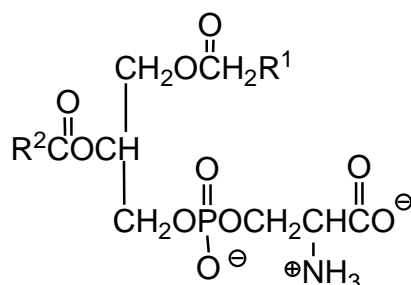


ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА**А.И. Василькевич, О.Л. Шарко, М.А. Кисель, А.И. Зинченко****Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***Введение**

Фосфатидилсерин (ФС) – фосфолипид, присутствующий в мембранах эукариотических и прокариотических клеток. Впервые фосфатидилсерин был идентифицирован Фолчем как отдельный компонент кефалина мозга в 1941 году [1]. В 1952 году Байер и Маурукас подтвердили химическую структуру ФС с помощью химического синтеза [2]. Фосфатидилсерин представляет собой *sn*-1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин. При этом в биологических источниках в *sn*-1 положении преимущественно находится насыщенная жирная кислота, а в *sn*-2 – ненасыщенная. Химическая структура фосфатидилсерина показана на рисунке 1.

Рисунок 1 – *sn*-1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин

В животных клетках жирнокислотный состав ФС не одинаков и отличается от жирнокислотного состава его предшественников. Это может быть связано с селективным участием в реакции биосинтеза, либо с перегруппировкой липидов во время реакции деацилирования-реацилирования с лизофосфатидилсерином в качестве промежуточного продукта. В плазме крови человека преобладают 1-стеароил-2-олеоильные и 1-стеароил-2-арахидоноильные производные, в то время как в тканях мозга, сетчатки глаза и прочих присутствуют 1-стеароил-2-докозагексаноильные производные. При этом в мозге человека 36% жирнокислотных остатков приходится на долю докозагексаеновой кислоты [3, 4]. Таким образом, содержание *n*-3 и *n*-6 ненасыщенных жирных кислот в ФС намного выше, чем в большинстве других липидов.

По данным Avanti Polar Lipids коммерческий ФС из разных источников имеет следующий состав:

Таблица 1 – Жирнокислотный состав фосфатидилсерина сои и мозга быка

	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4	22:6	Другие
ФС мозга быка	–	42	30	–	–	2	11	15
ФС сои	10	3	12	68	7	–	–	–

Биологические функции ФС чрезвычайно разнообразны. Инициация ряда важных физиологических процессов вызывает перемещение ФС с внутренней на внешнюю поверхность плазматической мембраны животных клеток («флип-флоп»). В частности, хорошо описан процесс такого перемещения ФС на ранних стадиях апоптоза. «Флип-флоп» ФС на поверхность апоптотических клеток является сигналом для распознавания их специфическими рецепторами ФС, экспрессируемыми на поверхности фагоцитарных клеток, и последующего поглощения последними погибающих клеток [5].

Кроме хорошо изученных внутримембранных функций ФС, данный фосфолипид вовлечен в ряд внутриклеточных процессов. ФС является предшественником фосфатидилэтаноламина (ФЭ) благодаря наличию митохондриального фермента фосфатидилсериндекарбоксилазы.

Кроме функции как компонента клеточных мембран и предшественника других липидов ФС является эссенциальным кофактором, активирующим протеинкиназу С, которая является ключевым ферментом сигнальной трансдукции. Активность всех изоформ этого фермента строго зависит от ФС. Он также участвует в функционировании таких ферментов как Na^+/K^+ АТФаза, нейтральная сфингомиелиназа, динамин-1, аннексин V [6–8].

ФС – главный кислотный фосфолипид мозга. Наряду с другими фосфолипидами составляет структуру клеточных мембран. Эти мембранные фосфолипиды играют важную роль в межклеточном сообщении и передаче в клетку биохимических сигналов. Правильное функционирование этих процессов является необходимым для организма человека, особенно для центральной нервной системы. Считается, что ФС улучшает клеточную коммуникацию и метаболизм, оказывая влияние на текучесть клеточных мембран [9]. Доказано, что применение ФС в качестве пищевой добавки влияет на нейронные мембраны и функцию специфических нейротрансмиттеров, включая ацетилхолин, серотонин и дофамин [10, 11].

