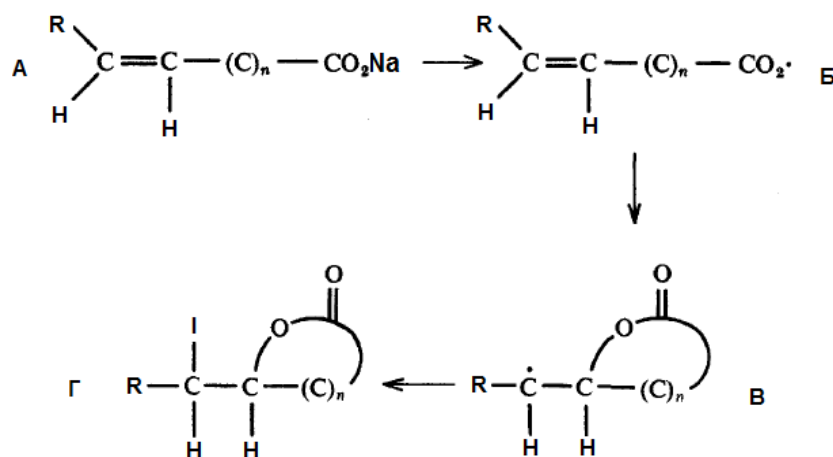


Рисунок 6 – Механизм образования йод-лактонов, где R – углеводородный фрагмент, n – 2 или 3 CH₂ группы [152]

Впервые йод-лактонизацию использовали в работе [153] для синтеза 5-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты из чистой АК. Условия реакции были следующие: АК, KI, I₂ и KHCO₃ в соотношении 1:8:15:5 растворяли в водном

тетрагидрофуране (1:2). Реакцию проводили в течение 18 ч при 0 °С, образовавшийся δ -йод-лактон АК экстрагировали пентаном. Структурные исследования показали, что ПНЖК с $\Delta 4$ и $\Delta 5$ двойными связями (ДГК, АК и ЭПК) могут образовывать различные по структуре йод-лактоны. АК и ЭПК, имеющие $\Delta 5$ двойную связь, образуют δ -йод-лактоны (рис. 7, **Иб**), в то время как ДГК с $\Delta 4$ двойной связью образует γ -йод-лактоны (γ -ЙЛ-ДГК) (Рис. 7, **Ив**).

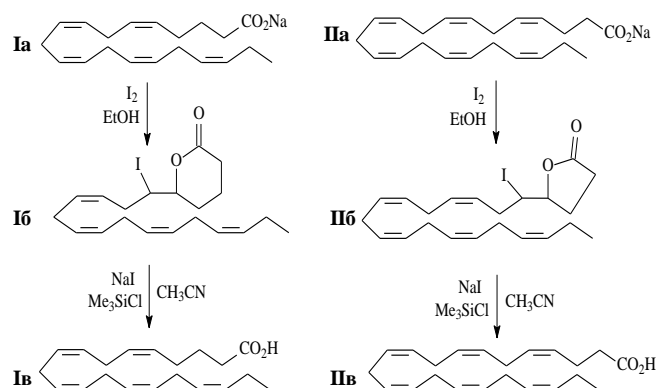


Рисунок 7 – Схема образования и раскрытия йод-лактонов ДГК и ЭПК

Образование и раскрытие йод-лактонов ПНЖК имеет ряд закономерностей:

- Скорость образования йод-лактонов зависит от вида растворителя. Тетрагидрофуран (ТГФ) использовался для получения γ -ЙЛ-ДГК, но реакция для максимального выхода продукта требовала 18-20 ч [153]. Кроме того, ТГФ легко образует перекиси, которые могут вызвать окислительные трансформации ПНЖК. Теми же недостатками обладает 1,4-диоксан. Как было показано, при использовании этанола скорость реакции несколько выше, чем с ТГФ, однако этанол не образует перекисей. Скорость образования γ -ЙЛ-ДГК в этаноле практически не отличается от аналогичного параметра в ТГФ и 1,4-диоксане, но выше в реакции для образования δ -йод-лактонов ЭПК (δ -ЙЛ-ЭПК) [154].

- Скорость образования γ - и δ -йод-лактонов зависит от количества I_2 в реакционной смеси. Недостаток I_2 в реакционной смеси приводит к синтезу в первую очередь γ -йод-лактонов, в то время как для синтеза δ -йод-лактонов требуется избыток йода [153, 155]. Для стабилизации реакции используют смесь

KI/I_2 . KI образует с йодом комплекс $[KI_3]$, который выступает донором йода в реакции и снижает степень деградации молекул ПНЖК при воздействии I_2 . Для получения δ -йод-лактона АК был использовано соотношение $KI/I_2 = 0.5$ в ТГФ в течение 18 ч, в то время как селективное получение γ -ЙЛ-ДГК проводили при $KI/I_2 = 1.0$ в ТГФ в течение 48 ч [153]. Авторами работы [154] было показано, что при соотношении $KI/I_2 = 0.5$ быстро образуются γ -ЙЛ-ДГК и δ -ЙЛ-ЭПК (10 мин) в этаноле, что не позволяет селективно извлекать γ -ЙЛ-ДГК или δ -ЙЛ-ЭПК. Более селективное образование сначала γ -ЙЛ-ДГК, потом δ -ЙЛ-ЭПК происходит при соотношении $KI/I_2 = 2.0$, но это увеличивает время реакции.

- Температура является важным параметром для реализации скорости и специфичности реакции образования йод-лактонов. Кори и соав. проводили реакцию образования йод-лактона АК при $0^\circ C$ в течение 18 ч в ТГФ [153]. Однако в дальнейшем для получения чистых ЭПК и ДГК из исходной смеси, где ЭПК/ДГК = 7:3, реакцию осуществляли при $23^\circ C$ в течение 8.3 ч в ТГФ, при этом конечное соотношение γ -ЙЛ-ДГК : δ -ЙЛ-ЭПК составило 14:1 [155]. Замена ТГФ на этанол, выполненная в работе [154], показала увеличение начальных скоростей реакции ($25^\circ C$) при той же специфичности. Максимальная скорость реакции образования γ -ЙЛ-ДГК достигается в этаноле в течение 10 мин, в то время как аналогичный показатель для δ -ЙЛ-ЭПК проявляется через 1.5 ч.

- Йод-лактоны использовали для образования 5-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты [153], переводили в соответствующие метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) [155], или восстанавливали до свободных ПНЖК [156, 157]. Восстановление йод-лактонов до ЖК проводили в растворе йодистого натрия в ацетонитриле при медленном добавлении триметилхлорсилана [156]. В работе [154] было показано, что раскрытие йод-лактонов в растворе триметилйодсилана в безводном ацетонитриле проходит с разной скоростью. δ -йод-лактоны количественно восстанавливаются до соответствующих ПНЖК быстрее, по сравнению с γ -йод-лактонами.

Таким образом, различные скорости образования и раскрытия γ - и δ -йод-лактонов позволили использовать метод йод-лактонизации для получения чистых

АК, ЭПК и ДГК. На основании данного метода была разработана технология получения высокоочищенных (более 90 %) АК, ЭПК, и ДГК из природных источников [158]. Применение йод-лактонизации в качестве аналитического метода описано в работе [159], в которой авторы предлагают использовать его для селективного анализа минорных количеств $\Delta 4$ и $\Delta 5$ ПНЖК. Выделение менее распространенной пиноленовой кислоты ($\Delta 5,9,12-18:3$) из липидов растений семейства Pinaceae было осуществлено в работе [160].

1.10 Методы анализа

1.10.1 Анализ 1-О-алкил-глицеринов

Первым методом количественного определения АГ можно считать реакцию вицинальных гидроксильных групп глицерина с йодной кислотой с последующим определением непрореагировавшего йода титрованием [161]. Развитие методов газожидкостной хроматографии (ГЖХ) и газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС) позволило получить более детальную информацию о составе и структуре АГ. Для этой цели АГ, образующиеся после щелочного гидролиза АДАГ, модифицировали до диметоксилированных [42], изопронилиденных [38] и триметилсилильных (ТМС-АГ) [145] производных. ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором позволяет определить количественное содержание компонентов смеси АГ. Диметоксилированные, изопронилиденные производные анализировали на полярных фазах [38], а ТМС-АГ – на неполярных фазах [145].

В масс-спектрах изопронилиденных и ТМС производных АГ присутствуют характеристические ионы с m/z 101 и 205 соответственно. Особенностью идентификации этих производных является различная фрагментация насыщенных и ненасыщенных АГ [46]. Подробная фрагментация ТМС-АГ рассмотрена в работе [145]. В отличие от масс-спектров ТМС производных ненасыщенных АГ, где присутствуют молекулярные ионы, в масс-спектрах ТМС производных насыщенных АГ молекулярные ионы не наблюдаются, но присутствуют ионы $[M-15]^+$, обусловленные элиминированием метильной группы из молекулярных ионов с образованием достаточно устойчивых положительных ионов с

локализацией заряда на атоме кислорода группы $-\text{O}^+=\text{Si}(\text{CH}_3)_2$. Однако использование для ГЖХ-МС анализа изопропилиденовых эфиров и ТМС-АГ не позволяет определить положение двойных связей в отличие от диметилсульфидных производных [46, 145]. Положение двойных связей определяли также после окисления алкильных фрагментов АГ до соответствующих ЖК с последующим анализом МЭЖК [42].

Идентификацию АГ без предварительной дериватизации проводили масс-спектрометрией высокого разрешения в режиме ионизации распылением в электрическом поле (electrospray ionization, ESI), который приводит к появлению интенсивных ионов $[\text{M}+\text{Na}]^+$ [147].

1.10.2 Анализ производных плазмалогенов

Методы анализа плазмалогенов основаны на специфической реакции присоединения по винильной связи в положении *sn*-1 ФЛ или отщепления альдегидов при кислотном гидролизе.

В основе йодометрического метода лежит присоединение йода к винильной связи между первым и вторым атомами углерода алкенильного фрагмента в положении *sn*-1 плазмалогенов. Непрореагировавший йод определяли спектрофотометрически при 335 нм [162]. Спектрофотометрическое определение пара-нитрофенилгидразоновых производных осуществляется при 390 нм [163]. Предел обнаружения этих двух методов составляет 20 нмоль плазмалогенов.

Количественное определение плазмалогенов в общих липидах двумерной тонкослойной хроматографией (ТСХ) было предложено в работах [164, 165]. Метод включает следующие стадии: разделение ФЛ на классы в нейтральной или аммиачной системах растворителей, выдерживание пластинки в парах HCl для разрушения винильной связи с последующим хроматографическим разделением во втором направлении в кислых системах. Пластинку проявляли и определяли количество лизо-производных ФЭ и ФХ по фосфору согласно методу [166].

Известно, что в положении *sn*-1 диацил-ФЛ расположены, в основном, насыщенные ЖК, а в плазменил-ФЛ – насыщенные или мононенасыщенные альдегиды, которые при кислотном гидролизе в метаноле образуют

диметилацетали (ДМА) [167]. Это позволяет проводить определение уровня плазмалогенов по соотношению содержания основных диметилацеталей 16:0ДМА и 18:0ДМА к содержанию соответствующих метиловых эфиров жирных кислот 16:0МЭЖК и 18:0МЭЖК. В работе [167] показано, что соотношения 16:0ДМА/16:0МЭЖК и 18:0ДМА/18:0МЭЖК в эритроцитах больных с синдромом Зельвегера составляли 0.003 и 0.001 соответственно, в контрольной группе здоровых добровольцев – 0.126 и 0.278 соответственно. Другой пример применения данного метода – определение содержания плазмалогенов в органах генно-модифицированных мышей с нарушениями в биосинтезе алкильной связи (*Pex7*) при плазмалоген-замещающей терапии батилловым спиртом. Авторы показали, что соотношение 18:0ДМА/18:0МЭЖК в печени, сердце и почках трансгенных мышей было ниже предела обнаружения, в то время как в контрольной группе эти величины составляли 0.5, 3.5 и 2.3 соответственно [168].

Определение содержания плазмалогенов по соотношению основных ДМА (16:0ДМА и 18:0ДМА) к соответствующим метиловым эфирам ЖК (16:0 и 18:0) не позволяет провести количественную оценку. Однако этот метод используется для определения относительного уровня плазмалогенов у больных с пероксисомальной дисфункцией по сравнению со здоровыми людьми [167].

1.10.3 Анализ молекулярных видов липидов с простой эфирной связью

Применение предварительного разделения, различных режимов ионизации (ESI, матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI), химической ионизации при атмосферном давлении (APCI)) и методов разделения ионов (квадрупольный и времяпролетный масс-анализаторы, орбитальная ионная ловушка) позволило реализовать анализ молекулярных видов различных классов липидов и липидных метаболитов, в том числе алкильных и алкенильных.

Наиболее используемым режимом ионизации для анализа молекулярных видов липидов является метод ESI. Анализ молекулярных видов плазмалогенов этим методом для определения степени тяжести БА и шизофрении проводили в работах [169, 170]. Метод ESI использовался не только при диагностике нейродегенеративных заболеваний, но и для определения молекулярных видов

плазмалогенов асцидии *Halocynthia roretzi* [171]. Молекулярные виды синтетических АДАГ определяли в работе [172].

Особенностью ESI является мягкая ионизация, приводящая к фрагментации ФЛ. При использовании ESI образуются квазимолекулярные ионы $[M-H]^-$ и $[M+H]^+$, фиксирование точных масс которых позволяет определять элементный состав анализируемых соединений. Тандемная масс-спектрометрия, основанная на соединении двух масс-анализаторов, между которыми расположена ячейка соударений, позволяет установить ацильные, алкенильные (алкильные) фрагменты в составе ФЛ [171] и региоспецифическое положение ЖК в синтетических АДАГ [172].

В целом, анализ литературных данных показывает, что необходимо продолжать поиск доступных источников АГ, совершенствовать методики их анализа, исследовать биологическую активность и разрабатывать новые способы получения АГ.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Растворители и реактивы

В работе были использованы следующие растворители: ацетон, бензол, гексан, хлороформ, диэтиловый эфир, ацетонитрил, этанол, метанол, петролейный эфир (40-70 °С) (ЗАО «Реактив», Москва). Все растворители были очищены согласно стандартным методикам [173].

Серная, соляная и уксусная кислоты были квалификации «хч». Гидроксиды калия и натрия, сульфат натрия безводный, гидрокарбонат натрия, хлорид натрия, тиосульфат натрия, ацетил хлористый, натрий йодистый были квалификации «хч»; металлический натрий квалификации «ч»; йод квалификации «осч».

Триметилхлорсилан (Me_3SiCl) приобретен в фирме «Acros organics», США; *N,O*-ди-(триметилсилил)-трифтор-ацетамид (БСТФА), батилловый спирт и стандарты ДМА закуплены у фирмы «Sigma-Aldrich», США; питательная среда Сабуро для дрожжеподобных грибов приобретены в «Биомед», Россия; стандартные диски с АМВ по 40 мкг/диск и клотримазолом (КОТ) по 10 мкг/диск куплены в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия; октил-глицерин любезно предоставлен О. Ю. Слабко (Дальневосточный федеральный университет, Россия).

2.2 Биологический материал

Пищеварительная железа кальмара *B. magister* была заготовлена и заморожена на промысле в Беринговом море предприятием ОАО «Находкинская база активного морского рыболовства». Морские звезды *A. amurensis*, *D. nippon* и *P. pectinifera* были выловлены в заливе Восток Японского моря в апреле 2015 г.

Объектами исследования противогрибковой активности АГ служили 38 клинических штаммов грибов рода *Candida* (*Candida* spp. (25 штаммов), *C. albicans* (8 штаммов), *C. tropicalis* (5 штаммов)), среди которых 21 штамм – чувствительные к противогрибковым препаратам, 17 штаммов – резистентные (табл. 5). Клинические штаммы были получены от больных различными формами микозов в ГАУЗ «Краевой клинический кожно-венерологический диспансер» (г. Владивосток).

Таблица 5 – Число чувствительных и резистентных штаммов в исследовании действия АМВ и КОТ

ВИД	Число штаммов в исследовании с АМВ		Число штаммов в исследовании с КОТ	
	Чувствительные	Резистентные	Чувствительные	Резистентные
<i>Candida spp.</i>	8	2	8	7
<i>Candida albicans</i>	1	2	2	2
<i>Candida tropicalis</i>	2	1	1	1

В исследовании противораковой активности АГ были использованы клетки меланомы человека SK-Mel-5 (АТСС#НТВ70), SK-Mel-28 (АТСС#НТВ72) и RPMI-7951 (АТСС#НТВ66) из коллекции Института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.

Эксперименты по влиянию диеты с АГ и n-3 ПНЖК на содержание плазмалогенов и ДГК у животных проводили на крысах линии «Вистар».

2.3 Экстракция и гидролиз липидов

Экстракцию липидов для аналитических целей проводили согласно метода Блай и Дайера [174] из предварительно гомогенизированной ткани. К гомогенату прибавляли смесь хлороформ-метанол, 1:2 (10 мл на 1 г сырого веса ткани), перемешивали и выдерживали 2-3 ч. Затем смесь фильтровали через бумажный фильтр и промывали дважды смесью хлороформ-метанол, 1:1 (5 мл). Фильтраты объединяли и расслаивали добавлением равного объема воды. После расслоения нижний слой отделяли на делительной воронке и обезвоживали, пропуская через слой безводного сульфата натрия. Полученный раствор общих липидов упаривали при 40 °С на роторном испарителе.

Для препаративного выделения АГ и ПНЖК жир получали термической обработкой пищеварительной железы кальмара при 70 °С в течение часа без растворителей, липиды отделяли декантацией. Полученные общие липиды гидролизовали 10 % раствором NaOH в этаноле при 60 °С в течение 1 ч. Контроль за прохождением реакции осуществляли ТСХ в системе элюирования гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота, 80:20:1. После завершения реакции смесь охлаждали, подкисляли раствором 4 % H₂SO₄ до pH 2-3, липиды (СЖК,

стерины, АГ) экстрагировали петролейным эфиром. Полученный экстракт промывали дистиллированной водой, высушивали над Na_2SO_4 , растворитель упаривали в вакууме до постоянного веса липидов.

Состав ЖК в виде МЭЖК определяли ГЖХ. Состав АГ в виде ТМС-АГ производных определяли ГЖХ-МС.

2.4 Получение метиловых эфиров жирных кислот и диметилацеталей для газожидкостной хроматографии

Получение МЭЖК и ДМА (производные альдегидов, которые образуются при кислотном гидролизе плазмалогенов) было осуществлено по методу [175] с незначительными изменениями. Для проведения рутинных анализов по содержанию ЖК брали 1 мг общих липидов и растворяли в минимальном количестве бензола. Затем, добавляли 0.2 мл 1 % раствора метилата натрия в метаноле, и смесь нагревали 20 мин на водяной бане при температуре 50 °С. Далее, к раствору добавляли 0.4 мл 5 % раствора HCl в метаноле. Метилирование проводили при 50 °С в течение 20 мин. После охлаждения реакционной смеси образовавшиеся МЭЖК экстрагировали гексаном, упаривали и растворяли в минимальном количестве гексана. Очистку МЭЖК и ДМА проводили препаративной ТСХ элюированием в бензоле. Зону МЭЖК и ДМА на пластине снимали, экстрагировали хлороформом и упаривали. Полученные МЭЖК и ДМА анализировали ГЖХ.

2.5 Получение производных 1-О-алкил-глицеринов для газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Для анализа ГЖХ-МС осуществляли выделение АГ из гидролизованных липидов препаративной ТСХ в системе гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота, 50:50:1. ТМС-АГ получали следующим образом: к 1 мг АГ добавляли 50 μl БСТФА, затем выдерживали при 80 °С в течение 1 ч. Полученный образец растворяли в 1 мл гексана для дальнейшего ГЖХ-МС анализа.

2.6 Выделение 1-О-алкил-глицеринов и полиненасыщенных жирных кислот из жира командорского кальмара

2.6.1 Кристаллизация 1-О-алкил-глицеринов из ацетона

Полученные после гидролиза липиды (п. 2.3) растворяли в ацетоне в соотношении липиды : ацетон, 1:5, и выдерживали при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч. Образовавшийся осадок отделяли фильтрованием при температуре кристаллизации, фильтрат упаривали в вакууме для последующего выделения ПНЖК. Осадок растворяли в ацетоне при тех же соотношениях (1:5) и проводили повторную кристаллизацию при $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Образовавшийся осадок отделяли фильтрованием, промывали холодным ацетоном и сушили при комнатной температуре. Контроль за составом липидов в осадках и фильтратах осуществляли ТСХ в системе гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота, 70:30:1. Компонентный состав АГ определяли с помощью ГЖХ-МС.

2.6.2 Кристаллизация жирных кислот с мочевиной

Мочевину добавляли к 95 % этанолу из расчета 1:6, кг/л и нагревали до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ при перемешивании. После полного растворения мочевины добавляли СЖК. Оптимальное количественное соотношение СЖК : мочевина : этанол составляло 1:3:18, кг/кг/л. Кристаллизацию проводили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 ч. Образовавшиеся кристаллы были отделены от жидкой фазы фильтрованием при температуре кристаллизации. К фильтрату добавляли 2-3 объема воды, расслаивали. Верхний слой СЖК отделяли на делительной воронке, дополнительно промыв дистиллированной водой. Состав жирных кислот липидов экстракта определяли ГЖХ.

