ИЗВЕСТИЯ РАН, СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2024, № 6, С. 695–704

БИОХИМИЯ

УДК [597.552.511:639.33]: 577.115 + 577.15

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ И КОРМЛЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *FADSD5, FADSD6, ELOVL2, ELOVL5A* ДЕСАТУРАЗ И ЭЛОНГАЗ В ПЕЧЕНИ МОЛОДИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L. В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ

© 2024 г. С. Н. Хуртина[@], С. А. Мурзина, М. В. Кузнецова, Н. Н. Немова

Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук", ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 185910 Россия

[@]E-mail: pek-svetlana@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2024 г.
После доработки 11.06.2024 г.
Принята к публикации 14.06.2024 г.

Проведен анализ относительного уровня экспрессии генов ферментов – десатураз и элонгаз (*fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a, elovl4*), являющихся ключевыми в биосинтезе длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, в печени молоди атлантического лосося *Salmo salar* Linnaeus, 1758, содержащегося при разных режимах освещения и кормления в условиях аквакультуры. Установлено, что в марте у смолтов атлантического лосося (0+), выращиваемых при круглосуточном освещении и кормлении, уровень экспрессии гена *fadsd5* десатуразы был выше, чем у рыб, содержащихся при естественном режиме освещения и кормлении в светлое время суток. Изменения в экспрессии генов (*elovl2, elovl5a, fadsd5)* у молоди лосося отражают адаптивные процессы на молекулярно-генетическом уровне в процессе роста и развития рыб и в ответ на изменения условий окружающей среды. Полученные результаты позволяют оценить способность/потребность молоди лосося к биосинтезу ПНЖК в процессе роста и развития.

Ключевые слова: атлантический лосось, экспрессия генов, десатуразы, элонгазы, жирные кислоты, смолтификация, раннее развитие, аквакультура

DOI: 10.31857/S1026347024060024, **EDN:** ukzcgq

Липиды и жирные кислоты (ЖК) играют незаменимую роль в процессах роста и развития организмов, в том числе рыб, как в естественной среде, так и в условиях аквакультуры (Tocher *et al.*, 2003; Мурзина и др., 2009, 2023а,б; Немова и др., 2015; Nemova *et al.*, 2020). Атлантический лосось *Salmo salar* Linnaeus, 1758, является значимым объектом аквакультуры и источником физиологически ценных полиненасыщенных ЖК (ПНЖК). Известно, что представители пресноводных и анадромных рыб из сем. Лососевые способны к биосинтезу длинноцепочечных ПНЖК, в том числе эссенциальных эйкозапентаеновой 20:5(n-3) (ЭПК) и докозагексаеновой 22:6(n-3) (ДГК) ЖК (Morais *et al.*, 2009; Tocher, 2010), тогда как большинство морских костистых рыб не могут образовывать длинноцепочечные ПНЖК (или имеют ограниченную способность), получая их в достаточном количестве при питании (Tocher *et al.*, 2010). Биосинтез ПНЖК у позвоночных животных, в том числе рыб, включает последовательные этапы десатурации (добавление двойной связи) и элонгации (удлинения цепи) незаменимых линолевой 18:2(n-6) и линоленовой 18:3(n-3) ЖК (Tocher, 2010; Monroig *et al.*, 2011, 2022; Xie *et al.*, 2021;) (рис. 1). Он проходит в организме посредством согласованного действия двух наборов ферментов, а именно десатураз и элонгаз, обладающих различной активностью и субстратной специфичностью (Guillou *et al.*, 2010).

Известно, что у атлантического лосося уровень экспрессии гена фермента десатуразы Δ6 выше в мозге, кишечнике и печени (Monroig *et al.*, 2010). Гены элонгаз активно экспрессируются в печени и кишечнике лосося (Zheng *et al.*, 2005a; Morais *et al.*, 2009), поскольку ткани этих органов являются основными местами синтеза и распределения липидов. Большая часть исследований биосинтеза