Получение фосфатидилсерина

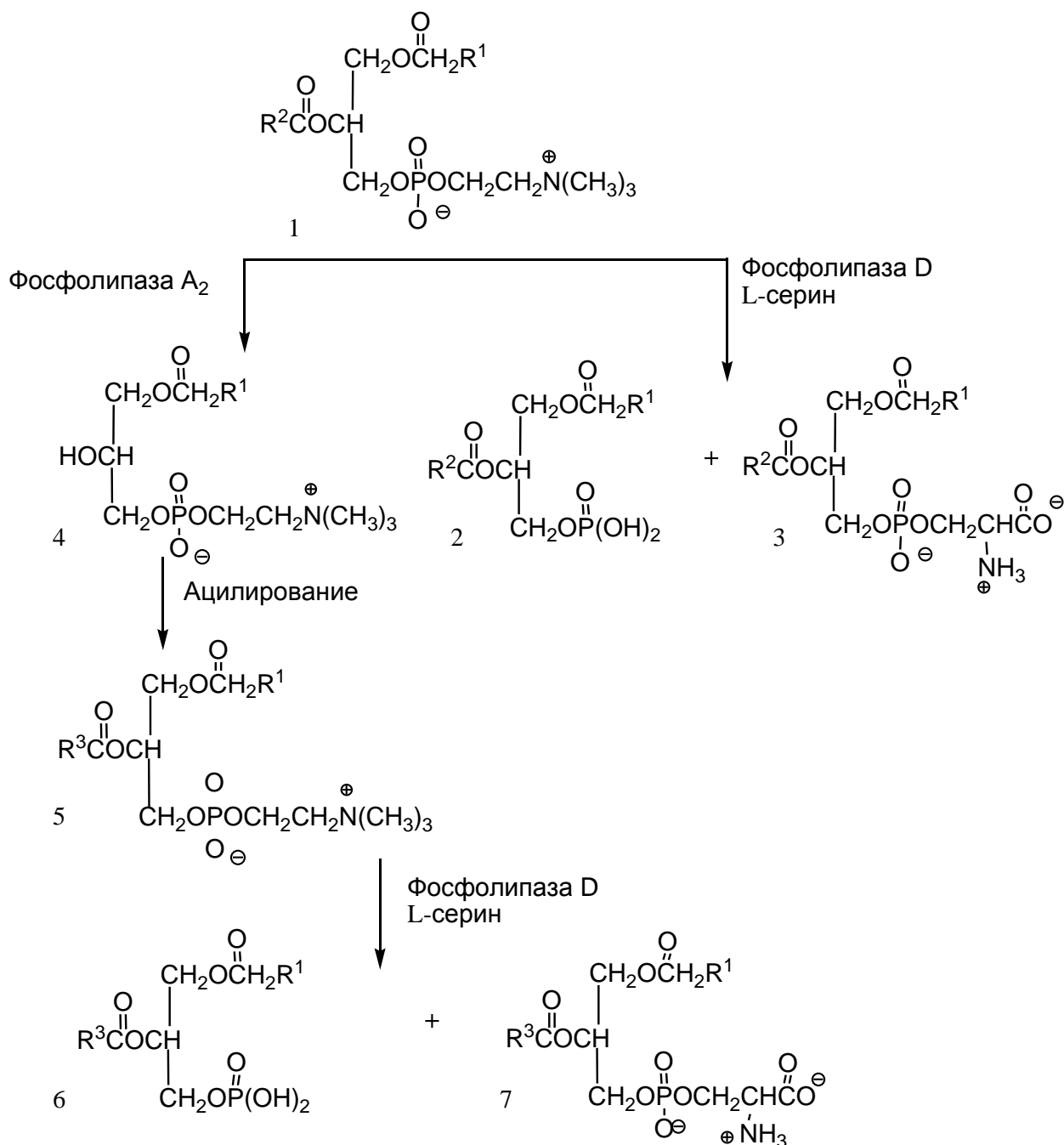
В настоящее время существует, по крайней мере, три подхода к решению проблем получения фосфолипидов. Во-первых, выделение фосфолипидных фракций и их смесей из природного сырья с использованием биотехнологических приемов, во-вторых, химический синтез из низкомолекулярных исходных соединений и, наконец, ферментативный синтез из более распространенных фосфолипидов и их предшественников.