2.6.3 Йод-лактонизация

2.6.3.1 Селективное образование γ -йод-лактонов докозагексаеновой кислоты

Для получения γ -ЙЛ-ДГК использовали свободные ЖК с приблизительно равной концентрацией ЭПК и ДГК, полученные фракционированием ЖК с мочевиной при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Суммарные ЖК растворяли в 80 % этаноле и переводили в натриевые соли смешиванием с 20 % водным раствором NaHCO_3 . К

раствору натриевых солей ЖК в водном этаноле добавляли в течение 2-х ч при интенсивном перемешивании раствор I_2 в 95 % этаноле. Контроль за образованием γ -ЙЛ-ДГК осуществлялся с помощью ТСХ в бензоле: $R_f = 0.4$ для γ -ЙЛ-ДГК и 0.2 для δ -ЙЛ-ЭПК. Время реакции составило 3 ч при 25 °С, затем избыток I_2 удаляли насыщенным водным раствором $Na_2S_2O_3$. Йод-лактоны ЖК экстрагировали из раствора натриевых солей ЖК гексаном; ЖК из гексанового экстракта удаляли промывкой 2 % раствором бикарбоната натрия в 40 % этаноле, экстракт промывали водой, высушивали безводным Na_2SO_4 , упаривали.

Восстановление ДГК из γ -ЙЛ-ДГК проводили в растворе NaI в безводном ацетонитриле, добавляя по каплям Me_3SiCl при интенсивном перемешивании до конечного соотношения γ -ЙЛ-ДГК : Me_3SiCl (1:2 моль/моль). Выделившийся свободный I_2 после раскрытия йод-лактонов, удаляли раствором $Na_2S_2O_3$. СЖК, образовавшиеся после раскрытия γ -ЙЛ-ДГК, из реакционной смеси экстрагировали гексаном. Для удаления стеринов и гексаметилдисилоксана, образовавшегося после гидролиза Me_3SiCl , СЖК были переведены в форму натриевых солей и выделены 2 % раствором бикарбоната натрия в 40 % этаноле. Соли ЖК были переведены в форму СЖК добавлением водного раствора HCl (до pH 3-4) и экстрагированы гексаном. Гексановый экстракт промывали водой, высушивали безводным Na_2SO_4 , упаривали растворитель. Состав ЖК в полученных продуктах определялся ГЖХ.

2.6.3.2 Селективное образование δ -йод-лактонов эйкозапентаеновой кислоты

После извлечения γ -ЙЛ-ДГК концентрат ПНЖК, в котором содержалось 47.2 % ЭПК и 2.7 % ДГК в виде натриевых солей, подвергали повторной йод-лактонизации для образования δ -ЙЛ-ЭПК. К раствору натриевых солей ЖК при перемешивании (20 °С) по каплям в течение 2 ч добавляли раствор I_2 в 95 % этаноле и оставили на 1 ч при комнатной температуре. Непрореагировавший I_2 нейтрализовали насыщенным водным раствором $Na_2S_2O_3$. δ -ЙЛ-ЭПК экстрагировали из реакционной смеси гексаном. ЖК из гексанового экстракта удаляли промывкой его 2 % раствором бикарбоната натрия в 40 % этаноле.

Гексановый экстракт промывали водой, высушивали безводным Na_2SO_4 , упаривали растворитель. Восстановление ЭПК из δ -ЙЛ-ЭПК проводили так же, как и в примере с раскрытием γ -ЙЛ-ДГК (п. 2.6.3.1).

2.6.4 Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот

Образцы смесей СЖК для разделения ВЭЖХ предварительно переводили в этиловые эфиры жирных кислот (ЭЭЖК). К СЖК добавляли 2 % раствор H_2SO_4 в этаноле. Выдерживали при температуре 60 °С в течение 1 ч. К реакционной смеси добавляли дистиллированную воду. ЭЭЖК экстрагировали троекратно гексаном. Гексановый экстракт высушивали над Na_2SO_4 , упаривали. Смесь ЭЭЖК была очищена колоночной хроматографией на силикагеле. ЭЭЖК элюировали гексаном (10 объемов колонки).

ВЭЖХ была выполнена на хроматографе LC-8A (Shimadzu, Япония) с детекторами UV/VIS SPD-20A (210 нм) и RID-10A. Подбор условий для выбора оптимального соотношения этанола и воды проводили на колонке Zorbax ODS 8 μm , 21 см \times 21.2 мм (Agilent, США). Препаративное разделение проводили на колонке Discovery HS C-18, 10 μm 25 см \times 50 мм (Supelco, США). Элюирование осуществляли в изократическом режиме системой растворителей этанол-вода (80:20, об/об). Скорость элюирования составила 50 мл/мин. Фракции, содержащие этиловые эфиры ЭПК и ДГК, экстрагировали гексаном из водно-спиртовой смеси и анализировали ГЖХ.

2.7 Аналитические методы

2.7.1 Тонкослойная хроматография

Анализ общих липидов, контроль реакций гидролиза, йод-лактонизации и восстановления полиненасыщенных жирных кислот из ЙЛ осуществляли ТСХ на пластинках с закрепленным силикагелем ПТСХ Sorbfil (Россия). Для анализа нейтральных липидов использовали систему растворителей гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота, 80:20:1. Анализ липидов после гидролиза осуществляли в системе гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота, 70:30:1. Очистку МЭЖК,

АДАГ и АГ проводили ТСХ в бензоле, системах гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота, 90:10:1 и 50:50:1 соответственно.

Компонентный состав общих липидов, смеси липидов после гидролиза и полученных фракции АГ определяли методом ТСХ в системах гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота, 80:20:1 или гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота, 70:30:1 на предварительно промытых пластинках (10×10 см) с силикагелем ПТСХ Sorbfil (Россия) [34]. Пластинки проявляли 7 % раствором $H_2SO_4/EtOH$ с последующим нагревом до 240 °С. Хроматограммы сканировали с помощью сканера Epson Perfection 2400 PHOTO (Япония). Процентное содержание отдельных классов липидов определяли по интенсивности пятен обработкой изображения в программе Sorbfil TLC Videodensitometer DV (Россия).

2.7.2 Газожидкостная хроматография метиловых (этиловых) эфиров жирных кислот и диметилацеталей

Анализ МЭЖК, ЭЭЖК и ДМА проводили на хроматографе GC-17A (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором. Для анализа МЭЖК (ЭЭЖК) использовали капиллярную колонку Supelcowax 10 (Supelco, США), температура термостата составила 190 °С, инжектора и детектора – 240 °С. Идентификация пиков МЭЖК (ЭЭЖК) проводилась по временам удерживания индивидуальных эфиров жирных кислот и по значениям эквивалентной длины цепи [176]. Идентификацию ДМА осуществляли сравнением времен удерживания со временами удерживания стандартов 16:0ДМА и 18:0ДМА.

2.7.3 Газожидкостная хроматография-масс-спектрометрия

Состав и структура ТМС-АГ были определены методом газовой хромато-масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра QP-2010 *Ultra* (Shimadzu, Япония). Ионизация осуществлялась электронным ударом при энергии 70 eV. Разделение компонентов осуществляли на колонке Supelco SLB-5ms (США) при следующих условиях: 200 °С в течение 2 мин, нагрев до 290 °С со скоростью 2 °С/мин, выдерживание при 290 °С в течение 20 мин. Идентификацию ТМС-АГ осуществляли по времени удерживания, а также и по значениям

m/z ионов $[M]^+$ для ненасыщенных ТМС-АГ, $[M-15]^+$ для насыщенных ТМС-АГ и m/z 205.

2.7.4 Анализ 1-О-алкил-глицеринов тандемной масс-спектрометрией с прямым вводом образца в ионный источник

Анализ АГ проводили на газовом хромато-масс-спектрометре TQ-8040 (Shimadzu, Япония), используя прямой ввод образца в ионный источник. Для подбора условий применяли батилловый спирт (Sigma, США). Сканирование в режиме полного ионного тока проводили при различных условиях: энергия ионизации (ЭИ) составляла 70, 20, 15, 13, 11 eV, температура ионного источника 140 и 200 °С, диапазон регистрируемых значений m/z составил 50-500. Скорость нагрева штока прямого ввода составила 250 °С/мин до температуры 350 °С с удерживанием в течение 5 мин.

Тандемную масс-спектрометрию (режимы сканирования дочерних и родительских ионов) осуществляли при энергии в ячейке соударений 1 и 10 eV при энергии ионизации 11 eV и температуре ионного источника 140 °С. Диапазон регистрируемых значений m/z составил 150-400. Анализ смеси АГ, выделенных из липидов *B. magister* и *A. amurensis*, и ОГ проводили в режиме сканирования родительских ионов по дочернему иону с m/z 93.

2.8 Определение противогрибковой активности 1-О-алкил-глицеринов

Для определения противогрибковой активности АГ использовались стандартные диски с содержанием АМВ 40 мкг и КОТ 10 мкг. Препарат АГ (раствор насыщенных АГ в этаноле) наносили в количествах 5, 10, 20 мкг на диск с КОТ и 20, 40, 80 мкг – на диск с АМВ в стерильных условиях.

Для исследования были использованы стандартные для клинических лабораторий методы «двойных дисков» и тест «OXOID», которые являются модификациями классического диско-диффузионного метода определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам [177]. На поверхность среды Сабуро в чашках Петри наносили 2 мл суспензии чистой суточной культуры. Наложение дисков осуществляли по следующей схеме: в центр – диск, содержащий моноформу препарата (АМВ, КОТ), по бокам от него на расстоянии

10, 15, 20 мм между центрами дисков – диски с нанесенными комбинациями препаратов: АМВ/АГ (40/20 мкг, 40/40 мкг, 40/80 мкг), КОТ/АГ (10/5 мкг, 10/10 мкг, 10/20 мкг). Инкубация проводилась при температуре 35 °С в течение 48 ч. Измерение диаметра задержки роста дрожжеподобных грибов осуществляли на темной поверхности в отраженном свете под углом 45 °С. В качестве контрольного штамма использовали *C. albicans* ATCC 32354. Определение минимальной ингибирующей концентрации АГ проводили с помощью метода двукратных последовательных разведений [177].

2.9 Определение противоопухолевой активности 1-О-алкил-глицеринов

2.9.1 Определение цитотоксичности 1-О-алкил-глицеринов и пролиферации клеток

Жизнеспособность клеток меланомы человека SK-Mel-5, SK-Mel-28 и RPMI-7951 оценивали с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромида (MTS-реагента) (Promega, США) [178]. Клетки культивировали в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с добавлением 10 % FBS (сыворотка эмбриональная бычья) (Биолот, Россия), 100 кл/мл пенициллина и 100 кл/мл стрептомицина. Культивирование проводили в инкубаторе MCO-18A1C (Sanyo, Япония) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Для определения цитотоксичности АГ клетки (5×10^3) рассеивали в 96-луночные планшеты и культивировали в 200 мкл соответствующей среды в течение 24 ч при 37 °С в инкубаторе в атмосфере 5 % CO₂. Затем среду удаляли, обрабатывали клетки АГ различной концентрации (5-20 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. После инкубации добавляли по 15 мкл MTS-реагент и инкубировали 4 ч при 37 °С, в атмосфере с 5 % CO₂. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Bio-Tek Instruments» (США) при длине волны 490/630 нм ($A_{490/630}$).

Для определения пролиферации клеток меланомы человека SK-Mel-5, SK-Mel-28 и RPMI-7951 под действием АГ (5-20 мкМ) клетки (3.5×10^3) рассеивали в 96-луночные планшеты и культивировали в 200 мкл соответствующей среды в

течение 24 ч при 37 °С в инкубаторе в атмосфере 5 % CO₂. Затем среду удаляли, обрабатывали клетки АГ различной концентрации (5-20 мкМ) и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч. После инкубации добавляли по 15 мкл MTS-реагента и инкубировали 4 ч при 37 °С, в атмосфере с 5 % CO₂. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490/630 нм (A_{490/630}).

Все эксперименты проводились трижды, были рассчитаны средние значения абсорбции.

2.9.2 Неопластическая трансформация клеток (метод мягких агаров)

Определение активности ОГ и химилового спирта на формирование и рост колоний клеток меланомы человека RPMI-7951 проводили с использованием метода мягких агаров (soft-agar assay). Клетки (8×10³ клеток) RPMI-7951 обрабатывали ОГ или химиловым спиртом (5, 10 и 20 мкМ) в ВМЕ агаре (Basal medium eagle), содержащим 10 % буферного раствора FBS. Клетки инкубировали в течение четырех недель при 37 °С, в атмосфере с 5 % CO₂. Колонии клеток оценивались с использованием микроскопа “MOTIC AE 20” (Китай) и программы Motic Image plus.

2.10 Определение включения 1-О-алкил-глицеринов и полиненасыщенных жирных кислот в липиды печени крыс

В эксперименте использовали 20 самцов лабораторных крыс линии «Вистар» возрастом 20 месяцев. Животных разделили на четыре группы: контрольная группа из трех животных получала стандартную диету; группа «АГ» из пяти животных в диете получала АГ; группа «АГ+ПНЖК» из семи животных в диете получала АГ с добавлением этиловых эфиров концентрата ПНЖК; группа «ПНЖК» из пяти животных в диете получала этиловые эфиры концентрата ПНЖК. Препараты вводили интрагастрально. Контрольной группе вводили 1 мл дистиллированной воды, группам «АГ» и «АГ+ПНЖК» вводили 60 мг АГ в день, группам «АГ+ПНЖК» и «ПНЖК» - 0.2 мл концентрата ПНЖК (ЭПК – 32 %, ДГК – 20 %) интрагастрально. Длительность эксперимента составила 4 месяца. Животные содержались при стандартных условиях и имели свободный доступ к пище и воде.

Эвтаназию животных осуществляли путем декапитации под эфирным наркозом в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС. Печень до анализа хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца. Липиды экстрагировали согласно методу [174]. МЭЖК и ДМА были получены согласно методике [175]. Анализ МЭЖК и ДМА проводили ГЖХ согласно условиям, описанным ранее (п. 2.7.2).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Состав и содержание 1-О-алкил-глицеринов в морских беспозвоночных

Несмотря на то, что АДАГ является главным компонентом в общих нейтральных липидах глубоководных акул, рассматривать этот источник как сырье для промышленного получения АГ сложно [41]. Относительно низкая численность, большая разрозненность делает промысел акул очень затратным. Кроме того, высокий уровень сквалена и холестерина требует дополнительных стадий при выделении чистых АГ из жира акул. Поэтому поиск источников с разнообразным составом АГ стал одной из задач нашей работы.

Одними из массовых видов морских беспозвоночных являются морские звезды *A. amurensis*, *D. nippon*, *P. pectinifera* и промысловый командорский кальмар *B. magister*, которые содержат большие количества АДАГ [31, 32, 46].

В состав нейтральных липидов исследуемых организмов входили эфиры стериннов, АДАГ, ТАГ, свободные жирные кислоты, стерины, моноацил- и диацилглицерины. По количеству полярных липидов эти организмы значительно отличались друг от друга. Основными классами липидов в пищеварительной железе кальмара были АДАГ и ТАГ со следами полярных липидов, в то время как в общих липидах звезд основными были ТАГ и полярные липиды [179], АДАГ составляли не более 21 %.

Проведенный анализ липидов показал, что содержание АДАГ во внутренних органах морских звезд составляло *A. amurensis* – 20.7 %, *D. nippon* – 20.5 %, *P. pectinifera* – 9.8 % (табл. 6). В липидах пищеварительной железы кальмара содержание АДАГ составляло 38.5 % (табл. 6).

Таблица 6 – Содержание АДАГ (%) в исследованных образцах

Виды	Содержание АДАГ ¹
<i>A. amurensis</i>	20.71±1.91
<i>D. nippon</i>	20.54±0.40
<i>P. pectinifera</i>	9.79±1.12
<i>B. magister</i>	38.49±2.71

¹ % от общих липидов, среднее ± стандартное отклонение (n=3)

Состав АГ, образованных после щелочного деацилирования АДАГ, во всех исследуемых образцах отличался преобладанием насыщенных алкильных фрагментов (табл. 7). В морских звездах содержание насыщенных АГ составляло 89.8-93.3 %, в кальмаре – 82.7 %. Основными компонентами в липидах морских звезд были химированный и батированный спирты, где наблюдалось примерно одинаковое содержание С16:0 (39.3-46.0 %) и С18:0 (35.9-45.1 %). В работе [31] в липидах внутренних органов *A. amurensis* основным компонентом был С18:0 (46.7-49.8 %), С16:0 находился в пределах 13.1-15.0 %, подобное соотношение этих алкильных фрагментов наблюдалось также для *D. nippon* и *P. pectinifera* [32]. В липидах кальмара преобладал алкильный фрагмент С16:0, содержание которого составляло 73.5 %, что подтверждается ранее опубликованными данными [46].

Таблица 7 – Состав АГ исследованных организмов

Алкильный фрагмент	<i>A. amurensis</i>	<i>D. nippon</i>	<i>P. pectinifera</i>	<i>B. magister</i>
С14:0	1.1 ¹	1.34	0.73	1.21
С15:0	0.30	0.32	сл.	0.33
С16:1	н.о.	0.27	н.о.	0.62
С16:0	39.25	46.02	42.27	73.52
С17:0	2.45	3.74	2.64	0.50
С18:1	0.80	0.74	0.37	7.64
С18:1	0.79	1.86	0.85	5.84
С18:1	0.34	0.29	сл.	0.58
С18:0	45.10	35.88	44.05	5.62
С19:0	0.75	0.59	2.04	0.18
С20:1	4.17	4.27	1.98	0.87
С20:1	2.27	2.82	2.56	1.01
С20:1	сл.	сл.	0.95	0.30
С20:0	0.74	сл.	0.66	н.о.
С22:1	н.о.	н.о.	н.о.	0.39
С22:1	н.о.	н.о.	н.о.	0.10
Σ разв. ²	1.94	1.86	0.90	1.56
Σ нас.	91.63	89.75	93.29	82.74
Σ мононенас.	8.37	10.25	6.71	17.26

¹ мол. % от суммы всех компонентов; ² разветвленные – 17:0i, 17:ai, 18:0i;

разв. – разветвленные алкильные фрагменты, нас. – насыщенные алкильные фрагменты, мононенас. – мононенасыщенные алкильные фрагменты, сл. – следовые количества (менее 0.1 %), н.о. – не обнаружено

Во всех исследованных образцах наблюдали относительно низкое содержание ненасыщенных АГ, которые были представлены в основном изомерами С18:1 и С20:1. В липидах пищеварительной железы кальмара основными ненасыщенными АГ были изомеры С18:1 (11.1 %), в морских звездах – изомеры С20:1 (4.5-7.1 %).

Проведенный анализ показал, что липиды морских звезд и кальмара отличаются по составу и содержанию основных АГ. Известно, что биологическая активность АГ зависит от структуры алкильного фрагмента. Так, например, насыщенные АГ (батыловый и химировый спирты) активно стимулируют процессы гемопоза [1], в то время как селаксировый спирт (С18:1) проявляет подобные свойства в меньшей степени. АГ с короткими углеродными фрагментами усиливают проницаемость ГЭБ в мозге [93]. Особый интерес представляет химировый спирт, исследование метаболизма и биологическая активность которого показана в работах [180, 181, 182, 183].

На основании полученных нами результатов анализа общего содержания АДАГ, состава АГ, доступности и распространенности объекта промысла наиболее перспективным источником АГ можно считать жир пищеварительной железы *B. magister*. Пищеварительная железа составляет до 25 % от веса кальмара [46] и не используется в пищевой промышленности.

3.2 Состав липидов пищеварительной железы кальмара

Общее содержание липидов в пищеварительной железе кальмара достигало 53 % от сырой массы. Содержание основных компонентов (АДАГ, ТАГ и СЖК) приведено в таблице 8. Стерины и их эфиры, а также полярные компоненты присутствовали в количествах, не превышающих в сумме 11.0 %. Относительно высокое содержание СЖК, моноацил- и диацилглицеринов, вероятно, связано с ферментативным гидролизом ТАГ, АДАГ. Было показано, что пищеварительные системы морских беспозвоночных имеют высокоактивные фосфолипазы и липазы, которые активируются в процессе гомогенизации и выделении липидов из пищеварительной железы [184].

Таблица 8 – Состав исходных липидов пищеварительной железы кальмара

Липиды	Содержание, %
Эфиры стеринов	2.12±0.32 ¹
1-О-алкил-2,3-ацилглицерины	38.49±2.71
Триацилглицерины	24.26±2.14
Свободные жирные кислоты	20.24±4.16
Стерины	5.45±0.41
Моноацил-, диацилглицерины	6.87±2.19
Полярные липиды	2.57±0.25

¹% от суммы всех компонентов, среднее значение ± стандартное отклонение (n=3)

Важным компонентом, входящим в состав липидов являются ЖК. Состав жирных кислот в общих липидах пищеварительной железы кальмара отличался высоким содержанием мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) (61.6 %). Основными МНЖК были 18:1n-9 и 22:1n-11, которые составили 19.2 % и 9.8 % от суммы ЖК соответственно (табл. 9). Это можно объяснить питанием кальмаров такими видами рыб, как сельдь, мойва и песчанка, у которых в составе липидов преобладают эти кислоты [185]. НЖК (18.4 %) представлены в основном пальмитиновой (9.4 %), стеариновой (3.5 %) и фитановой кислотами (2.3 %). ПНЖК составляют 19.9 %, среди которых 20:5n-3 (ЭПК) – 7.5 %, 22:6n-3 (ДГК) – 5.9 %. Полученные в этом исследовании результаты по составу ЖК общих липидов пищеварительной железы *B. magister* незначительно отличаются от данных, приводимых ранее, для этого же вида кальмара, отловленного в апреле [3]. Известно, что состав ЖК липидов морских беспозвоночных зависит от состава ЖК источников питания [186], изменения которых в северных водах имеют ярко выраженный сезонный характер [187]. Отражением такой сезонной смены источников питания может быть изменения в составе АГ и ЖК общих липидов пищеварительной железы *B. magister* [46].