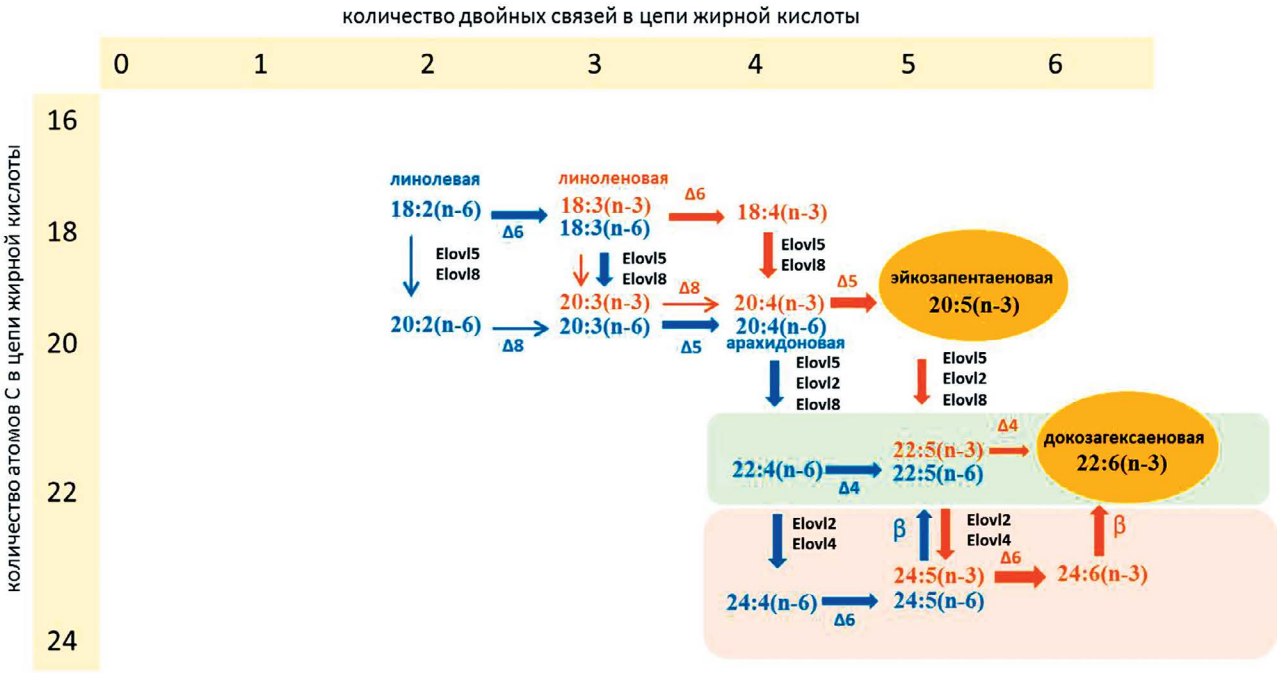

Рис. 1. Пути биосинтеза длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот у костистых рыб.
β – β окисление, Δ4/5/6/8 – десатураза с активностью Δ4/5/6/8; Elovl 2/4/5/8 – элонгаза с активностью 2/4/5/8. Оранжевая область – биосинтез длинноцепочечных ПНЖК по пути Шпрехера, зеленая область – биосинтез 22:6(n-3) и 22:5(n-6) с участием десатуразы Δ4.

ПНЖК *S. salar* направлена в основном на изучение экспрессии генов десатураз и элонгаз под действием таких факторов окружающей среды, как рацион питания (Morais *et al.*, 2009; Vestergren *et al.*, 2011; Vestergren, 2012; Miao *et al.*, 2022) или температура (Norambuena *et al.*, 2015). Следует отметить, что практически отсутствуют сведения о влиянии на экспрессию генов ферментов липогенеза таких, не менее значимых (особенно для аквакультуры) факторов, как линейный и весовой рост и фотопериод. При этом известно, что искусственно продленный фотопериод, используемый при выращивании молоди атлантического лосося, повышает темпы его роста (Hansen *et al.*, 1992; Berrill *et al.*, 2003, 2006; Leclercq *et al.*, 2011; Noori *et al.*, 2015; Imsland *et al.*, 2017; Шульгина и др., 2021). Исследования биосинтеза ПНЖК у *S. salar* не только важны с точки зрения получения новых сведений о молекулярных механизмах этого процесса при воздействии различных факторов среды, но и могут быть востребованы для усовершенствования биотехники выращивания и, в конечном итоге, улучшения качества продукции ценных рыб сем. Лососевые (Jakobsson *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2004, 2005a, b; Leaver *et al.*, 2008; Bláhová *et al.*, 2020; Monroig *et al.*, 2022).

Ранее было установлено совокупное влияние фотопериода и кормления в круглосуточном режиме на липидный профиль молоди *S. salar*, выращиваемого в аквакультуре в одном из южных регионов России (Северной Осетии – Алании) в летне-осенний период (Мурзина и др., 2023а, б). Показано, что процесс превращения пестряток в смолтов у лосося в условиях аквакультуры под воздействием постоянного освещения может происходить гораздо раньше (в возрасте 0+ и 1+) по сравнению с особями из естественной среды обитания (около 2+, 3+), что было подтверждено в наших исследованиях (Эколого-биохимический статус..., 2016; Мурзина и др., 2023а, б).

Для сохранения естественных циркадных ритмов лосося в условиях искусственного разведения при использовании постоянного освещения важным является соблюдение сезонного фотопериодизма, а именно наличия “зимнего окна” (воздействие короткого фотопериода с последующим увеличением его продолжительности). Это, в целом, способствует поддержанию оптимального хода обменных процессов и завершению значимых морфо-физиологических и биохимических адаптивных изменений в организме рыбы, происходящих при трансформации пестряток в смолтов (Villarreal *et al.*, 1988; Björnsson *et al.*, 2011; Власов и др., 2013).

Целью данной работы являлся анализ уровня экспрессии ключевых генов (*fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*,

elovl5a, elovl4) ферментов биосинтеза ПНЖК, элонгаз и десатураз, в печени молоди атлантического лосося, выращиваемой при разных режимах освещения и кормления в условиях аквакультуры в период после т.н. “зимнего окна”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали молодь (пестряток (0+) и смолтов (0+, 1+) атлантического лосося *S. salar* L., выращиваемого в условиях южного региона на рыбоводном хозяйстве ООО “Остров Аквакультура” (Республика Северная Осетия – Алания, Россия) согласно следующей схеме эксперимента. Сеголетки атлантического лосося (после перехода на экзогенное питание) были помещены в бассейны с непрерывным освещением (24LD) с использованием светодиодных осветителей LED (36W, 6500K) для стимуляции эндогенных механизмов, влияющих на ростовые процессы. В августе (2022*)* сеголеток средней массой 2.3 г пересадили в выростные лотки размером 4x1.2 м, объемом 2.5–2.7 м^3, в количестве 4900 особей/лоток. С начала сентября сеголеток разделили на три группы по 2 лотка и стали содержать в следующих (экспериментальных) условиях:

1. Группа “24LD+KK”: режим освещения постоянный (24LD), кормление круглосуточное (KK).