Синтетические исследования в ряду фосфолипидов проводятся на протяжении многих лет. В ходе этих работ классическими методами биоорганической химии осуществлены синтезы фосфолипидов всех структурных типов [12]. Синтетические методы получения фосфолипидов дали возможность создать все известные типы этих веществ в индивидуальной форме. Следует отметить, что эти методы отличаются многостадийностью (иногда до 25 стадий), трудоемкостью выделения индивидуальных веществ и завершаются получением целевых соединений в небольших количествах [13]. Препаративное значение этих методов невысоко. Роль этого направления заключается в том, что оно дало возможность решить проблемы установления структуры фосфолипидов, т.е. задачу окончательного установления их строения, синтезировать модифицированные ранее неизвестные фосфолипиды. Все это позволило связать структуры фосфолипидов с их функциями, предсказывать их биологическое значение, в частности, с помощью компьютерных расчетов. Примером таких методов является синтез ФС, позволяющий получать его в крупномасштабных количествах, в частности из диацилглицерина с использованием защищенного серина и О-бензилфосфородиамидита [14].

Ранее ФС как субстанцию пищевой добавки получали прямой экстракцией из мозга быка с дальнейшим его отделением от прочих фосфолипидов [15]. После ряда стадий фракционирования удается выделить ФС 92%-ной чистоты. Однако в настоящее время, в связи с возросшей угрозой контаминации продуктов из мозга коров возбудителями ряда заболеваний (например, коровьего бешенства), предпочтительным сырьем для экстракции ФС являются соевые бобы. В то же время в соевых бобах ФС составляет менее 1% от их веса [16].

Более перспективным представляется полусинтетический подход к получению фосфолипидов на основе доступного природного лецитина (рисунок 2). На ключевых стадиях используются ферменты фосфолипидного метаболизма – фосфолипазы А₂ и D. Этим методом синтезируются фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилэтаноламин, ФС, фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин с различным жирнокислотным составом. Исходными фосфолипидами могут выступать фосфолипиды, полученные прямой

экстракцией из биологического сырья (желательно растительного происхождения), либо отходы процесса рафинации растительных масел (фосфолипидный концентрат на стадии гидратации).



1, 5 – ФХ, 2, 6 – ФК, 3, 7 – ФС, 4 – лизо-ФХ

Рисунок 2 – Полусинтетический метод получения фосфолипидов

Выход целевого фосфолипида по реакции трансфосфатидилирования зависит от используемого фермента и среды проведения реакции. Для проведения данной реакции используется ряд бактериальных фосфолипаз D, таких видов микроорганизмов как *Streptomyces hachijoensis*, *Streptomyces chromofuscus*, *Streptoverticillium cinnamomeum*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces antibioticus* [17]. Относительно недавно в Институте микробиологии НАН Беларуси была выделена фосфолипаза D из культуральной жидкости штамма *Streptomyces netropsis* [18]. Возможно применение ферментов из растительных

источников (например, из белокочанной капусты), однако они имеют узкий диапазон структурных требований к субстрату и акцептору [17].

Для растворения субстрата и продукта в подходящих концентрациях используют эмульсионные системы. Так, в случае получения ФС фосфолипиды растворены в органической фазе (хлороформ, диэтиловый эфир, этилацетат и др.), тогда как в водно-буферной находятся фермент и акцептор L-серин. Для активации фермента в водную фазу вводится Ca^{2+} в концентрации 20–100 мМ.

Перспективным направлением оптимизации реакции трансфосфатидилирования является поиск среды для проведения реакции. Наличие в реакционной среде воды повышает степень гидролиза и увеличивает содержание нежелательной ФК. Возможным решением этой проблемы является использование ионных жидкостей, в частности органических солей, состоящих только из ионов при комнатной температуре. Степень селективности ФС/ФК при использовании таких сред достигает 200. Ионные жидкости ингибируют нежелательный гидролиз, что упрощает получение чистого продукта реакции трансфосфатидилирования. Стоит отметить, что данное направление является малоизученным, и отсутствуют данные о влиянии ионных жидкостей на активность фосфолипазы D [19].