Таблица 9 – Распределение жирных кислот в АДАГ, ТАГ и СЖК из пищеварительной железы кальмара

Жирная кислота	Общие липиды	АДАГ	ТАГ	СЖК
14:0	2.44±0.40 ¹	1.74±0.27	4.24±0.12	2.78±0.98
16:0	9.37±0.64	4.88±2.87	18.30±1.31	15.84±2.16
16:1n-7	6.08±1.27	3.37±0.67	5.11±2.73	8.55±0.05
Фитановая	2.25±0.33	2.87±0.51	1.91±1.35	1.39±0.00
18:0	3.52±0.97	2.27±1.37	4.33±2.73	5.72±2.66
18:1n-9	19.16±1.62	19.59±2.49	22.11±0.44	23.74±1.20
18:1n-7	5.29±0.31	5.63±0.05	4.95±0.32	5.80±0.04
18:1n-5	0.61±0.03	0.45±0.02	0.54±0.38	сл. ²
18:2n-6	1.31±0.19	1.54±0.43	1.51±0.04	3.55±1.60
18:3n-3	0.56±0.09	0.77±0.29	0.35±0.25	сл.
18:4n-3	0.57±0.06	0.74±0.30	0.28±0.19	сл.
20:1n-11	7.21±0.53	7.66±0.06	6.65±0.61	6.49±1.27
20:1n-9	6.69±0.41	6.44±0.35	6.45±0.53	5.89±1.49
20:1n-7	0.62±0.07	0.81±0.05	0.55±0.39	сл.
20:4n-6	0.46±0.09	0.42±0.08	0.14±0.09	сл.
20:5n-3	7.51±0.07	8.32±3.02	2.42±0.08	2.52±1.76
22:1n-11	9.84±0.79	8.67±0.56	9.88±4.03	5.71±0.31
22:1n-9	1.38±0.87	2.31±0.09	2.70±1.06	1.19±0.29
22:5n-3	0.49±0.14	0.80±0.23	0.24±0.17	сл.
22:6n-3	5.96±0.38	7.54±1.82	2.10±0.76	2.36±0.06
Другие ³	8.68±2.13	9.20±2.12	5.23±2.27	8.46±2.09
ΣНЖК	18.43±0.62	17.43±2.38	31.33±2.24	37.40±7.32
ΣМНЖК	61.60±0.68	57.73±1.37	60.44±3.42	52.87±7.82
ΣПНЖК	19.97±0.05	24.84±3.75	8.23±1.17	9.73±0.50

¹ среднее значение ± стандартное отклонение (n=3); ² содержание компонента менее 0.1 %

³ Другие ЖК – 14:1, 15:0i, 15:0ai, 15:0, 16:0i, 16:0ai, 16:1n-5, 16:2n-6, 17:0i, 17:0, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:3n-3, 20:4n-3, 24:1n-9

Анализ распределения ЖК в АДАГ, ТАГ, а также состав СЖК показал, что высоким содержанием ПНЖК (24.9 %) отличались АДАГ, в то время как содержание ПНЖК в ТАГ составляло только 8.2 % (табл. 9). Для ТАГ характерен высокий уровень НЖК (31.3 %), в то время как МНЖК в составе ТАГ и АДАГ отличались незначительно. Во фракции СЖК преобладали НЖК и МНЖК, 37.4 % и 52.9 % соответственно. Интересно, что в СЖК мы наблюдали присутствие ЭПК (2.5 %) и ДГК (2.3 %), что можно объяснить специфическим гидролизом ФЛ липолитическими ферментами [46].

3.3 Масс-спектрометрический анализ 1-О-алкил-глицеринов

Ранее, для анализа АГ использовали метод масс-спектрометрии высокого разрешения [147] или метод ГЖХ с пламенно-ионизационным [145] и масс-спектрометрическим детектором [46] с предварительной подготовкой образца,

для которого необходимо выделение АГ и получение их производных. Мы разработали метод быстрой идентификации АГ без предварительного выделения и получения производных АГ с использованием тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом (ЭУ) в режиме прямого ввода образца в ионный источник.

3.3.1 Масс-спектрометрия стандартного образца

Для выбора условий идентификации АГ методом ГЖХ-МС использовали батилловый спирт. Для предотвращения деградации молекул при воздействии высоких температур использовали баллистический нагрев [188]. На рисунке 8, А показан масс-спектр батилового спирта, полученный нами при прямом вводе образца в стандартных условиях (ЭУ, энергия ионизации (ЭИ) 70 eV, температура ионного источника 200 °С).

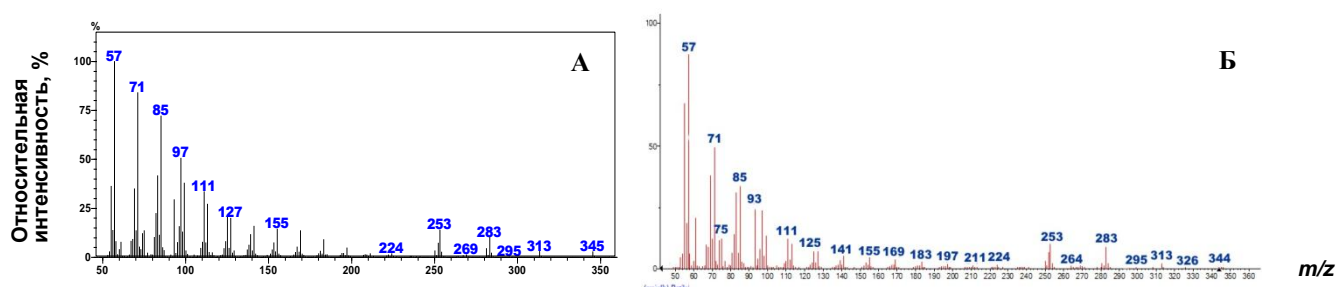


Рисунок 8 – Масс-спектры батилового спирта, полученные (А) в эксперименте (температура ионного источника 200 °С, энергии ионизации 70 eV) и (Б) из библиотеки NIST

Для соединений, подобных батилловому спирту, в стандартных условиях ЭУ характерна низкая относительная интенсивность молекулярного иона M^+ . Масс-спектр батилового спирта из библиотеки NIST содержит сигнал молекулярного иона M^+ с m/z 344 (рис. 8, Б). В полученном нами масс-спектре батилового спирта наблюдали сигналы ионов с m/z 344 и 345 (рис. 8, А) с относительной интенсивностью 0.1 и 7.0 % соответственно, т.е. ион с m/z 345 не является изотопным от иона с m/z 344. Можно предположить, что в условиях прямого ввода батилловый спирт образует квазимолекулярный ион $[M+H]^+$.



Рисунок 9 – Масс-спектр батилового спирта при температуре ионного источника 200 °С и энергии ионизации 20 eV

С целью повысить относительную интенсивность M^+ мы провели анализ при ЭИ 20 eV (рис. 9). При этих условиях относительная интенсивность сигнала M^+ не возросла, но относительная интенсивность сигнала ионов с m/z 345 заметно увеличилась. Образование квазимолекулярных ионов в условиях ЭУ при прямом вводе образца в ионный источник (ионизация «в пучке») было показано ранее для различных нелетучих соединений, в том числе ФХ [188, 189, 190]. Авторы отмечают, что масс-спектры, полученные таким образом, сочетают два режима фрагментации. Один режим вызван непосредственно ЭУ, а второй режим приводит к образованию квазимолекулярного иона $[M+H]^+$ и похож на химическую ионизацию [189].

Образование иона $[M+H]^+$ зависит от значения ЭИ, конфигурации и температуры ионного источника [189]. Поэтому было проведено исследование влияния ЭИ и температуры ионного источника на относительную интенсивность квазимолекулярных ионов с m/z 345 и некоторых выбранных ионов с m/z 71, 93, 313 (рис. 10). Максимальная относительная интенсивность ионов с m/z 345 наблюдалась при снижении ЭИ до 11 eV и температуры ионного источника до 140 °С.

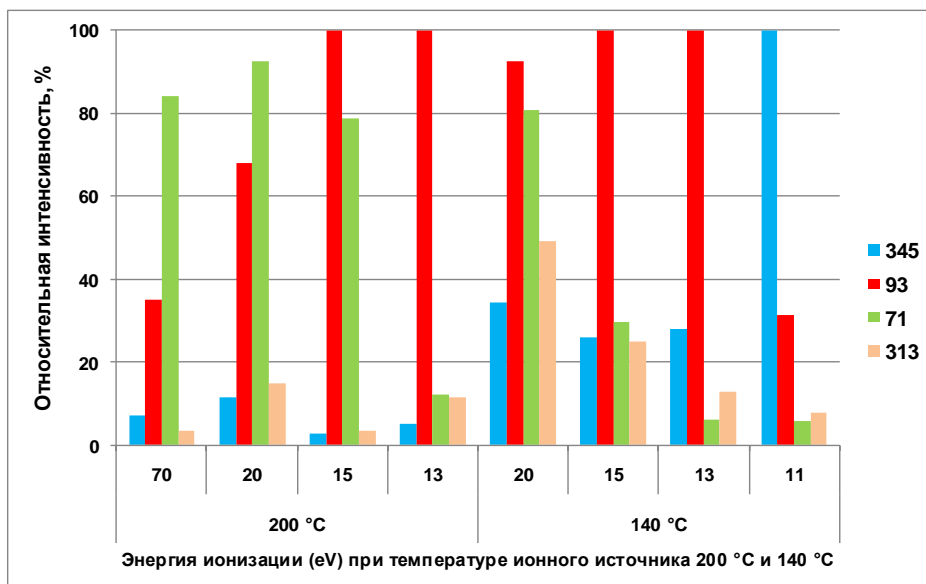


Рисунок 10 – Зависимость относительной интенсивности ионов с m/z 71, 93, 313 и 345 в масс-спектре батилового спирта от величины энергии ионизации и температуры ионного источника

Изменение относительной интенсивности ионов из области низких масс с m/z 71 и 93 было неоднозначно. При температуре ионного источника 200 °C и ЭИ 70, 20 eV высокую относительную интенсивность наблюдали у ионов с m/z 71, при других значениях тестируемых параметров основными были ионы с m/z 93. Возможным объяснением увеличения интенсивности ионов с m/z 93 может быть составной механизм ионизации [189].

Для установления путей фрагментации квазимолекулярного иона батилового спирта была использована тандемная масс-спектрометрия в режиме сканирования дочерних ионов по родительским ионам с m/z 345. Как видно из спектра (рис. 11, А), при распаде ионов с m/z 345 образуются интенсивные ионы с m/z 75 и 93. Ионы с m/z 75 образуются из ионов с m/z 93 в результате элиминирования воды. Анализ в режиме сканирования родительских ионов по дочернему иону с m/z 93 (рис. 11, Б) показал, что основными предшественниками ионов с m/z 93, являются ионы с m/z 345.

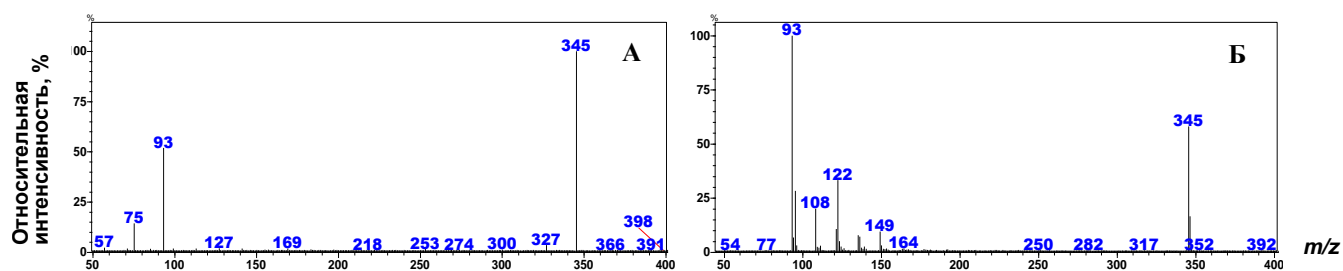


Рисунок 11 – Тандемная масс-спектрометрия (А - режим сканирования дочерних ионов по родительскому иону с m/z 345; Б - режим сканирования родительских ионов по дочерним ионам с m/z 93)

Химировый спирт ($M=316$ г/моль) в таких же условиях (ЭИ 11 eV, температура ионного источника 140 °С, энергия в ячейки соударений 1 eV) (рис. 12) показал аналогичную фрагментацию (рис. 10, А). При анализе смеси химилового и батилового спиртов режим сканирования родительских ионов по дочерним ионам с m/z 93 позволил обнаружить интенсивные квазимолекулярные ионы химилового и батилового спиртов (рис. 13).

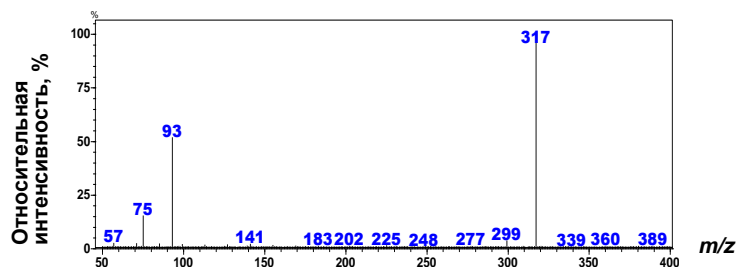


Рисунок 12 – Масс-спектр химилового спирта, записанный в режиме сканирования дочерних ионов по родительским ионам с m/z 317

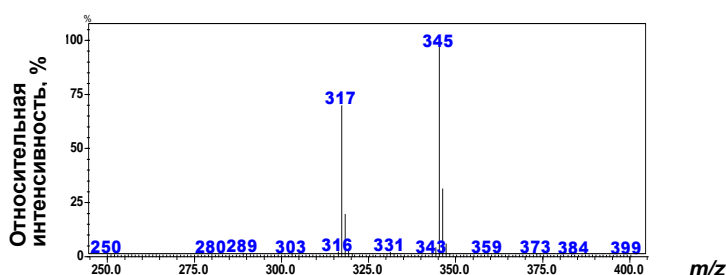


Рисунок 13 – Масс-спектр смеси химилового и батилового спиртов, записанный в режиме сканирования родительских ионов по дочерним ионам с m/z 93

На основании результатов фрагментации квазимолекулярных ионов химилового и батилового спиртов мы предложили новую методику масс-спектрометрического анализа с использованием дочерних ионов с m/z 93 для быстрой идентификации состава АГ из природных источников. Для проведения анализа были выбраны следующие условия: прямой ввод образца в источник, температура которого составила 140 °С, ЭИ 11 eV, скорость нагрева штока 250 °С/мин, энергия в ячейке соударений 10 eV.

3.3.2 Масс-спектрометрический анализ 1-О-алкил-глицеринов из морских организмов и синтетического октил-глицерина

Предложенную методику использовали для анализа синтетического ОГ (C8:0) и двух образцов природных АГ, полученных из липидов пищеварительной железы кальмара *B. magister* и внутренних органов морской звезды *A. amurensis*. Масс-спектры этих объектов, записанные в условиях режима сканирования родительских ионов по дочернему иону с m/z 93, представлены на рисунке 14.

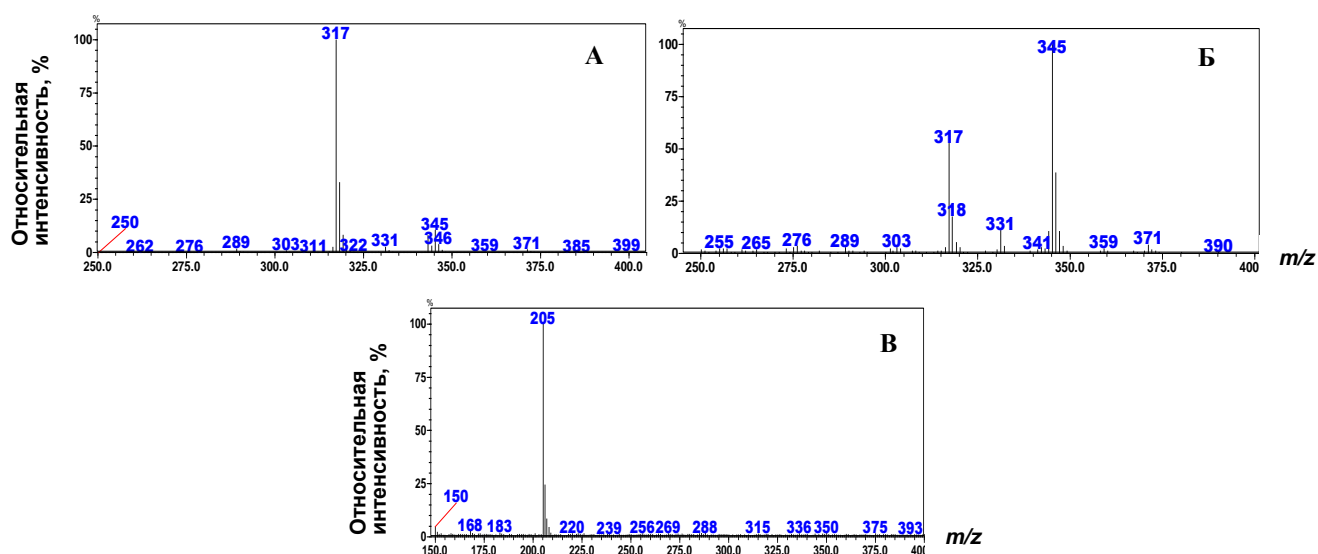


Рисунок 14 – Масс-спектры АГ из липидов *B. magister* (А), *A. amurensis* (Б) и синтетического ОГ (В), записанные в режиме сканирования родительских ионов по дочерним ионам с m/z 93

Химилловый спирт был основным компонентом в АГ из липидов кальмара (рис. 14, А). В липидах морской звезды основными АГ были химилловый и

батыловый спирты (рис. 14, Б). В масс-спектре родительских ионов ОГ ($M=204$ г/моль) присутствовал интенсивный квазимолекулярный ион с m/z 205 (рис. 14, В). В масс-спектрах АГ из исследованных морских организмов наблюдали и другие компоненты. Ионы с m/z 289, 303, 331, 343, 359, 371 и 399 представляют собой квазимолекулярные ионы АГ с длиной цепи C14:0, C15:0, C17:0, C18:1, C19:0, C20:1 и C22:1 соответственно. Эти данные подтверждаются анализом ГЖХ-МС (табл. 7).

Предложенная методика позволяет определить качественный состав смесей АГ, полученных из различных источников, и идентифицировать все компоненты. Однако метод не позволяет определить наличие изомеров по положению двойной связи в алкильном фрагменте и разветвлений в цепи. Преимуществом разработанной методики является быстрое определение всего спектра АГ без предварительной очистки образца от сопутствующих липидов.

Масс-спектрометрический анализ липидов без предварительного хроматографического разделения («shotgun MS») получил широкое распространение [191]. Особенности такого подхода являются использование мягких режимов ионизации, тандемной масс-спектрометрии (режимы сканирования родительских ионов по дочернему иону или элиминирования нейтральных частиц) и масс-спектрометрии высокого разрешения [191]. Предложенная нами методика демонстрирует возможность идентификации набора АГ в природных объектах методом тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения при ионизации ЭУ без предварительного хроматографического разделения.

3.4 Противогрибковые свойства 1-О-алкил-глицеринов

На настоящий момент высокая заболеваемость распространенными грибковыми инфекциями – микозами различных нозологических форм, а также повышение резистентности микроорганизмов к антимикотикам ставит перед фармакологией задачу поиска новых противогрибковых препаратов [192]. Перспективным решением данной проблемы может стать комбинированная

терапия и поиск веществ, способных усиливать действие известных антимикотиков.

Изучение влияния АГ на рост дрожжеподобных грибов было проведено на 38 клинических штаммах грибов рода *Candida* (*Candida* spp. (25 штаммов), *C. albicans* (8 штаммов), *C. tropicalis* (5 штаммов)), среди которых 21 штамм - чувствительные к противогрибковым препаратам, 17 штаммов – резистентные.

Проведенное исследование показало, что комбинации противогрибковых препаратов (АМВ и КОТ) и АГ, АМВ+АГ и КОТ+АГ, проявляли ингибирующую активность в отношении как чувствительных, так и резистентных штаммов. Как видно из таблицы 10, АГ совместно с антимикотиками проявляют большую ингибирующую активность по сравнению с активностью только противогрибкового препарата в отношении всех штаммов. Для комбинаций препаратов не наблюдалось зависимости ингибирующего действия на дрожжеподобные грибы от концентрации АГ, исключением был чувствительный к КОТ штамм *C. tropicalis*.