2. Группа “ЕстLD+КД”: естественное освещение (ЕстLD), кормление проводилось в светлое время суток (с 06:00 до 18:00 в сентябре, с 08:00 до 18:00 в октябре, с 08:00 до 17:00 в ноябре), через каждые два часа (КД).

3. Группа “24LD+КД”: режим освещения постоянный (24LD), кормление проводилось только в светлое время суток (КД), как у рыб из группы “ЕстLD+КД”.

С начала декабря подросшую молодь, согласно экспериментальным группам, перенесли в круглые бассейны объемом 3.1 м^3 (диаметром 2 м, высотой 1 м) в количестве в среднем 2800 на бассейн. С декабря по март дополнительное освещение не применялось – упомянутое выше “зимнее окно”. Далее выращивание пестряток и смолтов проходило в условиях естественного освещения региона. Условия дневного освещения: 5500 lx, в пасмурную погоду – 500 lx. С середины июня все группы лосося были объединены и высажены в лоток размером 30*3 метра, общим объемом 150 м^3 и подачей воды из родника с естественным ходом температур, с естественным световым режимом и кормлением в светлое время суток. При этом средняя температура воды в августе была значительно выше (16 °С), чем в марте (11 °С).

Для анализа отбирали по 8 особей из каждой экспериментальной группы (“24LD+KK”, “ЕстLD+КД”, “24LD+КД”) в марте и 15 особей в августе. Образцы печени взвешивали, фиксировали в жидкий азот и хранили при температуре –80 °С до начала анализа. Для молекулярно-генетического анализа брали печень молоди атлантического лосося в марте (пестрятки и смолты возраста 0+) и в августе (смолты 1+).

Выделение РНК из печени лосося проводили с использованием набора “Extract RNA” (“Евроген”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Затем суммарную РНК обрабатывали ДНКазой (“Силекс”, Россия). Целостность и качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и спектрофотометрически при коэффициенте поглощения 260/280 нм (NanoPhotometer C40-Touch, Implen, Германия). Обратную транскрипцию проводили с применением набора “MMLV RT kit” (“Евроген”, Россия). В дальнейшем синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Анализ проводили с использованием системы CFX96 Touch system (BioRad, США).

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации в ПЦР-РВ

Ген	Последовательность 5'–3'	Номер в GenBank Acc. no
ef1a фактор элонгации 1α	F: CACCACCGGCCATCTGATCTACAA R: TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC	AF321836
fadsd5 **десатураза** Δ5	F: GAGAGCTGGCACCGACAGAG R: GAGCTGCATTTTTCCCATGG	AF478472
fadsd6 **десатураза** Δ6	F: AGAGCGTAGCTGACACAGCG R: TCCTCGGTTCTCTCTGCTCC	AY458652
elovl5a элонгаза 5a	F: ACAAGACAGGAATCTCTTTCAGATTAA R: TCTGGGGTTACTGTGCTATAGTGTAC	AY170327
elovl2 элонгаза 2	F: CGGGTACAAAATGTGCTGGT R: TCTGTTTGCCGATAGCCATT	TC91192
elovl4 элонгаза 4	F: GAGGACCGTGGGGTGAAAAG R: CACTTGTCATTGTTCCTGCACT	NM_001195552.1

Праймеры к исследуемым генам ферментов десатурации и элонгации *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a*, *elovl4* (табл. 1) у *S. salar* L для ПЦР-РВ были подобраны на основе данных литературы (Vestergren, 2012; Norambuena *et al.*, 2015), а также с применением программы nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Амплификацию 3 мкл кДНК проводили с использованием 5 мкл набора "5х Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I" ("Евроген", Россия). Реакционную смесь инкубировали при температуре 95 °С в течение 5 минут и далее 40 циклов при следующих условиях: денатурация при 95 °С в течение 20 секунд, отжиг при 60 °С в течение 30 секунд и элонгация при 72 °С в течение 30 секунд. Специфичность реакции ПЦР проверяли по кривым плавления, полученным в соответствии с протоколом диссоциации от 65 °С до 97 °С. Ген фактора элонгации 1 (*ef1a*) был выбран в качестве референсного за счет стабильности экспрессии, в том числе в тканях печени и по образцу предыдущих исследований (Morais *et al.*, 2009; Vestergren, 2012). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов был подсчитан с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001), где $^{\Delta CT}$ – разница между средними значениями пороговых циклов для референсного (*ef1a*) и таргетного генов. Данные выражали в единицах относительной экспрессии исследуемого гена (у.ед.).

Статистическая обработка данных проведена в открытой программируемой среде R. Достоверность различий определяли с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия между значениями исследуемых показателей считали достоверными при $p \leqslant 0.05$. Сравнение данных по относительному уровню экспрессии исследуемых генов для смолтов лосося (1+) в августе проведено со значениями, полученными для всех смолтов (0+) лосося в марте, без разделения по принадлежности к экспериментальной группе. Биохимический анализ выполнен на базе лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН с использованием оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра «КарНЦ РАН».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что относительный уровень экспрессии гена десатуразы *fadsd5* в печени смолтов (0+) в марте из группы "24LD+KK" (круглосуточное освещение и кормление) был достоверно выше ($p = 0.02$) по сравнению со значениями для группы "ЕстLD+КД" (естественное освещение и кормление в светлое время суток) (табл. 2).