Применение

Известно, что до 50% людей старше 65 лет заметно теряют свои умственные способности, что проявляется при решении таких повседневных задач, как употребление слов, запоминание имён, поддержание активной умственной деятельности. Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные, с одной стороны, свидетельствуют, что возрастное снижение умственных функций происходит параллельно с уменьшением в мозге содержания ФС [10]. С другой стороны, клинические исследования за рубежом показали, что применение ФС здоровыми взрослыми и пожилыми людьми приводит к значительным сдвигам в запоминании информации, объёме памяти, в том числе зрительной, поднятии угнетённого настроения. Он восстанавливает познавательные, эмоциональные, поведенческие симптомы, улучшает краткосрочную память, концентрацию внимания, снимает депрессивные симптомы, уменьшает апатию и отход от активного образа жизни [20].

ФС содержится в мембранах всех клеток тела и более всего в мозге и может рассматриваться как питательное вещество для мозга. Это вещество может проходить через гематоэнцефалический барьер и проникать в мозг через несколько минут после его приема. Следует отметить, что невозможно пополнять запасы ФС в организме за счет питания, хотя он содержится во всех пищевых продуктах, но лишь в микроскопических количествах.

Таким образом, ФС – весьма эффективное средство для терапии и профилактики потери памяти в пожилом возрасте. Однако за рубежом препараты на основе ФС рекомендуются не только пожилым людям. Он также необходим людям, занимающимся умственным трудом, школьникам, студентам, тем, кто испытывает постоянное давление стрессов и, вообще, в профилактических целях всем, кто хочет содержать свой мозг в состоянии работоспособности на протяжении всей своей жизни [21, 22]. Считается, что изменение распределения ФС в мембранах мозга сопутствует развитию болезни Альцгеймера, и потому больным прописывают ФС-содержащие пищевые добавки [23]. Применение ФС, содержащего омега-3 ненасыщенные жирные кислоты, также позволяет снизить синдром дефицита внимания и гиперактивности у детей [24]. Кроме того, использование ФС и докозагексаеновой кислоты защищает ткани мозга от окислительного стресса, вызванного эпилепсией [25].

При обширных клинических исследованиях ФС не сообщается о каких-либо побочных эффектах даже при его длительном применении [26, 27].

Отдельно стоит выделить использование ФС в спортивной реабилитации. Перетренированность является серьезной проблемой для спортсменов, т.к. она снижает почти все физические показатели, повышает риск травмы, ухудшает эмоциональное

состояние. Хроническая перетренированность приводит к нарушению соотношения гормонов тестостерона и кортизола [2]. Применение ФС способствует более быстрому восстановлению организма после нагрузок за счет снижения уровня кортизола [28]. Показано, что при этом достигаются следующие результаты:

- выносливость велосипедистов повышается на 30–35%,
- индекс мышечных болей тяжелоатлетов снижается примерно на 50%,
- у бегунов снижается активность креатин киназы на 50–60%,
- у всех спортсменов снижается уровень психического стресса.

Транслокация ФС на внешнюю поверхность клеточной мембраны является одним из сигналов апоптоза. В связи с этим ФС может рассматриваться как биомаркер апоптотических клеток и мишень для введения противораковых и противовирусных препаратов, связанных со специфичными к ФС белками (аннексин А5, синаптотегмин I, лактадерин и другие [29, 30]. Вместе с тем отсутствуют данные о побочных эффектах такого лечения [31].

ФС также применяется в составе липосом как фармакологических препаратов. Принцип действия таких липосом заключается в имитации апоптотических клеток, которые индуцируют секрецию простагландина E₂, либо ингибируют экспрессию противовоспалительных генов [32–36].