Таблица 10 – Противогрибковая активность комбинаций АМВ+АГ и КОТ+АГ в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*

Вид	АМВ+АГ					КОТ+АГ				
	Число штаммов	Диаметр зоны подавления роста, мм (среднее значение)				Число штаммов	Диаметр зоны подавления роста, мм (среднее значение)			
		АМВ	АМВ+АГ, мкг				КОТ	КОТ+АГ, мкг		
			40+20	40+40	40+80			10+5	10+10	10+20
Чувствительные штаммы										
<i>Candida</i> spp.	8	17	22	22	22	8	15	20	21	21
<i>Candida albicans</i>	1	14	23	25	25	2	13	19	20	20
<i>Candida tropicalis</i>	2	15	20	20	20	1	14	16	20	22
Резистентные штаммы										
<i>Candida</i> spp.	2	12	17	17	17	7	9	15	17	18
<i>Candida albicans</i>	2	11	17	16	17	2	11	15	17	18
<i>Candida tropicalis</i>	1	11	19	20	20	1	10	19	19	19

Наибольшую фунгицидную активность комбинация АМВ+АГ проявила на чувствительные к антимикотикам штаммы *Candida* spp. (8 штаммов), *C. albicans* (1 штамм) и *C. tropicalis* (2 штамма) (табл. 10). Усиление фунгицидной

активности в большей степени наблюдалось при комбинации КОТ+АГ для чувствительных штаммов *C. albicans* (2 штамма).

Рост резистентных штаммов при воздействии комбинаций препаратов АМВ+АГ и КОТ+АГ подавлялся во всем диапазоне концентраций АГ (рис. 15). Наибольшее усиление ингибирующей активности наблюдалось при комбинациях АМВ+АГ и КОТ+АГ в отношении резистентного штамма *C. tropicalis* (табл. 10).

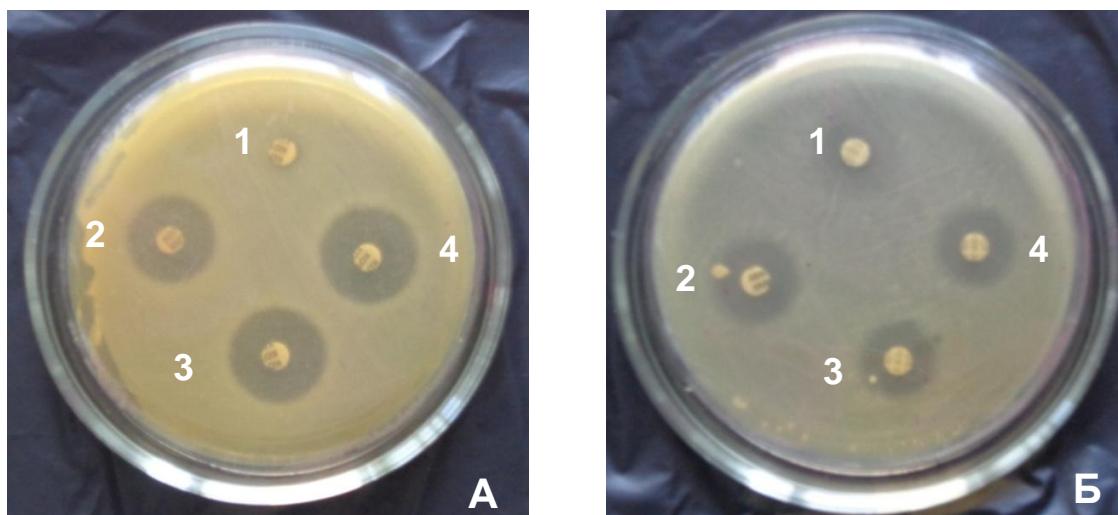


Фото А: 1 – КОТ (10 мкг), 2 – КОТ+АГ (10+5 мкг), 3 – КОТ+АГ (10+10 мкг), КОТ+АГ (10+20 мкг);
Фото Б: 1 – АМВ (40 мкг), 2 – АМВ+АГ (40+20 мкг), 3 – АМВ+АГ (40+40 мкг), 4 – АМВ+АГ (40+80 мкг)

Рисунок 15 – Ингибирующая активность АГ и КОТ (фото А), АГ и АМВ (фото Б) в отношении резистентных штаммов грибов рода *Candida spp*

Поскольку в отношении резистентных к противогрибковым препаратам штаммов комбинации АМВ+АГ и КОТ+АГ проявляли ингибирующее действие, было проведено исследование ингибирующей активности моноформы АГ. Использование метода двукратных последовательный разбавлений минимальной ингибирующей концентрации показало, что АГ подавляют рост смеси штаммов *Candida spp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis* при минимальной концентрации 1.56 мкг/мл.

Возможным объяснением усиления активности при действии комбинаций антимикотиков и исследуемого препарата является способность АГ изменять активность мембран-связанных протеолитических ферментов у простейших грибов. В исследовании [88] было установлено, что синтетический АГ

стимулирует активность пептидогликангидролазы (мурамидазы), фермента, разрушающего клеточную стенку, а также подавляет синтез пептидогликанов [194]. Разрушая клеточную стенку, АГ способствует проникновению противогрибковых препаратов в клетку. В работе [128] описан наиболее вероятный механизм действия АГ, который заключается в подавлении биосинтеза липотейхоевых кислот. АГ способствуют накоплению фосфатидной и лизофосфатидной кислот, которые блокируют дальнейшие стадии биосинтеза липотейхоевых кислот, тем самым усиливают активность мурамидазы.

Полученные результаты позволяют сделать вывод об усилении АГ действия противогрибковых препаратов (АМВ и КОТ), как для чувствительных, так и для резистентных к противогрибковым препаратам штаммов дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Кроме того, АГ способны самостоятельно ингибировать рост грибов, что обладает большой практической значимостью ввиду увеличения количества резистентных к противогрибковым препаратам штаммов грибов рода *Candida* и вызванных ими микозов.

3.5 Противоопухолевая активность 1-О-алкил-глицеринов

3.5.1 Цитотоксичность

Определение цитотоксичности природных АГ (содержание химилового спирта 93.7 %) и синтетического ОГ на клетках меланомы человека проводили с использованием MTS-реагента. Природные АГ в концентрации до 20 мкМ *in vitro* были не токсичны по отношению к клеткам SK-Mel-5, SK-Mel-28 и RPMI-7951. ОГ не проявил токсичности к клеткам SK-Mel-5, SK-Mel-28 в концентрациях до 20 мкМ, но проявил умеренную цитотоксичность по отношению к клеткам RPMI-7951 с IC_{50} равной 13 мкМ, что сопоставимо с цитотоксической активностью C16:0 АГ по отношению к клеткам карциномы Льюиса, привитой мышам [194].

3.5.2 Пролиферация

Одним из основных факторов риска развития клеток рака является неконтролируемая пролиферация клеток, связанная с нарушениями в функционировании bFGF, основного фактора роста фибробластов. Как было

показано в работе [104], суммарные АГ, выделенные из печени акулы *Centrophorus squamosus*, подавляют стимулирующее действие bFGF на пролиферацию эндотелиальных клеток.

Мы провели исследование влияния химилового спирта и ОГ на пролиферацию трех штаммов меланомы. Действие природных АГ и ОГ на пролиферацию опухолевых клеток было различным. Оба препарата незначительно влияли на пролиферацию клеток SK-Mel-5, SK-Mel-28 через 72 ч инкубации в максимальной (20 мкМ) концентрации (рис. 16, А, 16, Б). Клетки меланомы RPMI-7951 были более чувствительны на действие исследуемых препаратов и показали снижение пролиферации при 20 мкМ для природных АГ на 28.8 % и ОГ на 39.7 % по сравнению с контролем (рис. 16, В).

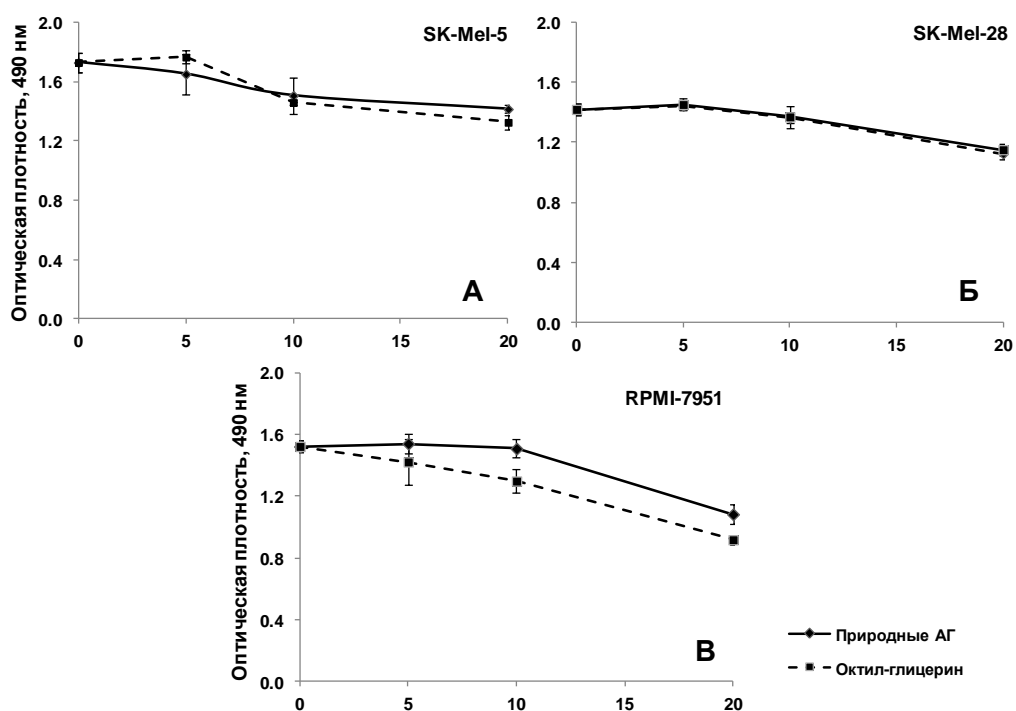


Рисунок 16 – Изменение пролиферации опухолевых клеток (А – SK-Mel-5, Б – SK-Mel-28, В – RPMI-7951) под действием природных АГ и синтетического ОГ

3.5.3 Неопластическая трансформация клеток

Поскольку ОГ и природные АГ показали более высокую степень ингибирования пролиферации клеток линии RPMI-7951, было проведено исследование по влиянию АГ на формирование и рост колоний опухолевых

клеток с использованием метода мягких агаров [195]. Клетки обрабатывали ОГ и выделенными из липидов пищеварительной железы кальмара АГ в концентрациях 5, 10 и 20 мкМ и инкубировали в течение четырех недель. Оба препарата ингибировали образование и рост колоний клеток RPMI-7951 (рис. 17). В концентрациях 5 мкМ и 10 мкМ ОГ ингибировал образование колоний на 16 % и 41 % соответственно, АГ при тех же концентрациях снижал уровень образования и роста колоний на 34 % и 49 %. При концентрациях 20 мкМ оба препарата почти полностью останавливали образование колоний (рис. 17).

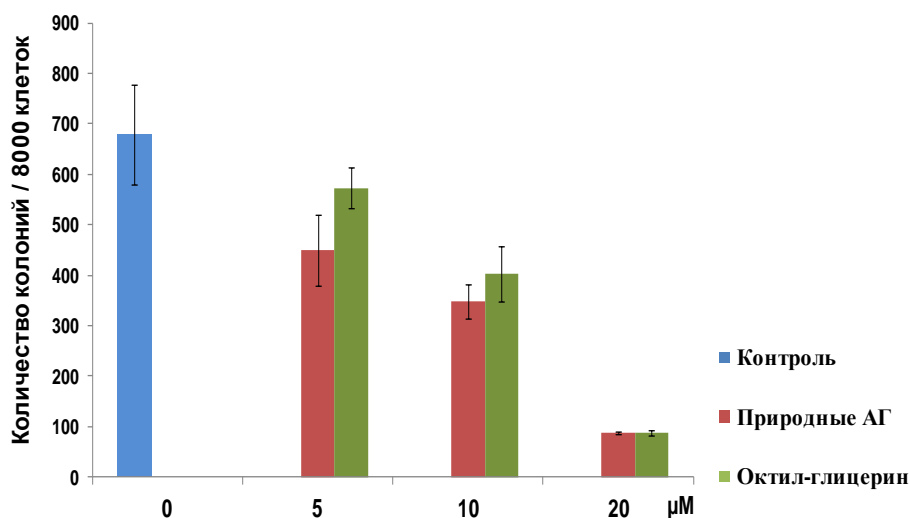


Рисунок 17 – Ингибирование пролиферации колоний клеток RPMI-7951 под действием природных АГ и синтетического ОГ

Ранее было показано, что нетоксичные АГ могут быть перспективными противоопухолевыми соединениями в условиях *in vitro* и *in vivo* против широкого спектра раковых заболеваний [103, 182].

Противоопухолевые свойства АГ в клетке могут быть реализованы по двум основным механизмам. Сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK в клетках меланомы определяет их пролиферацию, дифференциацию и апоптоз [105]. Одним из наиболее важных звеньев в этом сигнальном пути являются изоформы ПКС, которые могут селективно активироваться эндогенными ДАГ [196]. При увеличении экспрессии ПКС происходит активация различных стадий сигнального пути, прежде всего за счет гиперфосфорилирования белков RAS и RAF,

что в свою очередь вызывает злокачественные трансформации в клетках. Таким образом, снижение активности ПКС низкомолекулярными ингибиторами может быть эффективным в лечении некоторых видов рака [196]. Одним из предшественников ингибиторов такого рода может быть АГ. Известно, что биосинтез 1-*O*-алкил-2-ацилглицеринов, структурных аналогов ДАГ, проходит в эндоплазматическом ретикулуме клетки, и они являются конкурентными ингибиторами семейства ПКС [91].

Ангиогенез опухоли - процесс образования новых кровеносных сосудов, являющийся важным шагом в росте опухоли и распространения метастаз, контролируется основным фактором роста фибробластов bFGF [104]. Сигнальный каскад с участием рецепторов bFGF также включает образование таких вторичных мессенджеров, как фосфатидная кислота и ДАГ, которые, как и в каскаде RAS/RAF/MEK/ERK, активируют ПКС [105]. Исследование по влиянию природных АГ на эндотелиальную клеточную пролиферацию, стимулированную bFGF, показали, что АГ значительно снижали стимулирующий эффект bFGF [104].

Полученные данные показывают, что липиды с простой эфирной связью мало токсичны (до 20 мкм) по отношению к клеткам меланомы человека SK-Mel-5, SK-Mel-28, однако проявляют умеренную цитотоксичность и угнетают пролиферацию клеток меланомы линии RPMI-7951. Как известно, клетки меланомы устойчивы ко многим противораковым препаратам, поэтому использование АГ может быть полезным при создании новых композиций.

3.6 Включение 1-*O*-алкил-глицеринов и *n*-3 полиненасыщенных жирных кислот в липиды печени крыс

Снижение уровней плазмалогенов в различных органах и тканях, как показано в работе [197], зависит от возраста экспериментальных крыс. Аналогичная зависимость наблюдается и у человека. С увеличением возраста происходит снижение активности пероксисомных ферментов каскада биосинтеза плазмалогенов и ДГК, что вызывает снижение уровней этих важнейших

метаболизм в нервных тканях у пожилых людей. Такие изменения особенно характерны для пациентов с признаками болезни Альцгеймера [117, 169].

Одним из перспективных в настоящее время методов купирования негативных последствий нарушений в каскаде биосинтеза плазмалогенов является плазмалоген-замещающая терапия, при которой в диету пациента вводятся или сами плазмалогены или их критические предшественники, к которым относятся АГ [16]. В эксперименте на возрастных крысах мы смоделировали курс плазмалоген-замещающей терапии. Животным в диету вводили природные АГ с добавлением 20 % концентрата этиловых эфиров ДГК и по изменению соотношения 16:0ДМА/16:0МЭЖК определяли эффективность такого подхода.

Изменение уровня плазмалогенов по соотношению 16:0ДМА/16:0МЭЖК при введении в диету АГ, АГ+ПНЖК или только ПНЖК показано в таблице 11. В группах АГ и АГ+ПНЖК наблюдается статистически достоверное увеличение соотношения 16:0ДМА/16:0МЭЖК, что является доказательством включения в биосинтез плазмалогенов хмиллового спирта (С16:0). Таким образом, очевидно, что введение с диетой хмиллового спирта способствует биосинтезу плазмалогенов без участия пероксисом. Наши данные согласуются с полученными ранее результатами по включению батилового спирта в плазмалогены тканей мышечной с мутацией гена, кодирующего фактор биогенеза пероксисом *Pex 7* [168].

Таблица 11 – Состав некоторых ЖК и ДМА в общих липидах печени крыс, получавших интрагастрально АГ, АГ и ПНЖК или ПНЖК

ЖК, ДМА	Контроль, n=3	АГ, n=5	АГ+ПНЖК, n=7	ПНЖК, n=5
16:0ДМА	0.17±0.01 ¹	0.30±0.04*	0.29±0.04*	0.25±0.03
16:0	23.60±1.13	22.06±0.64	23.11±1.19	21.02±1.45
18:0ДМА	0.17±0.01	0.24±0.04	0.22±0.03	0.30±0.12
18:0	14.56±1.60	18.37±0.81	17.07±1.11	18.01±1.00
22:6n-3	3.86±0.51	4.35±0.23	5.35±0.35*	5.77±0.40*
16:0ДМА/16:0МЭЖК ²	0.72±0.05	1.41±0.11*	1.38±0.11*	1.12±0.50
18:0ДМА/18:0МЭЖК	1.20±0.07	1.31±0.06	1.29±0.12	1.37±0.03
16:0ДМА/18:0ДМА	0.98±0.05	1.28±0.16	1.33±0.10	0.89±0.10

¹ % от суммы всех компонентов ± стандартное отклонение; ² соотношение (ДМА/МЭЖК) × 100.

* $p < 0.05$ – статистическая значимость различий относительно контрольной группы и групп животных, получавших АГ, АГ + ПНЖК, ПНЖК. N – 20 крыс.

В группах, получавших концентрат n-3 ПНЖК, происходило увеличение содержания ДГК в липидах печени. Известно, что синтез ДГК, как и образование простой эфирной связи, происходит в пероксисомах [198], и после транспорта в эндоплазматический ретикулум ДГК встраивается в основном в плазменил-ФЭ [16, 199].

Таким образом, полученные результаты показывают, что введение в диету пищевых добавок, включающих АГ и ДГК, может компенсировать недостаток плазмалогенов и ДГК в организме. Ранее было предложено несколько препаратов, отвечающих этим требованиям: это полусинтетические плазмалогены [125] или их предшественники [200]. Однако многостадийность процессов получения и относительно невысокий выход конечных продуктов определяет высокую стоимость таких препаратов. Полученные нами результаты показывают, что введение в диету природных АГ и этиловых эфиров концентрата ПНЖК позволяет использовать возможности эндоплазматического ретикулума для биосинтеза плазмалогенов.

3.7 Выделение 1-О-алкил-глицеринов и n-3 полиненасыщенных жирных кислот

При разработке метода выделения АГ из жира пищеварительной железы кальмара мы исходили из наших данных (табл. 8, 9), где показано, что помимо АДАГ в липидах присутствуют n-3 ПНЖК. Анализ литературных данных показал, что одним из наиболее эффективных методов является кристаллизация АГ из органических растворителей [135]. Однако при этом не использовались остающиеся в липидах ПНЖК. Поэтому одной из основных задач этого этапа – разработать способ комплексной переработки жира кальмара с получением чистых АГ и основных n-3 ПНЖК – ЭПК и ДГК.

3.7.1 Щелочной гидролиз липидов пищеварительной железы кальмара

Щелочное омыление или гидролиз исходного жира кальмара является необходимой стадией, позволяющей получить соли ЖК и неомыляемые липиды (стерины и АГ). Экстракция неомыляемых соединений из реакционной смеси является важной стадией при выделении АГ. В работе [135] отделение

неомыляемых липидов проводили экстракцией диэтиловым эфиром. Однако использование диэтилового эфира допустимо только в ограниченных масштабах, вследствие опасности работы при масштабировании процесса.

При экстракции диэтиловым эфиром и некоторыми другими органическими растворителями из гидролизованной смеси липидов образуются очень стойкие эмульсии. Это существенно затрудняет процесс экстракции и не позволяет количественно отделить неомыляемые соединения. В работе [145] смесь липидов после гидролиза, содержащую СЖК, переводили в метиловые эфиры. Далее авторы разделяли смесь метиловых эфиров ЖК, стерина и АГ колоночной хроматографией на силикагеле. Однако применение колоночной хроматографии является лимитирующей стадией и возможно только для получения препаративных количеств АГ. В нашей работе непосредственно после гидролиза соли ЖК переводили подкислением в СЖК. Таким образом, была получена смесь липидов, содержащая СЖК (74.5 %), стерина (6.4 %) и АГ (19.1 %).

3.7.2 Кристаллизация 1-О-алкил-глицеринов из ацетона

Выбор рабочих растворителей в технологических процессах, особенно в пищевой промышленности, является важнейшей задачей. При выборе растворителя мы исходили из следующих соображений:

1. Растворители должны быть разрешены для использования в пищевой и фармацевтической промышленности [201];
2. Растворители должны быть в максимальной степени взрыво- и пожаробезопасны;
3. Растворители должны легко отгоняться под вакуумом при умеренных (не более 45 °С) температурах.
4. СЖК и АГ должны хорошо растворяться при температурах не выше 25 °С.

Выше перечисленным условиям в полной мере удовлетворяли только ацетон и этанол, и поэтому мы остановили свой выбор на этих растворителях. Кроме того, 95 % водные ацетон и этанол хорошо растворяют мочевины, используемую в следующей стадии процесса при фракционировании ПНЖК. Учитывая более низкую температуру кипения (56.2 °С) по сравнению с этанолом

(78.3 °С) и лучшую растворимость СЖК, для низкотемпературной кристаллизации был выбран ацетон.