Относительный уровень экспрессии *fadsd6* был выше у пестряток и у смолтов из группы "24LD+KK" по сравнению с другими группами рыб, однако достоверных различий между значениями установлено не было (табл. 2).

Значения относительного уровня экспрессии *elovl2* у смолтов лосося (0+) из группы "24LD+KK" в марте были выше, чем у пестряток ($p = 0.03$) (табл. 2). Различий по относительному уровню экспрессии *elovl5a* между экспериментальными группами у пестряток и у смолтов в марте установлено не было. Показано, что относительный уровень экспрессии гена *elovl4* стремился к нулю как у пестряток, так и у смолтов (пороговый уровень $C_T > 33$), в связи с этим полученные по этому гену данные не использовались в сравнительном аспекте.

Установлено, что у смолтов лосося в августе относительный уровень экспрессии генов *fadsd5* (0.28 vs 0.20, $p = 0.02$) и *elovl5a* (0.51 vs 0.32, $p = 0.001$) был выше по сравнению с таковым у смолтов в марте, тогда как elovl2 наоборот был ниже (0.05 vs 0.17, $p = 0.00001$) (рис. 2).

Таблица 2. Относительный уровень экспрессии генов (у. уд.) *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a* в печени пестряток и смолтов (0+) атлантического лосося в марте, выращиваемого в группах с разными режимами освещения и кормления

Ген	Пестрятки			Смолты		
	24LD+ KK	ЕстLD+ КД	24LD+ КД	24LD+ KK	ЕстLD+ КД	24LD+ КД
	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
fadsd5	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.25 ± 0.05	0.13 ± 0.02*	0.22 ± 0.04
fadsd6	0.46 ± 0.12	0.25 ± 0.08	0.36 ± 0.08	0.42 ± 0.10	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.04
elovl2	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.22 ± 0.07^	0.15 ± 0.03	0.24 ± 0.05
elovl5a	0.13 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.06	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.02

Примечание. * – различия достоверны ($p \leqslant 0.05$) по сравнению с рыбами из группы "24LD+KK"; ^ – различия достоверны ($p \leqslant 0.05$) по сравнению с пестрятками из соответствующей группы.

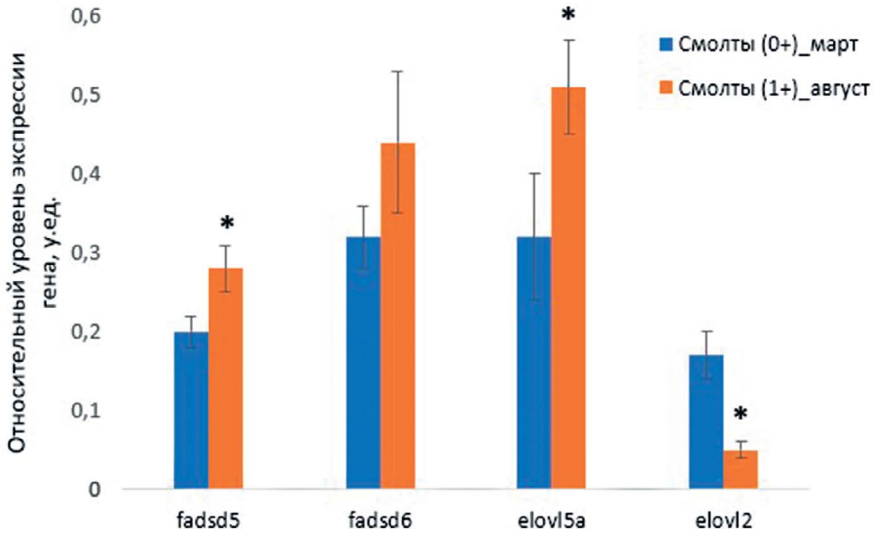

Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов (у. ед.) *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a* в печени смолтов (0+, 1+) атлантического лосося в марте и августе.

* – различия достоверны ($p \leqslant 0.05$) по сравнению со смолтами в марте.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пресноводные рыбы и диадромные из сем. Лососевые, в том числе атлантический лосось, способные к биосинтезу длинноцепочечных ПНЖК, должны проявлять всю ферментативную активность, необходимую для этого процесса (Morais *et al.*, 2009; Tocher, 2010; Monroig *et al.*, 2011). Атлантический лосось выделяется среди других рыб наличием 4 копий гена *fads2*, кодирующего десатуразы, и их особой функционализацией, когда одна копия гена несет информацию о ферменте с Δ5 десатуразной активностью, а другие кодируют информацию о десатуразе с Δ6 активностью (Hastings *et al.*, 2004; Monroig *et al.*, 2022). Фермент десатураза Δ5 важен на этапе биосинтеза ЭПК из 20:4(n-3) ЖК и арахидоновой кислоты 20:4(n-6) из 20:3(n-6), а Δ6 десатураза способствует биосинтезу ПНЖК из 18:2(n-6) ЖК и из 18:3(n-3), а также длинноцепочечных 24С ЖК, являющихся предшественниками в биосинтезе ДГК по пути Шпрехера (Sprecher *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2021) (рис. 1). Ранее в рамках данного эксперимента у молоди *S. salar* был установлен высокий уровень ПНЖК n-3 семейства в структурных липидах – фосфолипидах (ФЛ) (более 30% суммы ЖК) и показано повышение содержания ПНЖК в составе запасных триацилглицеринов (ТАГ) в печени от пестряток к смолтам в марте, что указывает на биохимические изменения в организме рыбы на этапе подготовки к смолтификации (Khurtina *et al.*, 2024).