Выводы

ФС является перспективным биологически активным веществом для фармацевтической промышленности. Данный фосфолипид имеет множественные положительные свойства и может использоваться и в качестве пищевой добавки, и в качестве терапевтического средства. При этом побочных эффектов при его оральном применении не обнаружено. Стоит отметить, что биологические свойства ФС зависят от его жирнокислотного состава. Наличие ненасыщенных кислот повышает биологическую активность фосфолипида.

Современные методики синтеза дают возможность получения ФС с заданным составом. Для этого применяют фосфолипазы D и A₂. Такие способы являются относительно нетрудоемкими, дешевыми и экологически безопасными, тогда как прямая экстракция фосфолипида из растительного и животного сырья требует значительных затрат растворителей.

Список литературы

1. Folch, J. An amino acid constituent of ox brain cephalin / J. Folch // J Biol Chem. – 1941 – Vol. 137, №1. – P. 51–62.
2. Synthesis of Enantiomeric α -Cephalins 1,2. / E. Baer [et al.] // J Am Chem Soc. – 1952. – Vol. 74, №1. – P. 152–157.
3. Phosphatidyl serine / E. Baer [et al.] // J. Biol. Chem. – 1955. – Vol. 212, №1. – P. 25–38.
4. Unique molecular signatures of glycerophospholipid species in different rat tissues analyzed by tandem mass spectrometry / A.M. Hicks [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2006. – Vol. 1761, №9. – P. 1022–1029.
5. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages / V.A. Fadok [et al.] // J Immunol. – 1992. – Vol. 148, №7. – P. 2207–2216.
6. Ca²⁺ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C α directly to phosphatidylserine / N. Verdaguer [et al.] // EMBO J. – 1999. – Vol. 18, № 22. – P. 6329–6338.
7. Phosphorylation of Dynamin I on Ser-795 by Protein Kinase C Blocks Its Association with Phospholipids / K.A. Powell [et al.] // J Biol Chem. – 2000. – Vol. 275, № 16. – P. 11610–11617.
8. Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin / M.A. Swairjo [et al.] // V. Nat Struct Biol. – 1995. – Vol. 2, № 11. – P. 968–974.
9. Phosphatidylserine. Monograph. Altern Med Rev. – 2008. – Vol. 13, № 3. – P. 245–247.
10. Effects of phosphatidylserine in age-associated memory impairment / T.H. Crook [et al.] // Neurology. – 1991. – Vol. 41, № 5. – P. 644–649.