Кристаллизация при пониженных температурах из органических растворителей является наиболее простым способом выделения насыщенных ЖК. При этом диапазон температур процесса может изменяться в зависимости от состава ЖК в очень широких пределах. Такой подход используется для предварительного обогащения ПНЖК [129].

В липидах пищеварительной железы кальмара насыщенные ЖК не являются доминирующими, в то время как АГ содержали 85 % насыщенных алкильных фрагментов. Поэтому логичным было использовать низкотемпературную кристаллизацию как первую стадию отделения основной массы АГ от остальных липидов.

При осаждении СЖК и АГ из растворителей степень осаждения насыщенных компонентов определяют соотношение липиды : растворитель, температура и время кристаллизации. Установлено, что оптимальным соотношением СЖК+АГ : ацетон являлось соотношение 1:5. В работе [129] рекомендуется для образования более мелких кристаллов насыщенных ЖК использовать температуры менее -20 °С, и время кристаллизации установить не более 10-16 ч при соотношении СЖК : растворитель 1:10. Поскольку основной целью данной процедуры максимально высадить суммарные АГ, были выбраны наиболее рациональные параметры осаждения: температура кристаллизации - 20 °С и время кристаллизации 24 ч. При таких условиях часть насыщенных СЖК и все насыщенные АГ выпали в осадок (табл. 12, 13). В фильтрате концентрировались ПНЖК и, частично, насыщенные и мононенасыщенные СЖК. Эта стадия позволила нам повысить концентрацию АГ с 19 % до 61 %.

Таблица 12 – Состав основных ЖК в фильтрате и осадке, полученных в результате низкотемпературной кристаллизации из ацетона (Условия: -20 °С, 24 ч)

ЖК	Исходные ЖК	Фильтрат 1	Осадок 1
14:0	2.44	2.87	4.24
16:0	9.37	5.49	58.34
16:1n-7	6.08	4.48	4.08
Фитановая	2.25	1.9	н.о.
18:0	3.52	0.82	8.77
Σ18:1	25.06	30.85	10.49
Σ20:1	14.52	16.96	5.62
20:5n-3	7.51	7.79	1.62
Σ22:1	11.22	14.58	2.38
22:6n-3	5.96	6.49	н.о.
ΣНЖК	18.43	11.67	72.09
ΣМНЖК	61.6	67.79	23.64
ΣПНЖК	19.97	20.54	4.27

н.о. – не обнаружено

Таблица 13 – Состав АГ фильтрата и осадка, полученных в результате низкотемпературной кристаллизации из ацетона

АГ	Исходные	Условия низкотемпературной кристаллизации			
		-20 °С, 24 ч		1 °С, 24 ч	
		Осадок 1	Фильтрат 1	Осадок 2	Фильтрат 2
C14:0	1.21 ¹	2.03	1.93	1.04	3.23
C15:0	0.33	0.60	сл.	0.22	0.42
C16:1	0.62	н.о.	3.42	н.о.	н.о.
C16:0	73.52	86.80	6.39	94.43	71.72
C17:0	0.5	0.48	0.16	0.47	н.о.
ΣC18:1	14.06	5.81	74.5	н.о.	21.00
C18:0	5.62	4.28	сл.	3.84	3.13
ΣC20:1	2.18	н.о.	11.82	н.о.	н.о.
ΣC22:1	0.49	н.о.	1.47	н.о.	н.о.
Σ разв. ²	1.47	0.48	0.31	н.о.	0.50
Σ нас.	82.65	94.19	8.79	100	79.00
Σ мононенас.	17.35	5.81	91.21	-	21.00

¹ мол. % от суммы всех компонентов; ² разветвленные – 17:0i, 17:ai, 18:0i;

разв. – разветвленные алкильные фрагменты, нас. – насыщенные алкильные фрагменты, мононенас. – мононенасыщенные алкильные фрагменты, сл. – следовые количества (менее 0.1 %), н.о. – не обнаружено

Как видно из таблиц 12 и 13, в осадке 1 после первой кристаллизации сконцентрировалась большая часть хмиллового спирта вместе с насыщенными и мононенасыщенными СЖК. При этом все мононенасыщенные АГ остались в фильтрате. Проведение повторной кристаллизации осадка 1 при таком же

соотношении липиды : ацетон, но при температуре 1 °С в течении суток позволило полностью удалить НЖК и МНЖК. В результате был получен осадок 2, состоящий в основном из хмиллового спирта (94.4 %) и других насыщенных АГ (табл. 13). Содержание суммарных насыщенных АГ в продукте составляло >99 % при выходе продукта более 60 % (табл. 14).

Таблица 14 – Состав липидов в фильтратах и осадках, полученных кристаллизацией в ацетоне при различных температурах

Липиды	Исходное содержание, %	Ацетон : гидролизованные липиды 5:1			
		-20 °С, 24 ч		1 °С, 24 ч	
		Осадок 1	Фильтрат1	Осадок 2	Фильтрат 2
СЖК	74.51±0.91 ¹	37.40±1.89	88.33±3.21	0.78±0.25	82.51±0.89
Стерины	6.35±0.55	1.40±0.84	4.32±1.52	н.о.	2.30±0.65
АГ	19.14±0.51	61.20±2.54	7.35±2.47	99.22±0.48	15.19±1.25

¹ среднее значение ± стандартное отклонение (n=3); н.о. – не обнаружено

3.7.3 Выделение эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот из смеси свободных жирных кислот после отделения 1-О-алкил-глицеринов

После щелочного гидролиза и выделения АГ содержание n-3 ПНЖК в остатке составило ЭПК – 7.8 % и ДГК – 6.5 % (табл. 12). Такие показатели липидного состава характерны для малоценных жиров, не пригодных для прямого использования в качестве пищевых добавок. Для возможного использования их в качестве препаратов n-3 ПНЖК необходимо удалить стерины и существенно повысить концентрацию ЭПК и ДГК. Низкотемпературная кристаллизация в ацетоне при температуре -20 °С не позволила поднять концентрацию ПНЖК до приемлемых значений, поскольку основными кислотами в липидах пищеварительной железы кальмара были МНЖК – 61.6 % (табл. 12). В результате осаждения в ацетоне уменьшилось содержание НЖК с 18.4 % до 11.7 %, но увеличилось содержание МНЖК до 67.8 % (табл. 12).

3.7.3.1 Фракционирование жирных кислот с мочевиной

Для получения концентратов с необходимым составом ПНЖК необходимо учитывать главные факторы, определяющие эффективность процесса осаждения СЖК с мочевиной – соотношение мочевины : растворитель и мочевины : ЖК,

время и температура кристаллизации. Анализ литературных источников, в которых использовался метод кристаллизации с мочевиной, показал, что оптимизация этих параметров лежит в основе концентрирования ПНЖК [129, 142, 202]. При подборе условий процесса осаждения СЖК из мочевины мы использовали основные параметры – соотношение мочевины : ЖК, время и температуру кристаллизации, рассчитанные по методу предложенному ранее [203]. Метод позволяет по известным концентрациям исходных СЖК рассчитать соотношение мочевины : ЖК и время, требуемое для оптимального связывания НЖК и МНЖК и максимальной степени обогащения ЭПК и ДГК. Поскольку в полученной после отделения АГ смеси СЖК основными были МНЖК (67.8 %), мы выбрали соотношение мочевины : ЖК - 3:1 г/г на основании работы [203]. Оптимальную температуру, как и растворитель, подбирали экспериментально (табл. 15).

Мочевина ограниченно растворима в некоторых органических растворителях, ее растворимость повышают добавлением определенной доли воды. Из разрешенных по СанПиН 2.3.2.1293 растворителей [201], мы выбрали этанол, изопропанол и ацетон. Безводные спирты хорошо растворяли ЖК, но практически не растворяли мочевины при комнатной температуре и для достижения требуемого соотношения оптимального соотношения мочевины : ЖК необходимо было брать очень большой объем растворителя. Добавление 5 % воды значительно повысило растворимость мочевины и снизило объемы используемых растворителей.

Сравнение влияния растворителей на степень концентрирования ЭПК и ДГК показало, что при одинаковых условиях (температура, время и соотношение мочевины : ЖК) 95 % этанол с мочевиной был наиболее эффективным. Степень обогащения по сравнению с исходной смесью при температуре 0 °С составила в этаноле для ЭПК 4, для ДГК 3.1 при общем выходе ПНЖК 82.1 %. В изопропанол и, в особенности в ацетоне, резко падал общий выход целевого продукта – суммарных ПНЖК.

Температурный режим кристаллизации определяет скорость образования кристаллов мочевины и эффективность включения в них жирных кислот. Диапазон температур, который встречается в литературе, достаточно большой, зависит от состава исходных ЖК и находится в пределах от +25 °С до -25 °С [150]. При температурах выше 0 °С аддукты с мочевиной в основном образуют НЖК, при отрицательных температурах осаждаются как НЖК, так и МНЖК. Как видно из таблицы 15, образовавшиеся аддукты в 95 % этаноле включали в себя большую часть НЖК и МНЖК.

Таблица 15 – Содержание основных ЖК в фильтратах и осадках, полученных при кристаллизации ЖК с мочевиной в различных растворителях и температурах (ЖК : мочевина 1:3, время кристаллизации 3 ч)

Жирные кислоты	Исходные	Этанол				Изопропанол				Ацетон	
		0 °С		-20 °С		0 °С		-20 °С		0 °С	
		Ф	О	Ф	О	Ф	О	Ф	О	Ф	О
14:0	2.87	0.75 ¹	3.43	1.06	2.94	0.69	3.39	0.62	3.47	1.23	2.33
16:0	5.49	0.43	7.06	0.44	6.06	0.21	6.63	0.21	6.12	1.73	8.08
16:1n-7	4.48	5.64	4.38	0.78	4.96	5.94	4.66	4.09	5.83	4.31	3.16
Фитановая	1.9	12.04	0.78	13.11	1.22	7.57	0.73	9.67	1.92	3.56	2.31
18:0	0.82	0.13	0.99	0.27	0.89	0.11	1.02	н.о.	0.77	0.20	1.19
Σ18:1	30.85	4.13	38.22	1.53	35.61	16.60	34.61	6.88	35.55	28.97	25.92
Σ20:1	16.96	0.93	21.16	0.56	19.70	1.98	19.51	0.65	16.85	17.07	20.69
20:5n-3	7.79	31.76	1.75	30.78	4.75	26.96	4.16	33.02	6.23	11.31	4.88
Σ22:1	14.58	0.60	16.79	0.38	15.87	0.61	15.93	0.25	12.48	13.51	20.27
22:6n-3	6.49	20.32	2.22	31.24	2.52	18.17	3.59	22.58	4.26	8.55	5.08
ΣНЖК	11.67	15.93	12.75	18.38	11.41	13.21	12.41	12.66	12.38	7.21	13.81
ΣМНЖК	67.79	12.10	80.45	3.86	76.72	25.87	76.42	14.14	72.73	64.71	70.54
ΣПНЖК	20.54	71.97	6.80	77.76	11.87	60.92	11.17	73.20	14.89	28.08	15.65
Выход ЭПК, %		82.1		63.6		62.77		37.19			
Выход ДГК, %		67.7		66.2		55.9		34.8			

¹ указано среднее значение трех экспериментов; Ф – фильтрат; О – осадок; н.о. – не обнаружено

Метод кристаллизации с мочевиной имеет свои ограничения, например, он не позволяет удалять стерины и разветвленную фитановую (3,7,11,15-тетраметилгексадекановую) кислоту. Эти распространенные примеси в морских липидах не образуют аддуктов с мочевиной [141]. При болезнях, связанных с пероксисомальной дисфункцией, фитановая кислота может накапливаться в организме и вызывать симптомы болезни Рефсума [73]. Тем не менее, при

использовании иного сырьевого источника, например жира морских млекопитающих, такой подход для получения концентратов ЭПК и ДГК будет полезен.

3.7.3.2 Йод-лактонизация

Кристаллизация ЖК с мочевиной имеет свои пределы, которые связаны с присутствием в исходных смесях морских ПНЖК как ЭПК, так и ДГК. Поэтому это обстоятельство не позволило получить индивидуальные ЭПК и ДГК и отделить их от балластных кислот. Для решения этой задачи использовали йод-лактонизацию – реакцию образования йод-лактонов из ненасыщенных кислот, имеющих первую двойную связь в $\Delta 4$ или $\Delta 5$ положении.

Реакцию йод-лактонизации проводили согласно [154] с небольшими изменениями. ПНЖК после концентрирования с мочевиной переводили в натриевые соли добавлением раствора NaHCO_3 в 80 % этаноле. К раствору натриевых солей ЖК при интенсивном перемешивании добавляли по каплям 5 % раствор I_2 в этаноле в течение 2 ч. Количество йода рассчитывали из исходного содержания ДГК (ДГК: I_2 – 1:0.95 (моль/моль)). Степень превращения ДГК в соответствующие йод-лактоны определяли ТСХ. Окончание реакции определяли по устойчивому изменению цвета реакционной смеси. Остатки непрореагировавшего йода связывали 2 М раствором тиосульфата натрия. На этой стадии мы получали неполярные γ -ЙЛ-ДГК, которые полностью экстрагировали гексаном, а в водно-этанольной фазе оставались соли непрореагировавшей ЭПК и балластных кислот.

Условия образования δ -ЙЛ-ЭПК из смеси ЖК, оставшейся после выделения γ -ЙЛ-ДГК были аналогичными, за исключением небольшого избытка I_2 (ЭПК/ I_2 , 1:1.2, моль/моль). Избыток йода привел к формированию δ -ЙЛ-ЭПК в течение 3 ч. Экстракцию δ -ЙЛ-ЭПК проводили также гексаном. Выбранные параметры проведения процесса позволили нам полностью исключить стадию колоночной хроматографии для разделения полученных йод-лактонов и очистки от балластных ЖК.

Раскрытие γ -йод-лактона ДГК и δ -йод-лактона ЭПК осуществляли при одинаковых условиях в безводном ацетонитриле при добавлении $\text{Me}_3\text{SiCl/NaI}$. В ряде работ было показано, что раскрытие йод-лактонов происходит с восстановлением исходной конфигурации $\Delta 4$ и $\Delta 5$ двойных связей [155, 159].

Проведенные йод-лактонизации позволили выделить ДГК и ЭПК из концентрата, полученного при комплексообразовании ЖК с мочевиной, с чистотой 95.6 % и 93.0 % соответственно (табл. 16). Остальные ЖК, присутствующие в концентрате после комплексообразования с мочевиной, не образовывали йод-лактоны и отделялись на стадии экстракции йод-лактонов гексаном и отмывке экстракта 2 % раствором Na_2CO_3 в 40 % водном этаноле. Это позволило существенно сократить содержание фитановой кислоты в полученных концентратах.

Таблица 16 – Состав основных ЖК, полученных после йод-лактонизации

Жирные кислоты	Состав, %		
	Исходные ЖК	ЖК после йод-лактонизации	
		Концентрат ЭПК	Концентрат ДГК
14:0	1.06	н.о.	н.о.
16:0	0.44	н.о.	н.о.
16:1n-7	0.78	0.12	1.2
Фитановая	13.11	1.40	н.о.
18:0	0.27	н.о.	н.о.
18:1	0.99	0.17	н.о.
20:1	0.55	н.о.	н.о.
20:5n-3	32.50	93.03	1.66
22:1	0.38	0.13	н.о.
22:5n-3	0.68	н.о.	н.о.
22:6n-3	32.00	0.30	95.63
Σ НЖК	18.31	1.85	н.о.
Σ МНЖК	4.22	0.80	1.31
Σ ПНЖК	77.47	97.35	98.69
Выход ЭПК, %	-	82.60	-
Выход ДГК, %	-	-	74.70

н.о. – не обнаружено

Высокая селективность реакции позволяет проводить извлечение ЭПК и ДГК не только из концентратов ПНЖК, но и из смесей с низким (менее 5 %) содержанием этих кислот. Процесс не требует сложного аппаратного

оформления и дорогостоящих реагентов, что позволяет существенно сократить затраты на производство высокоочищенных ПНЖК. Тем не менее, данный метод не позволил выделить ЭПК и ДГК с чистотой выше 96 %.

3.7.3.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Для получения высокоочищенных ЭПК и ДГК применяли хроматографическое фракционирование двух концентратов ПНЖК, полученных методом йод-лактонизации, в виде этиловых эфиров.

При выборе системы элюирования мы исходили из экономической целесообразности. Для проведения одного цикла выделения 1.0 г ЭПК или ДГК на препаративной колонке Discovery HS C-18, 10 μ m 25 \times 5 см (Supelco, США) необходимо до 3 л растворителя. Мы исключили использование ацетонитрила, тетрагидрофурана и метанола. Регенерация первых двух растворителей сложна и затратна, использование метанола запрещено в пищевой и фармацевтической промышленности. Поэтому в качестве органического растворителя для ВЭЖХ выбрали этанол. Использование изократической системы этанол : вода (80:20, об./об.) обеспечило оптимальное разделение и высокий выход ЭПК (96.3 %) и ДГК (84.2 %) при незначительной стоимости растворителя. Использование других соотношений компонентов подвижной фазы не позволило достичь необходимого качества и времени разделения. ЭЭЖК из этанола хорошо экстрагируются гексаном, который регенерируется простой перегонкой. Изократический режим позволил нам использовать дополнительный детектор (рефрактометр) для детектирования НЖК и МНЖК.

Известно, что некоторые ЖК, несмотря на различия в структурах, обладают одинаковой подвижностью и образуют «критические пары», которые не разделяются на обращено-фазных C-18 сорбентах при ВЭЖХ [204]. На рисунке 18 показаны хроматограмма очистки концентрата ЭПК в форме этиловых эфиров (рис. 18, А) и ГЖХ анализ выделенного пика (рис. 18, Б). Несмотря на низкую концентрацию 16:1n-7 (0.12 %) в исходном концентрате, полученном йод-лактонизацией, фракция этиловых эфиров ЭПК после очистки содержала пальмитолеиновую кислоту.

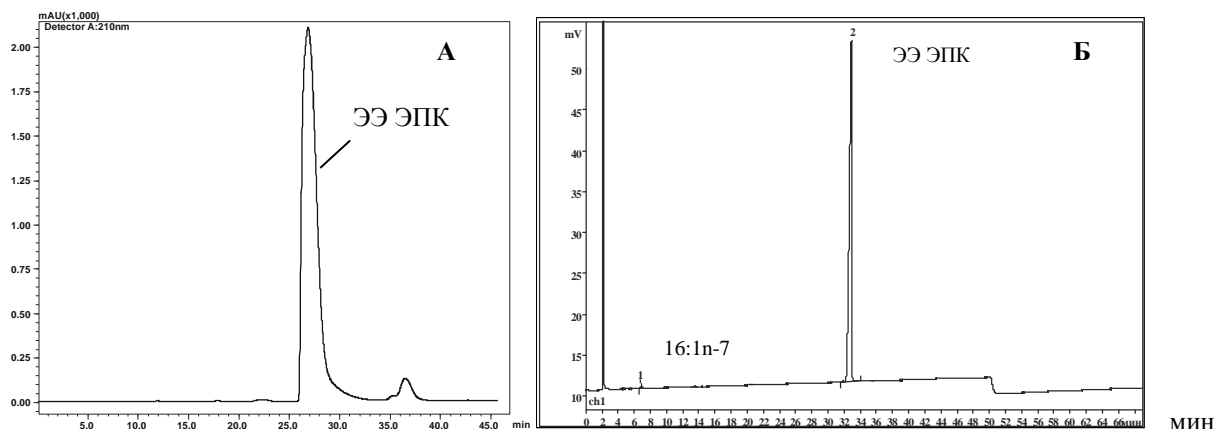


Рисунок 18 – Preparative ВЭЖХ концентрата этиловых эфиров ЭПК (А) и ГЖХ анализ выделенного пика (Б)

На рисунке 19 показан другой пример критической пары АК и ДГК. Для разделения был взят концентрат АК (50 %) с содержанием ДГК 4.3 %, полученный из говяжьей печени. ГЖХ анализ выделенного пика показал, что разделение этих кислот не произошло (рис. 19, Б).

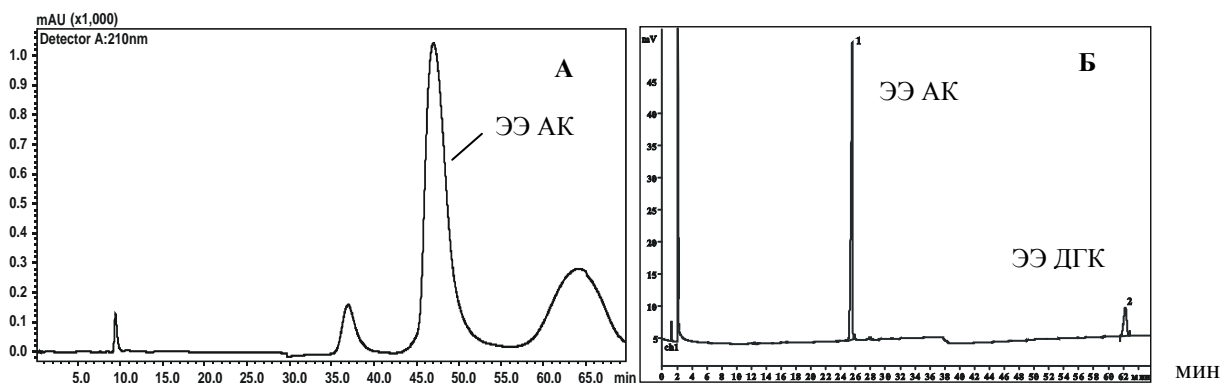


Рисунок 19 – Preparative ВЭЖХ концентрата этиловых эфиров АК (А) и ГЖХ анализ выделенного пика (Б)

Селективная йод-лактонизация позволяет получить более концентрированные ПНЖК и уменьшает концентрацию нежелательных компонентов «критических пар». В результате были получены высокоочищенные ЭПК (99.1 %) (рис. 20, А) и ДГК (99.2 %) (рис. 20, Б).