В настоящей работе установлено, что относительный уровень экспрессии гена *fadsd6*, кодирующего Δ6 десатуразу, у *S. salar* был высоким и оставался на относительно стабильном уровне как у пестряток, так и у смолтов, независимо от месяца исследования. Значение относительного уровня экспрессии гена *fadsd5*, кодирующего Δ5 десатуразу, достоверно не различалось при сравнении пестряток и смолтов в марте. При этом следует отметить обнаруженные вариации значений у смолтов в марте: более низкий относительный уровень экспрессии *fadsd5* у рыб из группы “ЕстLD+КД” по сравнению с группой “24LD+КК”. Данные ЖК профиля (ФЛ и ТАГ) по содержанию ЭПК, которая образуется под действием Δ5 десатуразы из 20:4(n-3) (рис. 1), не выявили достоверных различий у рыб этих групп. Однако количество ЭПК в ФЛ у смолтов лосося из группы “24LD+КК” было на 1% выше (24% суммы ЖК), чем у рыб из “ЕстLD+КД” (23%) (Khurtina *et al.*, 2024). В ТАГ содержание ЭПК было в 2 раза ниже, чем в ФЛ (менее 10%), и достоверно не различалось у рыб из данных групп (Khurtina *et al.*, 2024). Полученные результаты могут способствовать предпочтительному прикладному использованию режима “24LD+КК” при выращивании *S. salar* в аквакультуре, который, как ранее было установлено, также повышает темпы роста и развития его молоди.

Способность к биосинтезу длинноцепочечных ПНЖК у рыб варьирует и во многом зависит не только от набора генов ферментов десатураз, но также элонгаз (Elovl) (Morais *et al.*, 2009; Monroig *et al.*, 2022). Среди них именно элонгазы *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5* задействованы в этом процессе (рис. 1) и наиболее изучены у коммерчески значимых рыб (Jakobsson *et al.*, 2006; Monroig *et al.*, 2011). Другие представители

семейства элонгаз *Elovl1*, *Elovl3*, *Elovl6*, *Elovl7* участвуют в синтезе насыщенных и мононенасыщенных ЖК, в том числе у рыб (Jakobsson *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2016). Ген элонгазы *Elovl8* был обнаружен у пресноводного африканского клариевого сома *Clarias gariepinus* (Oboh, 2018) и сигана *Siganus canaliculatus* (Li *et al.*, 2020), на основе исследования которых было подтверждено участие этого фермента в биосинтезе ПНЖК. Сведения о его присутствии у *S. salar* пока отсутствуют (Monroig *et al.*, 2022). У атлантического лосося были определены и функционально охарактеризованы *Elovl2*, *Elovl4*, *Elovl5*, наличие которых совместно с десатуразами с активностью Δ5 и Δ6 объясняют способность *S. salar* биосинтезировать ДЦ-ПНЖК, включая ДГК (Morais *et al.*, 2009; Carmona-Antoñanzas *et al.*, 2011). В случае отсутствия одного из ключевых генов биосинтеза ПНЖК или низкого уровня его экспрессии рыба не может биосинтезировать эти ЖК, как, например, у колючеперых рыб при отсутствии *elovl2* (Morais *et al.*, 2009). Функциональная характеристика полипептидов, кодируемых генами *elovl2* и *elovl5*, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показала, что *Elovl2* имеет большую по сравнению с *Elovl5* субстратную специфичность к ПНЖК с длиной цепи С20 и С22 и низкую по отношению к ПНЖК с длиной цепи С18 (Morais *et al.*, 2009). *Elovl4* играет важную роль в биосинтезе ЖК с 22 и более атомами углерода в цепи (Carmona-Antoñanzas *et al.* 2011).

В данной работе у смолтов лосося в марте относительный уровень экспрессии *elovl2* был выше по сравнению с пестрятками, что согласуется с данными ЖК анализа, а именно повышением от пестряток к смолтам содержания ДГК в составе ФЛ, тогда как в составе ТАГ повышается количество докозапентаеновой кислоты 22:5(n-3) (ДПК) у групп лосося с кормлением в светлое время суток (Khurtina *et al.*, 2024). Известно, что у костистых рыб ДПК образуется из ЭПК под действием элонгаз, в том числе *Elovl2* (рис. 1). Полученные результаты исследований могут указывать на биосинтез ДГК у *S. salar* в печени по пути Шпрехера и отражают запуск на молекулярно-генетическом уровне адаптивных изменений, связанных с биосинтезом и включением ПНЖК в отдельные липидные классы (ДГК – в ФЛ, а ДПК – в ТАГ) согласно их функциональному значению в клетке и в ответ на воздействие факторов окружающей среды при трансформации пестряток в смолтов.

Для атлантического лосося известно также влияние питания на экспрессию генов и активность ферментов биосинтеза ДЦ-ПНЖК (Morais *et al.*, 2009; Monroig *et al.*, 2011). Так, уровни *elovl5b* и особенно *elovl2*, но не *elovl5a*, были значительно повышены в печени лосося, которого кормили растительным маслом, по сравнению с рыбами, которых кормили рыбьим жиром (Morais *et al.*, 2009). Питание растительными кормами (по сравнению с кормами, богатыми ДГК и ЭПК) стимулирует экспрессию Δ6 десатуразы в печени и кишечнике лосося (Zheng *et al.*, 2004, 2005a,b; Leaver *et al.*, 2008).