11. Use of phosphatidylserine in Alzheimer's disease / L. Amaducci [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 1991. – Vol. 640. – P. 245–249.
12. Овчинников, Ю.А., *Биоорганическая химия* / Ю.А. Овчинников. – Москва: Просвещение, 1987.
13. *Химия липидов* / Р.П. Евстигнеева [и др.]: под ред. Р.П. Евстигнеевой. – Москва: Химия, 1983. – 296 с.
14. Optimized synthesis of phosphatidylserine / G. Guanti [et al.] // *Amino Acids.* – 2010. Vol. 39, № 2. – P. 367–373.
15. Approach to the large-scale preparation of highly pure phosphatidylserine from bovine brain / S. Chen [et al.] // *J Chromatogr B Biomed Appl.* – 1995. – Vol. 666, № 1. – P. 178–182.
16. The chemistry of oils and fats / G. Knothe [et al.] // *J Sci Food Agr.* – 2005. – Vol. 85, №13. – P. 2325–2325.
17. Phospholipase D and its application in biocatalysis / R. Ulbrich-Hofmann [et al.] // *Biotechnol Lett.* – 2005. – Vol. 27, № 8. – P. 535–544.
18. Использование фосфолипазы D нового микробного штамма-продуцента для синтеза фосфолипидных производных модифицированных нуклеозидов / Л.Л. Биричевская [и др.] // *Докл. НАНБ.* – 2006. – Т. 50, № 4. – С. 68–71.
19. Improvements in the enzymatic synthesis of phosphatidylserine employing ionic liquids / P. D'Arrigo [et al.] // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2012. – Vol. 84. – P. 132–135.
20. "Brain-specific" nutrients: a memory cure? / M.A. McDaniel [et al.] // *Nutrition.* – 2003. – Vol. 19, № 11–12. – P. 957–975.
21. The effect of phosphatidylserine-containing omega-3 fatty acids on memory abilities in subjects with subjective memory complaints: a pilot study / Y. Richter [et al.] // *Clin Interv Aging.* – 2010. – № 5. – P. 313–316.
22. Soybean-derived phosphatidylserine improves memory function of the elderly Japanese subjects with memory complaints / A. Kato-Kataoka [et al.] // *J Clin Biochem Nutr.* – 2010. – Vol. 47, №3. – P. 246–255.
23. Age-related loss of phospholipid asymmetry in APPNLh/APPNLh x PS-1P264L/PS-1P264L human double mutant knock-in mice: Relevance to Alzheimer disease / M.L. Bader Lange [et al.] // *Neurobiology of Disease.* – 2010. – Vol. 38, № 1. – P. 104–115.
24. The effect of phosphatidylserine containing Omega3 fatty-acids on attention-deficit hyperactivity disorder symptoms in children: a double-blind placebo-controlled trial, followed by an open-label extension / I. Manor [et al.] // *Eur Psychiatry.* – 2012. – Vol. 27, №5. – P. 335–342.
25. Docosahexaenoic acid and phosphatidylserine supplementations improve antioxidant activities and cognitive functions of the developing brain on pentylenetetrazol-induced seizure model / S.H. Liu [et al.] // *Brain Res.* – 2012. – № 1451. – P. 19–26.
26. Safety of soy-derived phosphatidylserine in elderly people / B.L. Jorissen [et al.] // *Nutr Neurosci.* – 2002. – Vol. 5, № 5. – P. 337–343.
27. Safety of phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids in non-demented elderly: a double-blind placebo-controlled trial followed by an open-label extension / V. Vakhapova [et al.] // *BMC Neurology.* – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 79.
28. Phospholipids and sports performance / R. Jager [et al.] // *J Int Soc Sports Nutr.* – 2007. – Vol. 4, №1. – P. 5.
29. Targeting phosphatidylserine in anti-cancer therapy / H. Kenis [et al.] // *Curr Pharm Des.* – 2009. – Vol. 15, №23. – P. 2719–2723.
30. Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases / M.M. Soares [et al.] // *Nat Med.* – 2008. – Vol. 14, № 12. – P. 1357–1362.
31. Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases / K. Schutters [et al.] // *Apoptosis.* – 2010. – Vol. 15, №9. – P. 1072–1082.
32. Price, S. Liposomes containing phosphatidylserine inhibit osteoclastogenesis in rats / S. Price // *Nat Rev Rheumatol.* – 2010. – Vol. 6, №5. – P. 245.

33. Phosphatidylserine-containing liposomes: potential pharmacological interventions against inflammatory and immune diseases through the production of prostaglandin E(2) after uptake by myeloid derived phagocytes / Z. Wu [et al.] // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. – 2011. – Vol. 59, №3. – P. 195–201.

34. Phosphatidylserine-containing liposomes suppress inflammatory bone loss by ameliorating the cytokine imbalance provoked by infiltrated macrophages / H.M. Ma [et al.] // *Lab Invest*. – 2011. – Vol. 91, № 6. – P. 921–931.

35. Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss / Z. Wu [et al.] // *J Immunol*. – 2010. – Vol. 184, № 6. – P. 3191–3201.

36. Phosphatidylserine-containing liposomes promote maximal survival of retinal neurons after ischemic injury / G. Dvorianchikova [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2009. – Vol. 29, № 11. – P. 1755–1759.

PHOSPHATIDYLSERINE OBTAINING AND APPLICATION

A.I. Vasilkevich, O.L. Sharko, M.A. Kisel, A.I. Zinchenko*

Institute of Bioorganic Chemistry NASB, Minsk, Belarus

**Institute of Microbiology NASB, Minsk, Belarus*

Phosphatidylserine is an important membrane phospholipid, ubiquitously present in cellular membranes especially in brain and is involved in apoptosis and many neurological processes. Aging is accompanied with lowering of phosphatidylserine level in brain. Phospholipid is almost not synthesized in human and its content in food is pretty low.

Modern techniques of phosphatidylserine synthesis and its application as biologically active and therapeutic substance are reviewed in the article.