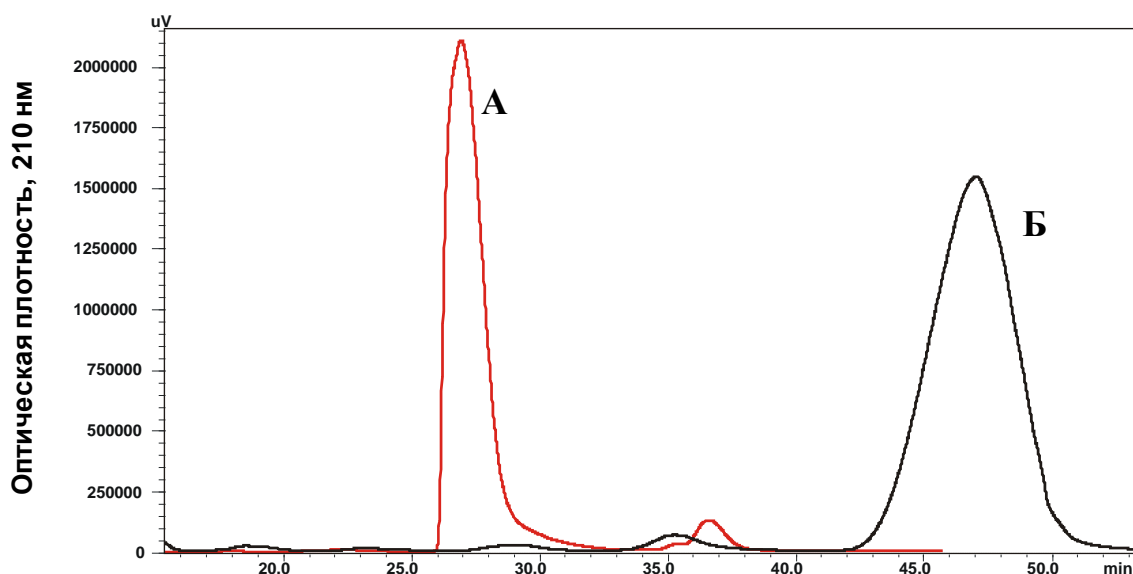


Рисунок 20 – Фрагменты хроматограмм очистки ЭПК (А) и ДГК (Б) в виде этиловых эфиров (детектор UV/VIS SPD-20A (210 нм); колонка HS C-18 (Supelco, США), 250 мм × 50 мм i.d.; система этанол-вода (80:20))

Как было отмечено ранее, выход и чистота получаемых при ВЭЖХ жирных кислот в значительной степени зависит от концентрации и набора ПНЖК в разделяемых образцах [151, 205]. Для получения ЭПК, ДГК с чистотой > 99 % использовали повторную очистку фракций, полученных в результате разделения смеси ЖК с чистотой ЖК 94 % [205]. В нашей работе были взяты концентраты (ЭПК – 93.3 %, ДГК – 95.6 %), полученные комбинацией методов: кристаллизация ЖК с мочевиной и последующая йод-лактонизация. Основной проблемой при получении высокоочищенной ЭПК стало содержание 16:1n-7, у которой время удерживания совпадало с ЭПК. Использование йод-лактонизации позволило существенно сократить содержание 16:1n-7 в препарате ЭПК.

3.7.4 Способ комплексного выделения 1-О-алкил-глицеринов, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот из липидов пищеварительной железы кальмара

На основании проведенного исследования был разработан способ комплексного выделения АГ и n-3 ПНЖК (ЭПК и ДГК) из липидов пищеварительной железы кальмара (рис. 21). Следует отметить, что этот процесс может быть легко адаптирован для практически любого набора ПНЖК, в том

числе и для выделения арахионовидной кислоты. Предложенная схема не требует использования сложного аппаратного оформления и дорогостоящих реактивов. Простота разработанного способа позволяет получать значительные количества высокоочищенных насыщенных АГ и концентратов n-3 ПНЖК для диетологических исследований.

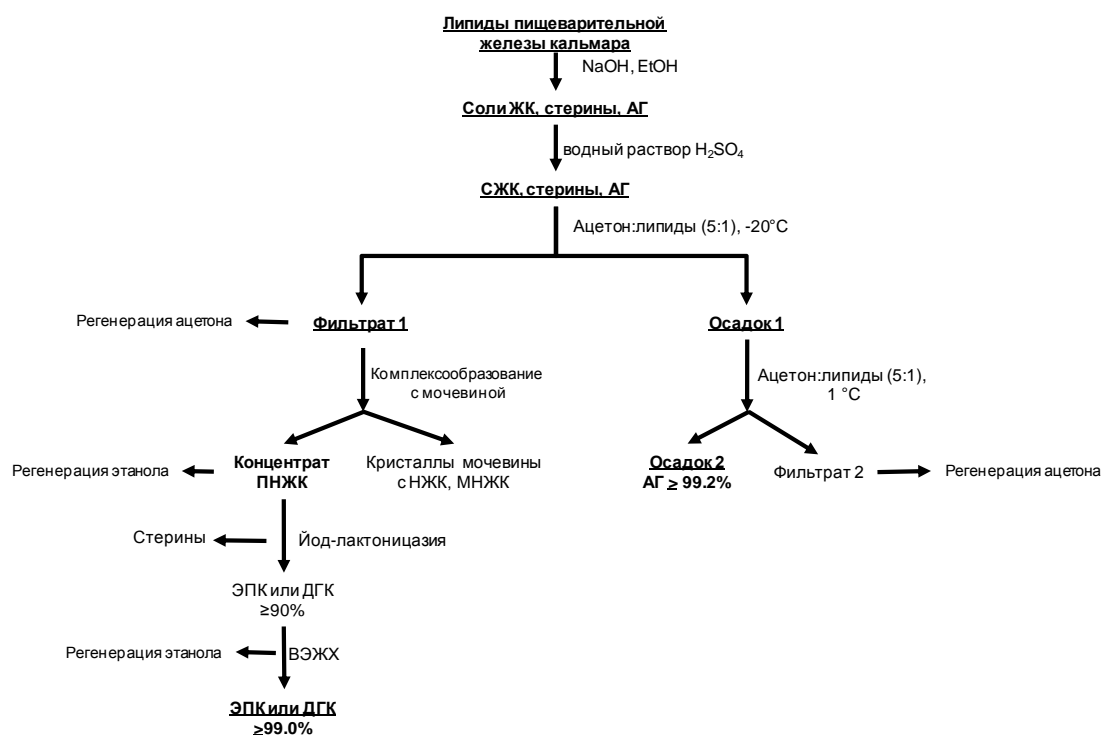


Рисунок 21 – Схема комплексной переработки липидов пищеварительной железы кальмара

Себестоимость получения 1 кг АГ и 1 кг концентрата ПНЖК, включающая стоимость сырья, реактивов, амортизационных расходов, затрат на электроэнергию, водоснабжение и заработную плату, составила 10681 и 3931 руб. соответственно (табл. 17). Следует отметить, что в розничной сети представлен только очищенный от сквалена жир печени глубоководных акул, стоимость которого составляет 1100 руб. за 60 капсул, с содержанием АГ 20 %. Для медико-биологических исследований предложены смесь рацематов батилового спирта и природный аналог химилового спирта (Santa Cruz Biotechnology, USA) стоимостью 303 и 315 USD за 1 г соответственно. Себестоимость 1 г

высокоочищенных этиловых эфиров ЭПК или ДГК, полученных с помощью йод-лактонизации и препаративной ВЭЖХ, равна 4709 рублей. Полученные нами препараты обладают конкурентоспособностью в плане ценовых и качественных характеристик.

Таблица 17 – Расчет себестоимости получаемых препаратов

№	Расходы	Сумма расходов на выделение 1 кг АГ, руб	Сумма расходов на выделение ПНЖК		
			Комплексообразование с мочевиной (1 кг)	Йод-лактонизация (1.5 г)	Препаративная ВЭЖХ (1 г)
1	Сырье	880	0	0	0
2	Растворители и реактивы	756	588	231	316
3	Коммунальные услуги, в том числе электроэнергия	2145	373	7	25
4	Амортизационные расходы	2100	250	10	710
5	Заработная плата (30 тыс.руб. /мес.)	4800	2720	2728	682
6	ИТОГО:	10681	3931	2976	1733

На основании предложенного способа была получена биологически активная добавка к пище «Липидомарин-Магистр», 1 капсула которого содержит 315 мг БАД, из них 252 мг АГЭ и 47 мг концентрата ПНЖК (табл. 18). БАД «Липидомарин-Магистр» получила положительное заключение в ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи» (Экспертное заключение №72/Э - 1579/б-15 от 10.12.2015).

Таблица 18 – Характеристики БАД «Липидомарин-Магистр»

Наименование показателя	Значение показателя
Массовая доля АГ, %, не менее	80.0
Массовая доля n-3 ПНЖК, включая ДГК и ЭПК, в виде этиловых эфиров, % не менее	18.5
Массовая доля альфа-токоферола (витамин Е), %, не менее	1.0
Массовая доля воды и примесей нежирового характера в порошке и таблетках, %, не более	0.5
Кислотное число, мг КОН/г, не более	4.0
Перекисное число, ммоль активного кислорода/кг, не более	10.0

Разработанный способ может быть использован для различных морских жиров, в состав которых входят насыщенные АГ и n-3 ПНЖК. Предложенные методы выделения и концентрирования этих биологически активных

компонентов позволяют получить высокоочищенные препараты для диетологической плазмалоген-замещающей терапии при нейродегенеративных заболеваниях, комбинированной терапии кандидозов и профилактике онкологических заболеваний.

Заключение

Морские организмы известны, как источник биологически активных соединений, среди которых особый интерес вызывают липиды. Современные методы исследования позволили более детально изучить уже известные и открыть новые аспекты биологической активности липидов в организме человека. Липиды вовлечены в процессы сердечнососудистых, онкологических, легочных, нейродегенеративных и кожных заболеваний. Помимо использования, как энергетического компонента диеты, липиды являются важными сигнальными и регуляторными молекулами в разнообразных процессах в организме человека. В настоящее время считается, что абсолютное большинство патологических процессов у человека прямо или косвенно связаны с нарушениями обмена липидов. Ярким примером может служить открытие зависимости нейродегенеративных заболеваний от нарушений в биосинтезе липидов с простой эфирной связью, предшественниками которых являются АГ и n-3 ПНЖК.

Проведен сравнительный анализ состава АГ в некоторых морских беспозвоночных (морские звезды *Distolasterias nippon*, *Asterias amurensis*, *Patiria pectinifera* и кальмар *Berryteuthis magister*). Наиболее перспективным источником АГ являются липиды пищеварительной железы кальмара *B. magister*. Они отличаются высоким содержанием АГ, основной компонент которых химилловый спирт.

Исследование состава АГ требует очистки и дериватизации образцов для их последующего ГЖХ и ГЖХ-МС анализа. Нами была предложена методика масс-спектрометрической идентификации АГ в режиме прямого ввода образца в ионный источник. Использование тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения при ионизации электронным ударом позволило качественно охарактеризовать АГ в природных объектах.

Усиление резистентности микроорганизмов к антибиотикам и противогрибковым препаратам является серьезной проблемой современной медицины. Было показано, что АГ способны подавлять рост дрожжеподобных

грибов и усиливать действие амфотерицина В и клотримазола, что позволяет использовать АГ в комбинированной терапии кандидозов.

Тестирование противораковой активности на трех штаммах (SK-Mel-5, SK-Mel-28, RPMI-7951) меланомы показало, что АГ обладают наиболее сильным ингибирующим действием на пролиферацию штамма RPMI-7951. Подавление формирования колоний клеток этого штамма зависело от концентрации АГ.

Генетические или приобретенные нарушения в метаболизме липидов с простой эфирной связью являются причиной или отягчающим фактором серьезных заболеваний (болезни Альцгеймера и Паркинсона, синдром Зельвегера, ризомиелическая хонродисплазия, болезни глаз и легких). Дефицит плазмалогенов в тканях значительно увеличивается с возрастом. Проведенное исследование на крысах показало, что АГ и концентрат ПНЖК способствуют увеличению уровней плазмалогенов и ДГК в липидах печени экспериментальных животных.

На настоящий момент препараты с высокоочищенными АГ отсутствуют на рынке, исключение составляют биологически активные добавки, состоящие из очищенного от сквалена и холестерина жира печени глубоководных акул. Нами был разработан технологический подход к выделению АГ и n-3 ПНЖК из липидов пищеварительной железы кальмара. Следует отметить, что пищеварительная железа кальмара *B. magister* является отходом переработки этого промыслового вида. Объемы добычи кальмара составляют около 15 тыс. т. Около 3 тыс. т пищеварительной железы, содержание липидов в которой может достигать 50 %, не используется в пищевой промышленности.

Предложен способ выделения АГ, основанный на низкотемпературной кристаллизации гидролизованных липидов пищеварительной железы кальмара из органических растворителей. В результате были получены АГ (99.2 %) с содержанием хмиллового спирта 94.4 %. Способ позволяет провести комплексную переработку липидов пищеварительной железы кальмара и последовательно выделить АГ и высокоочищенные ПНЖК.

ВЫВОДЫ

1. Сравнение состава 1-*O*-алкил-глицеринов, полученных из липидов трех видов морских звезд и кальмара, показало, что пищеварительная железа кальмара *B. magister* содержит наибольшее количество АГ и химилового спирта (73.5 % от суммы АГ) и является оптимальным источником АГ.
2. Разработан метод идентификации компонентов смеси АГ с использованием тандемной масс-спектрометрии без предварительной подготовки образцов, что позволило упростить и ускорить проведение анализов.
3. Установлено, что АГ способны самостоятельно ингибировать рост дрожжеподобных грибов рода *Candida* и усиливать действие противогрибковых препаратов.
4. Установлено, что природные АГ и синтетический октил-глицерин ингибировали пролиферацию исследованных культур SK-Mel-5, SK-Mel-28 и PRMI-7951. Наибольшая активность выделенных АГ проявлялась при формировании колоний штамма меланомы PRMI-7951.
5. Введение в диету экспериментальных животных АГ и n-3 ПНЖК способствовало увеличению содержания плазмалогенов и ДГК в липидах печени крыс, что позволяет использовать данные липиды в плазмалоген-замещающей терапии болезней человека.
6. Разработан способ комплексного выделения АГ и n-3 ПНЖК из липидов пищеварительной железы кальмара. Получены АГ с чистотой 99.2 % с содержанием химилового спирта 94.4 %. После выделения АГ получены индивидуальные эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты с чистотой более 99.0 %.

Список литературы

1. Iannitti, T. An update on the therapeutic role of alkylglycerols // T. Iannitti, B. Palmieri // *Marine Drugs*. – 2010. – Vol. 8. – P. 2267-2300.
2. Bakes, M. J. Lipid, fatty acid and squalene composition of liver oil from six species of deep-sea sharks collected in southern Australian waters / M. J., Bakes, P. D. Nichols // *Comp. Biochem. Physiol. B*. – 1995. – Vol. 110. – P. 267-275.
3. Hayashi, K. Unusual occurrence of diacyl glyceryl ethers in liver lipids from two species of gonatid squids / K. Hayashi, K. Kawasaki // *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. – 1985. – Vol. 51. – P. 593-597.
4. Riediger, N. D. A systematic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease / N. D. Riediger, R. A. Othman, M. Suh, M. H. Moghadasian // *American Dietetic Association*. – 2009. – Vol. 109. – P. 668-679.
5. Magnusson, C. D. Ether lipids / C. D. Magnusson, G. G. Haraldsson // *Chem. Phys. Lipids*. – 2011. – Vol. 164. – P. 315-340.
6. Doree, C. The Occurrence and distribution of cholesterol and allied bodies in the animal kingdom / C. Doree // *Biochem J*. – 1909. – 4. – P. 72-106.
7. Snyder, F. *Ether Lipids: Chemistry and Biology* / F. Snyder. – New York and London : Academic Press, 1972. – 454 p.
8. Heilbron, I. M. CXXIV. The unsaponifiable matter from the oils of elsamobranch fish. Part IV. The establishment of the structure of selachyl and batyl as monoglyceryl ethers / I. M. Heilbron, W. M. Owen // *J. Chem. Soc. London*. – 1928. – P. 942-947.
9. Baer, E. Studies on acetone-glyceraldehyde, and optically active glycerides. IX. Configuration of the natural batyl, chimyl and selachyl alcohols / E. Baer, H. Fischer // *J. Biol. Chem*. – 1941. – Vol. 140. – P. 397-410.
10. Snyder, F. The biochemistry of lipids containing ether bonds / F. Snyder // *Prog. Chem. Fats Other Lipids*. – 1969. – Vol. 10. – P. 287-335.
11. Brohult, A. Alkylglycerols in the Treatment of Leucopenia Caused by Irradiation / A. Brohult, J. Holmberg // *Nature*. – 1954. – Vol. 174. – P. 1102-1103.
12. Snyder, F. The ether lipid trail: a historical perspective / F. Snyder // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1999. – Vol. 1436. – P. 265-278.

13. Farooqui, A. A. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders / A. A. Farooqui, L. A. Horrocks, T. Farooqui // *Chem. Phys. Lipids.* – 2000. – Vol. 106. – P. 1-29.
14. Benveniste, J. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor / J. Benveniste, P. M. Henson, C. G. Cochrane // *J. Exp. Med.* – 1972. – Vol. 136. – P. 1356-1377.
15. Centemeri, C. Heterogeneous platelet-activating factor (PAF) receptors and calcium increase in platelets and macrophages / C. Centemeri, S. Colli, D. Tosarello, P. Ciceri, S. Nicosia // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 57. – P. 263-271.
16. Braverman, N. E. Functions of plasmalogen lipids in health and disease / N. E. Braverman, A. B. Moser // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1822. – P. 1442-1452.
17. Mangold, H. Ether lipids: biochemical and biomedical aspects / H. Mangold, F. Paltauf. - New York : Academic Press, 1983. – 456 p.
18. Garrett, R. H. Biochemistry / R. H. Garrett, C. M. Grisham. - Fort Worth : Saunders College Publishing, 1995. – 1039 p.
19. Koga, Y. Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses / Y. Koga, M. Nishihara, H. Morii, M. Akagawa-Matsushita // *Microbiological Reviews.* – 1993. – Vol. 57. – P. 164-182.
20. Mangold, H. K. Biosynthesis and biotransformation of ether lipids / H. K. Mangold, N. Weber // *Lipids.* – 1987. – Vol. 22. – P. 789-799.
21. Sprott, G. D. Structures of archaeobacterial membrane lipids / G. D. Sprott // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* – 1992. – Vol. 24. – P. 555-566.
22. Koga, Y. Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects / Y. Koga, H. Morii // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 2005. – Vol. 69. – P. 2019-2034.
23. Krishnan, L. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum / L. Krishnan, C. J. Dicaire, G. B. Patel, G. D. Sprott // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P. 54-63.

24. Sprott, G. D. Adjuvant potential of archaeal synthetic glycolipid mimetics critically depends on the glyco head group structure / G. D. Sprott, C. J. Dicaire, J. P. Cote, D. M. Whitfield // *Glycobiology*. – 2008. – Vol. 18. – P. 559-565.
25. Bode, M. L. Extraction, isolation and NMR data of the tetraether lipid calditoglycerocaldarchaeol (GDNT) from *Sulfolobus metallicus* harvested from a bioleaching reactor / M. L. Bode, S. R. Buddoo, S. H. Minnaar, C. A. du Plessis // *Chem. Phys. Lipids*. – 2008. – Vol. 154. – P. 94-104.
26. Kattner, G. Exceptional lipids and fatty acids in the pteropod *Clione limacina* (Gastropoda) from both polar oceans / G. Kattner, W. Hagen, M. Graeve, C. Albers // *Marine Chemistry*. – 1998. – Vol. 61. – P. 219-228.
27. Clarke, A. Lipid composition of two species of *Serolis* (Crustacea, Isopoda) from Antarctica / A. Clarke // *Br. Antarct. Surv. Bull.* – 1984. – P. 37-53.
28. Fricke, H. 1-*O*-alkylglycerolipids in antarctic krill (*Euphausia superba* Dana) / H. Fricke, G. Gercken, J. Oehlenschlager // *Comp. Biochem. Physiol. B*. – 1986. – Vol. 85. – P. 131-134.
29. Imbs, A. B. Fatty acid, lipid class, and phospholipid molecular species composition of the soft coral *Xenia* sp. (Nha Trang Bay, the South China Sea, Vietnam) / A. B. Imbs, L. P. T. Dang, V. G. Rybin, V. I. Svetashev // *Lipids*. – 2015. – Vol. 50. – P. 575-589.
30. Yamashiro, H. Composition of lipids, fatty acids and sterols in Okinawan corals / H. Yamashiro, H. Oku, H. Higa, I. Chinen, K. Sakai // *Comp. Biochem. Physiol. B*. – 1999. – Vol. 122. – P. 397-407.
31. Hayashi, K. Content and composition of diacyl glyceryl ethers in the pyloric ceca and ovaries of the asteroids *Solaster paxillatus* and *Asterias amurensis* / K. Hayashi, K. Kishimura // *Fisheries Science*. – 1997. – Vol. 63. – P. 945-949.
32. Hayashi, K. Content and composition of glyceryl ethers in the pyloric ceca and ovaries of the starfish *Distolasterias nippon*, *Asterina pectinifera*, and *Lysastrosoma anthosticta* / K. Hayashi // *Fisheries Science*. – 1998. – Vol. 64. – P. 852-853.
33. Phleger, C. F. Lipids and buoyancy in southern ocean pteropods / C. F. Phleger, P. D. Nichols, P. Virtue // *Lipids*. – 1997. – Vol. 32. – P. 1093-1100.