В данной работе показано, что относительный уровень экспрессии гена *elovl 4* в печени *S. salar* был низким у всех исследованных групп лосося. Известно, что Elovl 4 играет важную роль в биосинтезе ДЦ-ПНЖК с ⩾24 С в цепи, высокое содержание которых было показано в сетчатке глаз, мозге и семенниках у атлантического лосося (Carmona-Antoñanzas *et al.* 2011; Harkewicz *et al.*, 2012). Так, установленный низкий уровень относительной экспрессии *elovl4* в печени молоди *S. salar* отражает тканеспецифичность работы гена, а также указывает на значимую роль *Elovl2* на этапе образования 24:5(n-3) из 22:5(n-3) ЖК.

Снижение относительного уровня экспрессии *elovl2* и повышение *elovl5a* и *fadsd5*, установленное у смолтов лосося в августе, по сравнению со смолтами в марте может быть обусловлено влиянием изменившихся в июне условий содержания, а также быть связано с процессами роста и развития рыбы. В августе рыбы содержались при естественном освещении и кормлении в светлое время суток, так же как и в марте, но при этом средняя температура воды была значительно выше (16 °С vs 11 °С), что может выделять влияние этого фактора как одного из ведущих. В ряде работ показано влияние температуры на регуляцию экспрессии генов биосинтеза ПНЖК у молоди рыб (Tocher *et al.*, 2004; Norambuena *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2023). Известно, что на метаболизм арахидоновой 20:4(n-6) ЖК и ЭПК у молоди атлантического лосося в совокупности могут оказывать температура и поступление этих кислот при питании (Norambuena *et al.*, 2015).

Таким образом, значения экспрессии гена *fadsd6* десатуразы достоверно не различались между экспериментальными группами рыб. У смолтов *S. salar* в марте из группы “24LD+KK” (круглосуточное освещение и кормление) был установлен достоверно более высокий относительный уровень экспрессии *fadsd5* в сравнении с рыбами из группы “ЕстLD+КД” (естественное освещение и питание в светлое время суток), что может способствовать предпочтительному прикладному использованию “24LD+KK” в технологии выращивания молоди лосося в аквакультуре, при котором наблюдаются повышенные темпы роста рыбы.

Установленный достоверно более высокий уровень экспрессии гена фермента элонгазы *elovl2,* ключевого фермента на пути биосинтеза ДПК и далее ДГК по пути Шпрехера, у смолтов лосося в марте по сравнению с пестрятками соотносится с полученными в рамках этого же эксперимента данными ЖК состава ФЛ и ТАГ в печени молоди

атлантического лосося (в ФЛ у смолтов повышается содержание ДГК, а в ТАГ – ЭПК). Изменения в экспрессии исследованных генов (*elovl2, elovl5a и fadsd5)* у смолтов лосося в августе по сравнению с таковым в марте отражают адаптивные процессы в организме рыб на молекулярно-генетическом уровне в процессе роста и развития и в ответ на изменения условий окружающей среды.

Результаты исследования позволяют оценить способность/потребность молоди лосося к биосинтезу ПНЖК в процессе роста и развития.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена в рамках проекта Российского научного фонда № 19-14-00081-П “Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика”, а также государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ЭТИЧЕСКИЕ СТАНДАРТЫ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах были соблюдены. Эксперименты одобрены комиссией по биоэтике Института биологии КарНЦ РАН, заключение № 5 от 4 апреля 2024 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Власов В.А., Маслова Н.И., Пономарев С.В., Баканева Ю.М. Влияние света на рост и развитие рыб // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2013. № 2. С. 24–34.

Мурзина С.А., Нефедова З.А., Руоколайнен Т.Р., Васильева О.Б., Немова Н.Н. Динамика содержания липидов в процессе раннего развития пресноводного лосося *Salmo salar* L. // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 3. С. 208–214.

Мурзина С.А., Провоторов Д.С., Воронин В.П., Кузнецова М.В., Курицин А.Е., Немова Н.Н. Показатели липидного обмена у сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* в условиях аквакультуры в южном регионе РФ при разных режимах освещения и кормления // Известия РАН. Серия Биологическая. 2023а. № 2. С. 134–148.
DOI: 10.31857/S1026347022700081

Мурзина С.А., Провоторов Д.С., Воронин В.П., Манойлова Д.И., Курицин А.Е., Пеккоева С.Н., Немова Н.Н. Фосфолипидный состав сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* в процессе роста и развития в аквакультуре: влияние разных режимов освещения и кормления // Доклады российской академии наук. Науки о жизни. 2023б. Т. 509. С. 181–185.
DOI: 10.31857/S2686738923700397

Немова Н.Н., Нефедова З.А., Мурзина С.А., Веселов А.Е., Рипатти. П.О., Павлов Д.С. Влияние экологических условий обитания на динамику жирных кислот у молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.) // Экология. 2015. № 3. С. 206–211.
DOI: 10.7868/S0367059715030087

Khurtina S.N., Murzina S.A., Provotorov D.S., Voronin V.P., Kuritsyn A.E., Nemova N.N. Fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L: grown under different and feeding conditions in aquaculture conditions (North Ossetia – Alania) // Russian Journal of Developmental Biology. 2024 (в печати).