34. Imbs, A. B. Lipid class and fatty acid composition of the boreal soft coral *Gersemia rubiformis* / A. B. Imbs, O. A. Demina, D. A. Demidkova // *Lipids*. – 2006. – Vol. 41. – P. 721-725.
35. Joseph, J. D. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates: Porifera and Cnidaria / J. D. Joseph, // *Prog. Lipid Res.* – 1979. – Vol. 18. – P. 1-30.
36. Hallgren, B. On the occurrence of 1-*O*-(2-methoxyalkyl)glycerols and 1-*O*-phytanylglycerol in marine animals / B. Hallgren, A. Niklasson, G. Stallberg, H. Thorin // *Acta Chem. Scand. B*. – 1974. – Vol. 28. – P. 1035-1040.
37. Дембицкий, В. М. Плазмалогены в фосфолипидах морских беспозвоночных / В. М. Дембицкий // *Биология моря*. – 1979. – № 5. – С. 86-90.
38. Kang, S. Similarities in the lipid class profiles of oils from atlantic and pacific dogfish livers / S. Kang, M. C. A. Timmins, R. G. Ackman // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1998. – Vol. 75. – P. 1667-1672.
39. Jayasinghe, C. Variation in lipid classes and fatty acid composition of salmon shark (*Lamna ditropis*) liver with season and gender / C. Jayasinghe, N. Gotoh, S. Wada // *Comp. Biochem. Physiol. B*. – 2003. – Vol. 134. – P. 287-295.
40. Deprez, P. P. Squalene content and neutral lipid composition of livers from deep-sea sharks caught in Tasmanian waters / P. P. Deprez, J. K. Volkman, S. R. Davenport // *Aust. J. Mar. Fresh. Res.* – 1990. – Vol. 41. – P. 375-387.
41. Wetherbee, B. M. Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from the Chatham Rise, New Zealand / B. M. Wetherbee, P. D. Nichols // *Comp. Biochem. Physiol. B*. – 2000. – Vol. 125. – P. 511-521.
42. Hallgren, B. The glyceryl ethers in the liver oils of elasmobranch fish / B. Hallgren, S. Larsson // *J. Lipid Res.* – 1962. – Vol. 3. – P. 31-38.
43. Navarro-Garcia, G. Lipid composition of the liver oil of shark species from the Caribbean and Gulf of California waters / G. Navarro-Garcia, R. Pacheco-Aguilar, B. Vallejo-Cordova, J. C. Ramirez-Suarez, A. Bolanos // *J. Food Compos. Anal.* – 2000. – Vol. 13. – P. 791-798.
44. Hayashi, K. Level and composition of diacyl glyceryl ethers in the different tissues and stomach contents of giant squid *Moroteuthis robusta* / K. Hayashi,

- H. Kishimura, Y. Sakurai // *Nippon Suisan Gakkaishi*. – 1990. – Vol. 56. – P. 1635-1639.
45. Hayashi, K. Occurrence of diacyl glyceryl ethers in liver lipids of gonatid squid *Gonatopsis borealis* / K. Hayashi // *Nippon Suisan Gakkaishi*. – 1989. – Vol. 55 – P. 1383-1387.
46. Hayashi K. Amount and composition of diacyl glyceryl ethers in various tissue lipids of the deep-sea squid *Berryteuthis magister* / K. Hayashi, H. Kishimura // *Journal of Oleo Science*. – 2002. – Vol. 51. – P. 523-529.
47. Malins, D. C. Glyceryl ether metabolism. Regulation of buoyancy in dogfish *Squalus acanthias* / D. C. Malins, A. Barone // *Science*. – 1970. – Vol. 167. – P. 79-80.
48. Lombardi, R. Analysis of ointments, oils and waxes. XX. Study of composition of oil of basking shark *Cetorhinus maximus* Gunner / R. Lombardi, F. Haubout, F. Fawaz, M. Choix, F. Puisieux // *Ann. Pharm. Fr.* – 1971. – Vol. 29. – P. 429-436.
49. Andrikopoulos, N. K. Lipids of *Pinus halepensis* pollen / N. K. Andrikopoulos, A. Siafaka-Kapadai, C. A. Demopoulos, V. M. Kapoulas // *Phytochemistry*. – 1985. – Vol. 24. – P. 2953-2957.
50. Хотимченко, С. В. Липиды морских водорослей-макрофитов и трав: структура, распределение, анализ / С. В. Хотимченко. – Владивосток : Дальнаука, 2003. – С. 231.
51. Hallgren, B. On the occurrence of 1-*O*-alkylglycerols and 1-*O*-(2-methoxyalkyl)glycerols in human colostrum, human milk, cow's milk, sheep's milk, human red bone marrow, red cells, blood plasma and a uterine carcinoma / B. Hallgren, A. Niklasson, G. Stallberg, H. Thorin // *Acta Chem. Scand. B*. – 1974. – Vol. 28. – P. 1029-1034.
52. Oh, S. Y. Effects of dietary alkylglycerols in lactating rats on immune responses in pups / S. Y. Oh, L. S. Jadhav // *Pediatr. Res.* – 1994. – Vol. 36. – P. 300-305.
53. Snyder, F. Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues / F. Snyder, R. Wood // *Cancer Research*. – 1969. – Vol. 29. – P. 251-257.

54. Snyder, F. Metabolism of alpha-alkoxy glyceryl monoethers in rat liver, *in vivo* and *in vitro* / F. Snyder, R. C. Pfeleger // *Lipids*. – 1966. – Vol. 1. – P. 328-334.
55. Kayama, M. The glyceryl ethers of some shark liver oils / M. Kayama, Y. Tsuchiya, J. C. Nevenzel // *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*. – 1971. – Vol. 37. – P. 111-118.
56. Brohult, A. Biochemical Effects of alkoxyglycerols and their use in cancer therapy / A. Brohult, J. Brohult, S. Brohult // *Acta Chem. Scand.* – 1970. – Vol. 24. – P. 730-732.
57. Brites, P. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease / P. Brites, H. R. Waterham, R. J. Wanders // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2004. – Vol. 1636. – P. 219-231.
58. Nagan, N. Plasmalogens: biosynthesis and functions / N. Nagan, R. A. Zoeller // *Prog. Lipid Res.* – 2001. – Vol. 40. – P. 199-229.
59. Han, X. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry / X. Han, D. M. Holtzman, D. W. McKeel Jr. // *J. Neurochem.* – 2001. – Vol. 77. – P. 1168-1180.
60. Honsho, M. Isolation and characterization of mutant animal cell line defective in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase: localization and transport of plasmalogens to post-Golgi compartments / M. Honsho, Y. Yagita, N. Kinoshita, Y. Fujiki // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – Vol. 1783. – P. 1857-1865.
61. Wynalda, K. M. Low-concentration ozone reacts with plasmalogen glycerophosphoethanolamine lipids in lung surfactant / K. M. Wynalda, R. C. Murphy // *Chem. Res. Toxicol.* – 2009. – Vol. 23. – P. 108-117.
62. Labadaridis, I. Plasmalogen levels in full-term neonates / I. Labadaridis, M. Moraitou, M. Theodoraki, G. Triantafyllidis, J. Sarafidou, H. Michelakakis // *Acta Paediatr.* – 2009. – Vol. 98. – P. 640-642.
63. Farooqui, A. A. Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia / A. A. Farooqui, L. A. Horrocks // *Neuroscientist*. – 2001. – Vol. 7. – P. 232-245.

64. Maeba, R. Plasmalogens in human serum positively correlate with high-density lipoprotein and decrease with aging / R. Maeba, T. Maeda, M. Kinoshita, K. Takao, H. Takenaka, J. Kusano, N. Yoshimura, Y. Takeoka, D. Yasuda, T. Okazaki, T. Teramoto // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2007. – Vol. 14. – P. 12-18.
65. Rasmiena, A. A. Plasmalogen modulation attenuates atherosclerosis in ApoE- and ApoE/GPx1-deficient mice / A. A. Rasmiena, C. K. Barlow, N. Stefanovic, K. Huynh, R. Tan, A. Sharma, D. Tull, J. B. de Haan, P. J. Meikle // *Atherosclerosis.* – 2015. – Vol. 243. – P. 598-608.
66. Purdue, P. E. Rhizomelic chondrodysplasia punctata, a peroxisomal biogenesis disorder caused by defects in Pex7p, a peroxisomal protein import receptor: a minireview / P. E. Purdue, M. Skoneczny, X. Yang, J. W. Zhang, P. B. Lazarow // *Neurochem. Res.* – 1999. – Vol. 24. – P. 581-586.
67. Farooqui, A. A. Plasmalogens, phospholipase A₂, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue / A. A. Farooqui, L. A. Horrocks // *Journal of Molecular Neuroscience.* – 2001. – Vol. 16. – P. 263-272.
68. Watschinger, K. Orphan enzymes in ether lipid metabolism / K. Watschinger, E. R. Werner // *Biochimie.* – 2013. – Vol. 95. – P. 59-65.
69. Cheng, J. B. Mammalian wax biosynthesis I. Identification of two fatty acyl-coenzyme a reductases with different substrate specificities and tissue distributions / J. B. Cheng, D. W. Russell // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 37789-37797.
70. Brown, A. J. Alkyldihydroacetone-P Syntase / A. J. Brown, F. Snyder // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257. – P. 8835-8839.
71. James, P. F. An animal cell mutant with a deficiency in acyl/alkyl-dihydroxyacetone-phosphate reductase activity. Effects on the biosynthesis of ether-linked and diacylglycerolipids / P. F. James, A. C. Lake, A. K. Hajra, L. K. Larkins, M. Robinson, F. G. Buchanan, R. A. Zoeller // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 23540-23546.
72. Lee, T. C. Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens / T. C. Lee // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1394. – P. 129-145.

73. Del Rio, L. A. Peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism / L. A. del Rio. – Netherlands: Springer, 2013. – 350 p.
74. De Duve, C. Peroxisomes (microbodies and related particles) / C. De Duve, P. Baudhuin // *Physiol Rev.* – 1966. – Vol. 46. – P. 323-357.
75. Novikoff, A. B. Microperoxisomes and peroxisomes in relation to lipid metabolism / A. B. Novikoff, P. M. Novikoff // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1982. – Vol. 386. – P. 138-152.
76. Hajra, A. K. Lipid biosynthesis in peroxisomes / A. K. Hajra, A. K. Das // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1996. – Vol. 804. – P. 129-141.
77. Sprecher, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids / H. Sprecher // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1486. – P. 219-231.
78. Hartmann, T. Alzheimer's disease: the lipid connection / T. Hartmann, J. Kuchenbecker, M. O. Grimm // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 103 (Suppl. 1). – P. 159-170.
79. Wood, P. L. Alkylglycerol lipid precursors: a review of therapeutic strategies for plasmalogen replacement / P. L. Wood // *Current Organic Chemistry.* – 2013. – Vol. 17. – P. 786-792.
80. Gorgas, K. The ether lipid-deficient mouse: Tracking down plasmalogen functions / K. Gorgas, A. Teigler, D. Komljenovic, W. W. Just // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1763. – P. 1511-1526.
81. Alexander, P. Reduction of radiation induced shortening of life-span by a diet augmented with alkoxyglycerol esters and essential fatty acids / P. Alexander, D. I. Connell, A. Brohult, S. Brohult // *Gerontologia.* – 1959. – Vol. 3. – P. 147-152.
82. Brohult, A. Alkoxyglycerols and their use in radiation treatment / A. Brohult // *Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.* – 1963. – Vol. 24 (Suppl. 223). – P. 1-99.
83. Wilson, G. N. Zellweger syndrome: diagnostic assays, syndrome delineation, and potential therapy / G. N. Wilson, R. G. Holmes, J. Custer, J. L. Lipkowitz, J. Stover, N. K. Datta, A. K. Hajra // *Am. J. MedL Genet.* – 1986. – Vol. 24. – P. 69-82.

84. Das, A. K. Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents / A. K. Das, R. D. Holmes, G. N. Wilson, A. K. Hajra // *Lipids*. – 1992. – Vol. 27. – P. 401-405.
85. Johnson, W. Jr. Safety assessment of alkyl glyceryl ethers as used in cosmetics / W. J. Johnson, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. Leibler, J. G. Marks Jr, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Andersen // *International Journal of Toxicology*. – 2013. – Vol. 32, Supplement 3. – P. 5S-21S.
86. Yamamoto, N. Activation of mouse peritoneal macrophages by lysophospholipids and ether derivatives of neutral lipids and phospholipids / N. Yamamoto, B. Z. Ngwenya // *Cancer Research*. – 1987. – Vol. 47. – P. 2008-2013.
87. Pedrono, F. Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice / F. Pedrono, B. Martin, C. Leduc, J. Le Lan, B. Saiag, P. Legran, J. P. Moulinoux, A. B. Legrand // *Nutr. Cancer*. – 2004. – Vol. 48. – P. 64-69.
88. Ved, H. S. Dodecylglycerol. A new type of antibacterial agent which stimulates autolysin activity in *Streptococcus faecium* ATCC 9790 / H. S. Ved, E. Gustow, V. Mahadevans, R. A. Pieringer // *J. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259. – P. 8115-8121.
89. Haynes, M. P. Synergism between the antifungal agents amphotericin B and alkyl glycerol ethers / M. P. Haynes, H. R. Buckley, M. L. Higgins, R. A. Pieringer // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1994. – Vol. 38. – P. 1523-1529.
90. Cheminade, C. 1-O-Alkylglycerols improve boar sperm motility and fertility / C. Cheminade, V. Gautier, A. Hichami, P. Allaume, D. Le Lannou, A. B. Legrand // *Biol. Reprod.* – 2002. – Vol. 66. – P. 421-428.
91. Warne, T. R. Growth-dependent accumulation of monoalkylglycerol in Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for a role in the regulation of protein kinase C / T. R. Warne, F. G. Buchanan, M. Robinson // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 11147-11154.
92. Erdlenbruch, B. Alkylglycerol opening of the blood – brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries / B. Erdlenbruch, M. Alipour, G. Fricker, D. S. Miller, W. Kugler, M. Lakomek // *Exp. Brain Res.* – 2003. – Vol. 135. – P. 1201-1210.

93. Erdlenbruch, B. Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain / B. Erdlenbruch, C. Schinkhof, W. Kugler, D. E. H. Heinemann, J. Herms, H. Eibl, M. Lakomek // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 139. – P. 685-694.
94. Erdlenbruch, B. Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats / B. Erdlenbruch, V. J. H. Eibl, M. Lakomek // *Exp. Brain Res.* – 2000. – Vol. 135. – P. 417-422
95. Gopinath, D. 1-*O*-Alkylglycerol vesicles (Algosomes): their formation and characterization / D. Gopinath, D. Ravi, B. R. Rao, S. S. Apte, D. Rambhau // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2002. – Vol. 246. – P. 187-197.
96. Berdel, W. E. The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipid activated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma / W. E. Berdel, W. R. Bausert, H. U. Weltzien, M. L. Modotell, K. H. Widmann, P. G. Munder, // *Eur. J. Cancer.* – 1980. – Vol. 16. – P. 1199-1204.
97. Tchorzewski, H. Modification of innate immunity in humans by active components of shark liver oil / H. Tchyrzewski, M. Banasik, E. Głowacka, P. Lewkowicz // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2002. – Vol. 13. – P. 329-332.
98. Tchorzewski, H. The effect of alkoksylglycerols, squalene and n-3 fatty acid on some innate immunity parameters in healthy people / H. Tchorzewski, E. Głowacka, M. Banasik, P. Lewkowicz // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2005. – Vol. 18. – P. 303-306.
99. Lewkowicz, P. Effect of high doses of shark liver oil supplementation on T cell polarization and peripheral blood polymorphonuclear cell function / P. Lewkowicz, M. Banasik, E. Głowacka, N. Lewkowicz, H. Tchorzewski // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2005. – Vol. 18. – P. 686-692.
100. Cheng, S. Lipid droplets and glyceryl ether diesters in ehrlich ascites cells grown in tissue culture / S. Cheng, C. Plantadosi, F. Snyder // *Lipids.* – 1967. – Vol. 2. – P. 193-193.
101. Snyder, F. The occurrence and metabolism of alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in transplantable rat and mouse tumors / F. Snyder, R. Wood // *Cancer Research* – 1968. – Vol. 28. – P. 972-978.

102. Lin, H. J. Abnormal distribution of *O*-alkyl groups in the neutral glycerolipids from human hepatocellular carcinomas / H. J. Lin, F. C. S. Ho, C. Lai, H. Lee // *Cancer Research*. – 1978. – Vol. 38. – P. 946-949.
103. Krotkiewski, M. Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer) / M. Krotkiewski, M. Przybyszewska, P. Janik // *Med. Sci. Monit.* - 2003. – Vol. 9. – P. 131-135.
104. Pedrono, F. 1-*O*-Alkylglycerols reduce the stimulating effects of bFGF on endothelial cell proliferation *in vitro* / F. Pedrono, B. Saiag, J. P. Moulinoux, A. B. Legrand // *Cancer Lett.* – 2007. – Vol. 251. – P. 317-322.
105. Webb, B. L. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis / B. L. Webb, S. J. Hirst, M. A. Giembycz // *British Journal of Pharmacology*. – 2000. – Vol. 130. – P. 1433-1452.
106. Houck, K. L. Ether-linked diglycerides inhibit vascular smooth muscle cell growth via decreased MAPK and PI3K/Akt signaling / K. L. Houck, T. E. Fox, L. Sandirasegarane, M. Kester. – *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – 295. – P. 1657-1668.
107. Yang, H. Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer / H. Yang, B. Higgins, K. Kolinsky, K. Packman, W. D. Bradley, R. J. Lee, K. Schostack, M. E. Simcox, S. Kopetz, D. Heimbrook, B. Lestini, G. Bollag, Su, F. // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72. – P. 779-789.
108. Wang-Sattler, R. Metabolic profiling reveals distinct variations linked to nicotine consumption in humans—first results from the KORA study / R. Wang-Sattler, Y. Yu, K. Mittelstrass, E. Lattka, E. Altmaier, C. Gieger, K. H. Ladwig, N. Dahmen, K. M. Weinberger, P. Hao, L. Liu, Y. Li, H. E. Wichmann, J. Adamski, K. Suhre, T. Illig // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3. – e3863.
109. Rudiger, M. Preterm infants with high polyunsaturated fatty acid and plasmalogen content in tracheal aspirates develop bronchopulmonary dysplasia less often / M. Rudiger, A. von Baehr, R. Haupt, R. R. Wauer, B. Rustow // *Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 28. – P. 1572-1577.

110. Rudiger, M. Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity / M. Rudiger, A. Tolle, W. Meier, B. Rustow // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. L379-L383.
111. Fabelo, N. Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease / N. Fabelo, V. Martin, G. Santpere, R. Marin, L. Torrent, I. Ferrer, M. Diaz // *Mol. Med.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1107-1118.
112. Schedin, S. Peroxisomal impairment in Niemann–Pick type C disease / S. Schedin, P. J. Sindelar, P. Pentchev, U. Brunk, G. Dallner // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 6245-625.
113. Murphy, E. J. Phospholipid composition and levels are altered in Down syndrome brain / E. J. Murphy, M. B. Schapiro, S. I. Rapoport, H. U. Shetty // *Brain Res.* – 2000. – Vol. 867. – P. 9-18.
114. Igarashi, M. Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex / M. Igarashi, K. Ma, F. Gao, H. W. Kim, S. I. Rapoport, J. S. Rao // *J. Alzheimers Dis.* – 2011. – Vol. 24. – P. 507-517.
115. Querfurth, H. W. Alzheimer's disease / H. W. Querfurth, F. M. LaFerla // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 362. – P. 329-344.
116. Ginsberg, L. Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain / L. Ginsberg, S. Rafique, J. H. Xuereb, S. I. Rapoport, N. L. Gershfeld // *Brain Res.* – 1995. – Vol. 698. – P. 223-226.
117. Astarita, G. Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease / G. Astarita, K. M. Jung, N. C. Berchtold, V. Q. Nguyen, D. L. Gillen, E. Head, C. W. Cotman, D. Piomelli // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – e12538.
118. Lukiw, W. J. Inflammatory, apoptotic, and survival gene signaling in Alzheimer's disease. A review on the bioactivity of neuroprotectin D1 and apoptosis / W. J. Lukiw, N. G. Bazan // *Mol. Neurobiol.* – 2010. – Vol. 42. – P. 10-16.

119. Mankidy, R. Membrane plasmalogen composition and cellular cholesterol regulation: a structure activity study / R. Mankidy, P. W. K. Ahiahonu, H. Ma, D. Jayasinghe, S. A. Ritchie, M. A. Khan, K. K. Su-Myat, P. L. Wood, D. B. Goodenowe // *Lipids Health Dis.* – 2010. – Vol. 9. – P. 162.
120. Rosenberger, T. A. Rapid synthesis and turnover of brain microsomal ether phospholipids in the adult rat / T. A. Rosenberger, J. Oki, A. D. Purdon, S. I. Rapoport, E. J. Murphy // *J. Lipid Res.* – 2002. – Vol. 43. – P. 59-68.
121. Blank, M. L. Meats and fish consumed in the American diet contain substantial amounts of ether-linked phospholipids / M. L. Blank, E. A. Cress, Z. L. Smith, F. Snyder // *J. Nutr.* – 1992. – Vol. 122. – P. 1656-1661.
122. Das, A. K. High incorporation of dietary 1-*O*-heptadecyl glycerol into tissue plasmalogens of young rats / A. K. Das, A. K. Hajra // *FEBS Letters.* – 1988. – Vol. 227. – P. 187-190.
123. Wood, P. L. Plasmalogen deficit: a new and testable hypothesis for the etiology of Alzheimer's disease / P. L. Wood, M. A. Khan, R. Mankidy, T. Smith, D. B. Goodenowe // *Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets.* – 2011. – Available from:
<http://www.intechopen.com/books/alzheimer-s-disease-pathogenesis-core-concepts-shifting-paradigms-and-therapeutic-targets/plasmalogen-deficit-a-new-and-testable-hypothesis-for-the-etiology-of-alzheimer-s-disease>
124. Nishimukai, M. Ingestion of plasmalogen markedly increased plasmalogen levels of blood plasma in rats / M. Nishimukai, T. Wakisaka, H. Hara // *Lipids.* – 2003. – Vol. 38. – P. 1227-1235.
125. Chen, S. Ether glycerophospholipids and their potential as therapeutic agents / Chen S., C. Liu // *Current Organic Chemistry.* – 2013. – Vol. 17. – P. 802-811.
126. Pat. 2012/0035250 A1 United States, Int. Cl. A61K 31/232. Plasmalogen compounds, pharmaceutical compositions containing the same and methods for treating diseases of the aging / A. M. Khan, P. L. Wood, D. Goodenowe, R. Mankidy, P. Ahiahonu. ; assignee Phenomenome Discoveries Inc ; filled 18. 12. 2009 ; it is publ. 27.12. 2011. – 36 p.

127. Lin, Y-C. Glycerol monolaurate and dodecylglycerol effects on *Staphylococcus aureus* and toxic shock syndrome toxin-1 *in vitro* and *in vivo* / Y-C. Lin, P. M. Schlievert, M. J. Anderson, C. L. Fair, M. M. Schaefer, R. Muthyala, M. L. Peterson // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4. – e7499.
128. Brissette, J. L. Studies on the antibacterial activity of dodecylglycerol. Its limited metabolism and inhibition of glycerolipid and lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus mutans* BHT / J. L. Brissette, A. Erlinda, E. A. Cabacungan, R. A. Pieringer // J. Biol. Chem. – 1986. – Vol. 261. – P. 6338-6345.
129. Shahidi, F. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies / F. Shahidi, U. Wanasundara // Trends in Food Science and Technology. – 1998. – Vol. 9. – P. 230-240.
130. Brown, L. B. Application of low temperature crystallization in the separation of the fatty acids and their compounds / L. B. Brown, D. X. Kolb // Prog. Chem. Fats Lipids. – 1955. – Vol. 3. – P. 57-94.
131. Chawla, P. Measurement of the size distribution of fat crystals using a laser particle counter / P. Chawla, J. M. deMan // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1990. – Vol. 76. – P. 329-332.
132. Singleton, W. S. Solution Properties (Fatty acids) / W. S. Singleton, ed. K. S. Markley. – New York: Interscience Publishers, 1960. – pp. 609-678.
133. Stout, V. F. Fractionation of fish oil and their fatty acids / V. F. Stout, W. B. Niisson, J. Krzynowek, H. Schlenk // Fish Oils In Nutrition / M. E. Stansby. – New York : Van Nostrand Reinhold. – pp. 73-119.
134. Haraldsson, G. G. Separation of saturated/unsaturated fatty acids / G. G. Haraldsson // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1984. – Vol. 61. – P. 219-222.
135. Hayashi, K. Isolation of alkyl glyceryl ethers from liver oil unsaponifiables by recrystallization / K. Hayashi // Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. – 1986. – Vol. 52. – P. 1475.
136. Schlenk, H. Urea inclusion compounds of fatty acids / H. Schlenk // Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids / R. T. Holman, W. O. Lundberg, T. Malkin. – New York : Pergamon Press, 1954. – pp. 243-267.

137. Senanayake, S. P. J. N. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) from algal oil via urea complexation / S. P. J. N. Senanayake, F. Shahidi // *Journal of Food Lipids*. – 2000. – Vol. 7. – P. 51-61.
138. Knight, H. B. Dissociation temperatures of urea complexes of long-chain fatty acids, esters, and alcohols / H. B. Knight, L. P. Witnauer, J. E. Coleman, W. R. Jr. Noble, D. Swern // *Anal. Chem.* – 1952. – Vol. 24. – P. 1331-1334.
139. Hayes, D. G. Triangular phase diagrams to predict the fractionation of free fatty acid mixtures via urea complex formation / D. G. Hayes, J. M. Van Alstine, A. L. Asplund // *Sep. Sci. Technol.* – 2001. – Vol. 36. – P. 45-58.
140. Pat. 6,664,405 B2 United States, Int. CL. C 07 C 51/43. Method for isolating high-purified unsaturated fatty acids using crystallization / S. K. Lee. ; assignee Lipozen, Inc. ; filled 28.11.2001 ; it is publ. 06.02.2003. – 10 p.
141. Hayes, D. G. Urea-based fractionation of fatty acids and glycerides of polyunsaturated and hydroxy fatty acid seed oils / D. G. Hayes, J. M. Van Alstine, F. N. Setterwall // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2000. – Vol. 77. – P. 207-215.
142. Fei, C. Y. Optimisation of urea complexation by box-behnken design / C. Y. Fei, J. Salimon, M. Said. // *Sains Malaysiana*. – 2010. – Vol. 39. – P. 795-803.
143. Hwang, L. C. Fractionation of urea-pretreated squid visceral oil ethyl esters / L. C. Hwang, J-H. Liang // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2001. – Vol. 78. – P. 473-476.
144. Dillon, J. T. Purification of omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil using silver-thiolate chromatographic material and high performance liquid chromatography / J. T. Dillon, J. C. Aponte, R. Tarozo, Y. Huang // *Journal of Chromatography A*. – 2013. – Vol. 1312. – P. 18-25.
145. Bordier, C. G. Purification and characterization of deep sea shark *Centrophorus squamosus* liver oil 1-*O*-alkylglycerol ether lipids / C. G. Bordier, N. Sellier, A.P. Foucault, F. Le Goffic // *Lipids*. – 1996. – Vol. 31. – P. 521-528.
146. Subrahmanyam, C. New diterpenes from a new species of *Lobophytum* soft coral of the south Andaman coast / C. Subrahmanyam, C. V. R. V. Anjaneyulu, P. Satyamrayam, P. V. S. Rao // *Tetrahedron*. – 1992. – Vol. 48. – P. 3111-3120.

147. Diaz, Y. M. Biofilm inhibition activity of compounds isolated from two *Eunicea* species collected at the Caribbean Sea / Y. M. Diaz, V. G. Laverde, L. R. Gamba, H. M. Wandurraga, C. Arévalo-Ferro, F. R. Rodriguez, C. D. Beltran, L. C. Hernandez // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2015. – Vol. 25. – P. 605-611.
148. Yamamura, R. Industrial high-performance liquid chromatography purification of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosapentaenoic acid ethyl ester from single-cell oil // R. Yamamura, Y. Shimomura // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1997. – Vol. 74. – P. 1435-1440.
149. Gimenez, G. A. Downstream processing and purification of eicosapentaenoic (20:5n-3) and arachidonic acids (20:4n-6) from the microalga *Porphyridium cruentum* / G. A. Gimenez, I. M. J. Gonzalez, R. A. Medina, M. E. Grima, G. S. Salas, E. L. Cerdan // *Bioseparation*. – 1998. – Vol. 7. – P. 89-99.
150. Medina, R. A. Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana* / R. A. Medina, G. A. F. Gimenez, G. J. A. Camacho, S. E. Perez, M. E. Grima, C. A. Gomes // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1995. – Vol. 72. – P. 575-583.
151. Cartens, M. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* / M. Cartens, M. E. Grima, R. A. Medina, G. A. F. Gimenez, J. I. Gonzales // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1996. – Vol. 73. – P. 1025-1031.
152. Dowle, M. D. Synthesis and synthetic utility of halolactones / M. D. Dowle, D. I. Davies // *Chem. Soc. Rev.* – 1979. – Vol. 8. – P. 171-197.
153. Corey, E. J. Chemical and enzymic syntheses of 5-HPETE, a key biological precursor of slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS), and 5-HETE / E. J. Corey, J. O. Albright, A. E. Barton, S. Hashimoto // *J. Am. Chem. Soc.* – 1980. – Vol. 102. – P. 1435-1436.
154. Gaiday, N. V. Separation of natural polyunsaturated fatty acids by means of iodolactonization / N. V. Gaiday, A. B. Imbs, D. V. Kuklev, N. A. Latyshev // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 1991. – Vol. 68. – P. 230-233.

155. Corey, E. J. Docosaehaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis / E. J. Corey, C. Shin, J. R. Cashman // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. – 1983. – Vol. 1983. – P. 3581-3584.
156. Corey, E. J. A Simple process for the purification of arachidonic acid / E. J. Corey, S. W. Wright // Tetrahedron Letters. – 1984. – Vol. 25. – P. 2729-2730.
157. Wright, S. W. An effective process for the isolation of docosaehaenoic acid in quantity from cod liver oil / S. W. Wright, E. Y. Kuo, E. J. Corey // J. Org. Chem. – 1987. – Vol. 52. – P. 4399-4401.
158. Пат. 1631067 Союз Советских Социалистических Республик, МПК С 11 С 1/02. Способ получения докозагексаеновой, эйкозапентаеновой и арахидононой кислот или их смеси / Латышев Н. А., Имбс А. Б., Гайдай Н. В., Куклев Д. В., Касьянов С. П. ; заявитель и патентообладатель Институт биологии моря Дальневосточного отделения АН СССР ; заявл. 16.09.1988 ; опубл. 28.02.1991, Бюл. № 8. – 8 с.
159. Imbs, A. B. Application of an analytical modification of the iodolactonization reaction to selective detection of $\Delta^5(\Delta^4)$ unsaturated fatty acids / A. B. Imbs, D. V. Kuklev, A. D. Vereshchagin, N. A. Latyshev // Chem. Phys. Lipids. – 1991. – Vol. 60. – P. 71-76.
160. Hase, A. Separation and purification of pinolenic acid by the iodolactonization method / A. Hase, M. Ala-Peijari, S. Kaltia, J. Matikainen // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1992. – Vol. 69. – P. 832-834.
161. Karnovsky, M. L., Rapson W. S. South African fish products. Part XXII. Periodic acid as reagent in the analysis of the unsaponifiable fraction of natural fats / M. L. Karnovsky, W. S. Rapson // J. Soc. Chem. Ind. – 1946. – Vol. 65. – P. 138-140.
162. Williams, J. N. A sensitive and specific method for plasmalogens and other enol ethers / J. N. Williams Jr., C. E. Anderson, A. D. Jasik // J. Lipid Res. – 1962. – Vol. 3. – P. 378-381.
163. Rapport, M. M. Identification of phosphatidylcholine as the major constituent of beef heart lecithin / M. M. Rapport, N. Alonzo // J. Biol. Chem. – 1955. – Vol. 217. – P. 199-204.

164. Horrocks, L. A. The alk-1-enyl group content of mammalian myelin phosphoglycerides by quantitative two-dimension thin layer chromatography / L. A. Horrocks // *J. Lipid Res.* – 1968. – Vol. 9. – P. 469-472.
165. Vaskovsky, V. E. Determination of plasmalogen contents of phospholipid classes by reaction micro-thin-layer chromatography / V. E. Vaskovsky, V. M. Dembitzky // *Journal of Chromatography.* – 1975. – Vol. 115. – P. 645-647.
166. Vaskovsky, V. E. A universal reagent for phospholipid analysis / V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, I. M. Vasendin // *Journal of Chromatography.* – 1975. – Vol. 114. – P. 129-141.
167. Bjorkhem, I. Simple diagnosis of the Zellweger syndrome by gas-liquid chromatography of dimethylacetals / I. Bjorkhem, L. Sisfontes, B. Bostrom, B. F. Kase, R. Blomstrand // *J. Lipid Res.* – 1986. – Vol. 27. – P. 786-791.
168. Brites, P. Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice / P. Brites, A. S. Ferreira, T. Ferreira da Silva, V. F. Sousa, A. R. Malheiro, M. Duran, H. R. Waterham, M. Baes, R. J. A. Wanders // *PloS ONE.* – 2011. – Vol. 6. – e28539.
169. Goodenowe, D. B. Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia / D. B. Goodenowe, L. L. Cook, J. Liu, Y. Lu, D. A. Jayasinghe, P. W. K. Ahiahonu, D. Heath, Y. Yamazaki, J. Flax, K. F. Krenitsky, D. L. Sparks, A. Lerner, R. P. Friedland, T. Kudo, K. Kamino, T. Morihara, M. Takeda, P. L. Wood // *J. Lipid Res.* – 2007. – Vol. 48. – P. 2485–2498.
170. Wood, P. L. Dysfunctional plasmalogen dynamics in the plasma and platelets of patients with schizophrenia / P. L. Wood, G. Unfried, W. Whitehead, A. Phillipps, J. A. Wood // *Schizophrenia Research.* – 2015. – Vol. 161. – P. 506-511.
171. Yamashita, S. Preparation of marine plasmalogen and selective identification of molecular species by LC-MS/MS / S. Yamashita, F. Honjo, M. Aruga, K. Nakagawa, T. Miyazawa // *Journal of Oleo Science.* – 2014. – Vol. 63. – P. 423-430.
172. Hartvigsen, K. Regiospecific analysis of neutral ether lipids by liquid chromatography / electrospray ionization / single quadrupole mass spectrometry: validation with synthetic compounds / K. Hartvigsen, A. Ravandi, K. Bukhave,

- G. Hølmer, A. Kuksis // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2001. – Vol. 36. – P. 1116-1124.
173. Гордон, А. Спутник химика: физико-химические свойства, методики, библиография / А. Гордон, Р. Форд. – М. : Мир, 1976. – 541 с.
174. Bligh, E. G. A rapid method of total lipid extraction and purification / E. G. Bligh, W. J. Dyer // *Can. Journal Biochem. Physiol.* – 1959. – Vol. 37. – P. 911-917.
175. Carreau, J. P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts / J. P. Carreau, J. P. Dubacq, // *Journal of Chromatography A* – 1978. – Vol. 151. – P. 384-390.
176. Christie, W. W. Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas-chromatography - a reappraisal / W. W. Christie // *J. Chromatogr. A.* – 1988. - Vol. 447, N 2. -P. 305-314.
177. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. – М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
178. Berridge, M. V. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction / M. V. Berridge, A. S. Tan // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1993. – Vol. 303. – P. 474-482.
179. Костецкий, Э. Я. Фосфолипиды органов и тканей иглокожих и оболочников залива Петра Великого (Японское море) / Э. Я. Костецкий, П. В. Веланский, Н. М. Санина // *Биология моря*. – 2012. – Т. 38. – С. 65-71.
180. Blomstrand, R. Absorption of chymyl alcohol in man / R. Blomstrand, E. H. Anrens // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1959. – Vol. 100. – P. 802-805.
181. Bickerstaffe, R. Metabolism of chymyl alcohol and phosphatidyl ethanolamine in the rat brain / R. Bickerstaffe, J. H. Mead // *Lipids*. – 1968. – Vol. 3. – P. 317-320.

182. Bergan, J. The ether lipid precursor hexadecylglycerol causes major changes in the lipidome of HEp-2 cells / J. Bergan, T. Skotland, T. Sylvanne, H. Simolin, K. Ekroos, K. Sandvig // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – e7590.
183. Qian, L. Alkylglycerols modulate the proliferation and differentiation of non-specific agonist and specific antigen-stimulated splenic lymphocytes / L. Qian, M. Zhang, S. Wu, Y. Zhong, E. Van Tol, W. Cai // *PloS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – e96207.
184. Patton, J. High levels of pancreatic nonspecific lipase in rattlesnake and leopard shark / J. Patton // *Lipids*. – 1975. – Vol. 10. – P. 562-564.
185. Joseph, J. D. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca / J. D. Joseph // *Prog. Lipid. Res.* – 1982. – Vol. 21. – P. 109-153.
186. Latyshev, N. A. A study on the feeding ecology of chitons using analysis of gut contents and fatty acid markers / N. A. Latyshev, A. S. Khardin, S. P. Kasyanov, M. B. Ivanova // *J. Moll. Stud.* – 2004. – Vol. 70. – P. 225-230.
187. Falk-Petersen S., Hopkins C. C. E., Sargent J. R. (1990) Trophic relationships in the pelagic, arctic food web. In *Proceedings of the 24th European Marine Biology Symposium*, Oban, Scotland, UK, 4–10 October 1989; Barnes M, Gibson RN, Eds; Aberdeen University Press: Aberdeen, Scotland, 315-333.
188. Dessort, D. Electron-impact mass spectrometry of non-volatile substances by fast heating / D. Dessort, A. Van Dorsselaer, S. J. Tian, G. Vincendon // *Tetrahedron Letters*. – 1982. – Vol. 23. – P.1395-1398.
189. Ohashi, M. In-beam electron impact mass spectrometry of amino sugars / M. Ohashi, S. Yamada, H. Kudo, N. Nakayama // *Biomedical Mass Spectrometry*. – 1978. – Vol. 5. – P. 78-81.
190. Ohashi, M. In-beam electron impact mass spectrometry of phosphatidylcholines. A convenient method for positional isomer discrimination / M. Ohashi, H. Iino, K. Tsujimoto, Y. Ohashi // *Organic Mass Spectrometry*. – 1985. – Vol. 20. – P. 642-645.
191. Wang, M. Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine / M. Wang, C. Wang, R. H. Han, X. Han // *Prog. Lipid. Res.* – 2016. – Vol. 61. – P. 83-108.

192. Matthews, R. The epidemiology and pathogenesis of candidiasis: applications in prevention and treatment / R. Matthews, J. Burnie // Bull. Inst. Pasteur. – 1998. – Vol. 96. – P. 249-256.
193. Ved, H. S. Inhibition of peptidoglycan synthesis of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 and *Staphylococcus mutans* BHT by the antibacterial agent dodecylglycerol / H. S. Ved, E. Gustow, R. A. Pieringer // Biosci. Rep. – 1984. - Vol. 4. – P. 659-664.
194. Deniau, A. L. Multiple beneficial health effects of natural alkylglycerols from shark liver oil / A. L. Deniau, P. Mosset, F. Pedrono, R. Mitre, D. Le Bot, A. B. Legrand // Marine Drugs. – 2010. – Vol. 8. – P. 2175-2184.
195. Borowicz, S. The soft agar colony formation assay / S. Borowicz, M. Van Scoyk, S. Avasarala, M. K. K. Rathinam, J. Tauler, R. K. Bikkavilli, R. A. Winn // Journal of Visualized Experiments. – 2014. – Vol. 92. – P. 1-6.
196. Mackay, H. J. Protein kinase C: a target for anticancer drugs? / H. J. Mackay, C. J. Twelves // Endocrine-Related Cancer. – 2003. – Vol. 10. – P. 389-396.
197. Pedrono, F. Impact of a standard rodent chow diet on tissue n-6 fatty acids, $\Delta 9$ -desaturation index, and plasmalogen mass in rats fed for one year / F. Pedrono, N. Boulier-Monthean, D. Catheline, P. Legrand // Lipids. – 2015. – Vol. 50. – P. 1069-1082.
198. Rapoport, S. I. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver / S. I. Rapoport, J. S. Rao, M. Igarashi // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2007. – Vol. 77. – P. 251-261.
199. Gaposchkin, D. P. Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line: insights using ether lipid-deficient variants / D. P. Gaposchkin, R. A. Zoeller // J. Lipid Res. – 1999. – Vol. 40. – P. 495-503.
200. Wood, P. L. Oral bioavailability of the ether lipid plasmalogen precursor, PPI-1011, in the rabbit: a new therapeutic strategy for Alzheimer's disease / P. L. Wood, T. Smith, N. Lane, G. Ehrmantraut, D. B. Goodenowe // Lipids Health Dis. – 2011. – Vol. 10. – P. 227.

201. СанПин 2.3.2.1293-2003. Гигиенические требования по применению пищевых добавок. Санитарно-гигиенические правила и нормативы. – М. : Минздрав России, 2003. – 416 с.
202. Mendes, A. DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization and urea complexation / A. Mendes, T. L. da Silva, F. Reis // Food Technol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 45. – P. 38-44.
203. Liu, S. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters / S. Liu, C. Zhang, P. Hong, H. Ji // Journal of Food Engineering. – 2006. – Vol. 73. – P. 203-209.
204. Christie, W. W. Lipid analysis: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids / W. W. Christie. – Bridgwater : Oily Press, 2003. – 432 p.
205. Beebe, J. M. Preparative-scale high-performance liquid chromatography of omega-3 polyunsaturated fatty acid esters derived from fish oil / J. M. Beebe, P. R. Brown, J. G. Turcotte // Journal of Chromatography A. – 1988. – Vol. 459. – P. 369-378.