Шульгина Н.С., Чурова М.В., Немова Н.Н. Влияние фотопериода на рост и развитие лососевых *Salmonidae* северных широт // *Журнал общей биологии*. 2021. Т. 82. №1. С. 68–80.
DOI: 10.31857/S0044459621010073

Эколого-биохимический статус молоди атлантического лосося Salmo salar L. из некоторых рек бассейна Белого моря / Под общ. ред. Н.Н. Немовой. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2016. 204 с.

Berrill I.K., Porter M.J., Smart A., Mitchell D., Bromage N.R. Photoperiodic effects on precocious maturation, growth and smoltification in Atlantic salmon, *Salmo salar* // Aquaculture. 2003. V. 222. № 1–4. P. 239–252.
DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00125-X

Berrill I.K., Smart A., Porter M.J., Bromage N.R. A decrease in photoperiod shortly after first feeding influences the development of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Aquaculture. 2006. V. 254. № 1–4. P. 625–636.
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.10.036

Björnsson B.T., Stefansson S.O., McCormick S.D. Environmental endocrinology of salmon smoltification // General and comparative endocrinology. 2011. V. 170. № 2. P. 290–298.
DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.07.003

Bláhová Z., Harvey T.N., Pšenička M., Mráz J. Assessment of fatty acid desaturase (Fads2) structure-function properties in fish in the context of environmental adaptations and as a target for genetic engineering // Biomolecules. 2020. V. 10. №2. P. 206.
DOI: 10.3390/biom10020206

Carmona-Antoñanzas G., Monroig Ó., *Dick J.R., Davie A., Tocher D.R.* Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C> 24) in Atlantic salmon: Cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an Elovl4 elongase // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2011. V. 159. №.2. P. 122–129. DOI: 10.1016/j.cbpb.2011.02.007

Castro L.F.C., Tocher D.R., Monroig O. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire // Progress in lipid research. 2016. V. 62. P. 25–40. DOI: 10.1016/j.plipres.2016.01.001

Hansen T., Stefansson S., Taranger G.L. Growth and sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in sea cages at two different light regimes // Aquac. Fish. Manage. 1992. V. 23. № 3. P. 275–280. DOI: 10.1111/j.1365-2109.1992.tb00770.x

Hastings N., Agaba M.K., Tocher D.R., Zheng X., Dickson C.A., Dick J.R., Teale A.J. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from α-linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Marine Biotechnology. 2004. V. 6. P. 463–474. https://doi.org/10.1007/s10126-004-3002-8

*Harkewicz R., Du H., Tong Z., Alkuraya H., Bedell M., Sun W., Wang X., Hsu Y-H., Esteve-Rudd J., Hughes G., Su Z., Zhang M., Lopes V.S., Molday R.S., Williams D.S., Dennis E.*A., *Zhang K.* Essential role of ELOVL4 protein in very long chain fatty acid synthesis and retinal function // Journal of Biological Chemistry. 2012. V. 287. №14. P. 11469–11480. DOI: 10.1074/jbc.M111.256073

Imsland A.K.D., Roth B., Fjelldal P.G., Stefansson S.O., Handeland S., Mikalsen B. The effect of continuous light at low temperatures on growth in Atlantic salmon reared in commercial size sea pens // Aquaculture. 2017. V. 479. P. 645–651. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.014

Guillou H., Zadravec D., Martin P.G., Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice // Progress in lipid research. 2010. V. 49. № 2. P. 186–199. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.12.002

Jakobsson A., Westerberg R., Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism // Prog. Lipid Res. 2006. V. 45. P. 237–249. DOI: 10.1016/j.plipres.2006.01.004

Leaver M.J., Villeneuve L.A.N., Obach A., Jensen L., Bron J.E., Tocher D.R., Taggart J.B. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 299. DOI: 10.1186/1471-2164-9-299.

Leclercq E., Taylor J.F., Sprague M., Migaud H. The potential of alternative lighting-systems to suppress preharvest sexual maturation of 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts reared in commercial sea-cages // Aquac. Eng. 2011. V. 44. № 2. P. 35–47. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2010.12.001

Li Y., Wen Z., You C., Xie Z., Tocher D.R., Zhang Y., Wang S., Li Y. Genome wide identification and functional characterization of two LC-PUFA biosynthesis elongase (*elovl8*) genes in rabbitfish (*Siganus canaliculatus*) // Aquaculture. 2020. V. 522. 735127. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735127

Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method // Methods. 2001. V. 25. №4. P. 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Miao L.H., Remø S.C., Espe M., Philip A.J.P., Hamre K., Fjelldal P.G., Skjærven K., Holen E., Vikeså V. , *Sissener N.H.* Dietary plant oil supplemented with arachidonic acid and eicosapentaenoic acid affects the fatty acid composition and eicosanoid metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during smoltification // Fish & Shellfish Immunology. 2022. V. 123. P. 194–206. DOI:10.1016/j.fsi.2022.02.049

Monroig Ó., Shu-Chien A.C., Kabeya N., Tocher D.R., Castro L.F.C. Desaturases and elongases involved in long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic animals: From genes to functions // Progress in Lipid Research. 2022. V. 86. Article ID101157. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101157

Monroig Ó., Zheng X., Morais S., Leaver M.J., Taggart J.B., Tocher D.R. Multiple genes for functional Δ6 fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 180. P. 1072–1081. DOI: 10.1016/j.bbalip.2010.04.007

Monroig O., Navarro C., *Tocher D.R.* Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Fish: Recent Advances on Desaturases and Elongases Involved in Their Biosynthesis. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L.(Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI –Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23–25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 2011. pp. 257–283.

Morais S., Monroig Ó., *Zheng X., Leaver M.J., Tocher D.R.* Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of *Elovl5*- and *Elovl2*-like elongases // Mar. Biotechnol. 2009. V. 11. P. 627–639. DOI: 10.1007/s10126-009-9179-0

Nemova N.N., Murzina S.A., Lysenko L.A., Meshcheryakova O.V., Churova M.V., Kantserova N.P., Nefedova Z.A.,

Krupnova M.Yu., Pekkoeva S.N., Ruokolainen T.R., Veselov A.E., Efremov D.A. Ecological and biochemical status of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. and the brown trout *Salmo trutta* L. at early stages of development // Biology bulletin reviews. 2020. V. 10. P. 239–249.

Noori A., Mojazi Amiri B., Mirvaghefi A., Rafiee G., Kalvani Neitali B. Enhanced growth and retarded gonadal development of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) following a long-day photoperiod // Aquac. Res. 2015. V. 46. № 10. P. 2398–2406. DOI: 10.1111/are.12398

Norambuena F., Morais S., Emery J.A., Turchini G.M. Arachidonic acid and eicosapentaenoic acid metabolism in juvenile Atlantic salmon as affected by water temperature // PLoS One. 2015. V. 10. № 11. e0143622. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143622

Oboh A. Investigating the long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). PhD Thesis. University of Stirling, 2018.

Ren H.T., Gao S.Y., Huang Y., Gao X.C. Temperature regulates fatty acid desaturase and elongase at the transcriptional level and modulates the fatty acid profile in the early stage of the common carp (*Cyprinus carpio*) // Czech J. Anim. Sci. 2023. V. 68. P. 313–321. DOI: 10.17221/22/2023-CJAS

Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated *n*-3 and *n*-6 fatty acids // Biochim Biophys Acta. 2000. V. 1486. P. 219–231. DOI: 10.1016/s1388-1981(00)00077-9

Tocher D.R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish // Rev Fisheries Sci. 2003. V. 11. P. 107–184. DOI: 10.1080/713610925

Tocher D.R., Fonseca-Madrigal J., Dick J.R. Effects of water temperature and diet containing palm oil on fatty acid desturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Comp Biochem Physiol B. 2004. V. 137. №1. P. 49–63. DOI: 10.1016/j.cbpc.2003.10.002

Tocher D.R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish // Aquaculture research. 2010. V. 41. № 5. P. 717–732. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x

Vestergren A.S. Regulation of Genes related to Lipid Metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Vitro and In Vivo Studies. Licentiate Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2012.

Vestergren A.S., Trattner S., Mráz J., Ruyter B., Pickova J. Fatty acids and gene expression responses to bioactive compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes // Neuro Endocrinol Lett. 2011. V. 32 (Suppl 2). P. 41–50.

Villarreal C.A., Thorp J.E., Miles M.S. Influence of photoperiod on growth changes in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. // Journal of Fish Biology. 1988. V. 33. №1. P. 15–30. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1988.tb05445.x

Xie D., Chen C., Dong Y., You C., Wang S., Monroig Ó., Tocher D.R., Li Y. Regulation of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish // Progress in Lipid Research. 2021. V. 82, 101095. DOI: 10.1016/j.plipres.2021.101095

Zheng X., Tocher D.R., Dickson C.A., Bell J.G., Teale A.J. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Aquaculture 2004. V. 236. P. 467–483. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.02.003

Zheng X., Tocher D.R., Dickson C.A., Dick J.R., Bell J.G., Teale A.J. Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterisation of a Δ6 desaturase of Atlantic salmon // Lipids. 2005a. V. 40. P. 13–24. DOI: 10.1007/s11745-005-1355-7

Zheng X., Torstensen B.E., Tocher D.R., Dick J.R., Henderson R.J., Bell J.G. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturases and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Biochim Biophys Acta. 2005b. V. 1734. P. 13–24. DOI: 10.1016/j.bbalip.2005.01.006

Influence of different lighting and feeding regimes on the expression of the *fadsd5*, *fadsd6*, *elovl2*, *elovl5a* desaturase and elongase genes in the liver of juvenile Atlantic Salmon *Salmo salar* L. under aquaculture conditions

S. N. Khurtina#, S. A. Murzina, M. V. Kuznetsova, N. N. Nemova

Environmental Biochemistry Laboratory, Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, st. Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, 185910 Russia
#E-mail: pek-svetlana@mail.ru

The relative gene expression of enzymes – desaturases and elongases (fadsd5, fadsd6, elovl2, elovl5a, elovl4), which play a key role in the biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids, was studied in the liver of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* Linnaeus, 1758, reared under different lighting and feeding regimes in aquaculture conditions. The expression level of the *fadsd5* desaturase gene was higher in Atlantic salmon smolts (0+), reared under round-the-clock lighting and feeding regime, compared to smolts from experimental group with natural photoperiod and daylight feeding. Changes in the level of gene expression (*elovl2, elovl5a, fadsd5*) in juvenile *Salmo salar* reflect adaptive processes at the molecular genetic level during the growth and development of fish and in response to changes in environmental conditions. The obtained results make it possible to assess the ability/requirement to the biosynthesis of PUFAs in juvenile salmon during its growth and development.

Keywords: Atlantic salmon, gene expression, desaturases, elongases, fatty acids, smoltification, early development, aquaculture