



РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЗАПАСНЫХ И СТРУКТУРНЫХ ЛИПИДАХ ГОЛОТУРИИ *Eupentacta fraudatrix*

© 2022 г. Е. В. Ермоленко*., #, Т. В. Сикорская*, И. Ю. Долматов*

*Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Россия, 690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Поступила в редакцию 01.06.2021 г.

После доработки 09.10.2021 г.

Принята к публикации 13.10.2021 г.

Голотурия *Eupentacta fraudatrix* широко используется для изучения механизмов регенерации и выделения биологически активных веществ. Данные о содержании липидов и составе *E. fraudatrix* ограничиваются описанием состава жирных кислот (ЖК). Впервые были идентифицированы молекулярные виды запасных и структурных липидов кишечника *E. fraudatrix* различными методами хроматографии и масс-спектрометрии. Триацилглицерины как запасные липиды характеризуются высокой концентрацией трофических маркеров ЖК. Среди структурных липидов фосфатидилэтаноламины и фосфатидилхолины характеризуются высоким уровнем молекулярных видов с простой эфирной связью. Фосфатидилсерины (ФС) и фосфатидилинозитолы (ФИ) отличаются от других липидов преобладанием длинноцепочечных ЖК в составе, среди которых обнаружена кислота 23:1n-9, характерная для голотурий. Изучение липидома морских организмов может способствовать пониманию путей биосинтеза и распределения маркерных жирных кислот в липидах.

Ключевые слова: голотурия, жирные кислоты, липидом, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0132342322020087

ВВЕДЕНИЕ

Голотурии (Holothuroidea) – один из наиболее широко распространенных классов низших беспозвоночных. Они играют важную роль в экосистеме океана, расщепляя детрит и органические вещества для бактерий и, таким образом, возвращая питательные вещества обратно в Мировой океан [1]. Голотурии традиционно используются в пищу в Юго-Восточной Азии.

Некоторые виды голотурий обладают защитным механизмом, называемым эвисцерация: животные могут выбрасывать свои внутренние органы (например, кишечник и дыхательные пути) из своего тела при воздействии стресса (например, химического стресса или физических манипуляций), при этом потерянные органы могут быть быстро регенерированы [2, 3]. Голотурия *Eupen-*

tacta fraudatrix – один из уникальных организмов, используемых для изучения процесса регенерации. Недавно анализ динамики экспрессии генов во время регенерации кишечника у *E. fraudatrix* позволил идентифицировать ряд факторов транскрипции, которые могут участвовать в трансдифференцировке целомических эпителиальных клеток в энтероциты голотурий [4].

Голотурия *E. fraudatrix* известна как богатый источник тритерпеновых гликозидов. Всего из голотурии выделено и идентифицировано 37 гликозидов [5–7]. Большинство гликозидов *E. fraudatrix* характеризуются наличием остатка 3-*O*-метилксиллозы в качестве конечного звена в углеводной цепи вместо 3-*O*-метилглюкозы, обнаруженной в большинстве гликозидов трепангов. Это различие считается хемотаксономическим маркером рода *Eupentacta* [7].

В многочисленных исследованиях голотурии *E. fraudatrix* почти не учитывается состав липидов, за исключением описанного ранее состава жирных кислот (ЖК) *E. fraudatrix* [8]. Липиды обладают важными для организма функциями. Нейтральные липиды (триацилглицерины (ТГ) и эфиры восков) служат резервом энергии. Полярные липиды (глицерофосфолипиды, сфинголи-

Сокращения: ДМА – диметилацетали;ДФГ – дифосфатидилглицерины; ЖК – жирные кислоты; ЛФХ – лизофосфатидилхолин; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты; МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот; НЖК – насыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ТГ – триацилглицерины; ФИ – фосфатидилинозитолы; ФЛ – фосфолипиды; ФХ – фосфатидилхолины; ФЭ – фосфатидилэтаноламины.

Автор для связи: (тел.: +7 (423) 231-09-05, эл. почта: ecrire_711@mail.ru).

пиды и гликолипиды) – структурные компоненты клеточных мембран, участвующие в передаче сигналов. Состав липидов и ЖК описан у голотурий, обитающих в водах Вьетнама [8], *Apostichopus japonicas* [9], абиссальных голотурий [10] и глубоководных голотурий Охотского моря [11].

Каждый класс липидов представляет собой смесь сотен молекулярных видов липидов, в состав которых входят различные ЖК. Количественное описание молекулярного состава липидов – одна из задач, решаемых липидомикой. Увеличение данных о липидоме способствует изучению морской экологии и биохимии липидов.

Цель настоящей работы – определение состава молекулярных видов в запасных (триацилглицеринах) и структурных (фосфолипиды) липидах кишечника *E. fraudatrix*. Химическая структура и состав молекул липидов фосфолипидов (ФЛ) были впервые идентифицированы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения (МС/МС). ТГ анализировали с помощью сверхкритической флюидной хроматографии с использованием масс-спектрометра низкого разрешения и светорассеивающего детектора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения состава ЖК и молекулярных видов липидов использовали взрослых особей голотурии *E. fraudatrix*, собранных в заливе Петра Великого Японского моря. Липиды, выделенные из кишечника пяти особей голотурии, анализировали методами жидкостной и газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим, пламенно-ионизационным и светорассеивающим детектированием.

Общие липиды составляли 4.6% от сырого веса кишечника голотурии. Содержание ТГ и стерина определяли с помощью сверхкритической флюидной хроматографии со светорассеивающим детектором. Общее количество фосфолипидов и некоторых классов этих липидов определяли по количеству неорганического фосфора при окислении в HClO_4 [12]. Содержание основных классов липидов голотурии представлено в табл. 1. ФЛ включали шесть основных классов: фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозитолы (ФИ), лизофосфатидилхолины (ЛФХ) и дифосфатидилглицерина (ДФГ).

Содержание липидов в кишечнике *E. fraudatrix* было сопоставимо с голотуриями из вод Вьетнама, исследованных ранее [8]. Кишечник *E. fraudatrix* содержал липиды (ТГ, стерина и ФЛ), кото-

Таблица 1. Состав липидов кишечника *Eupentacta fraudatrix*

Класс липидов	Содержание, % от липидного экстракта
Триацилглицерины	16.66 ± 7.03
Стерины	16.51 ± 8.12
Фосфолипиды	25.44 ± 6.82
Фосфатидилхолины	15.46 ± 1.71
Фосфатидилэтаноламины	5.08 ± 0.33
Фосфатидилсерина	2.15 ± 1.02
Фосфатидилинозитолы	1.39 ± 0.01
Лизофосфатидилхолины	0.42 ± 0.02
Дифосфатидилглицерины	0.93 ± 0.36

Примечание: данные представлены в виде средних значений ± SD ($n = 5$).

рые составляли значительную часть липидного экстракта (58.6%) кишечника голотурии. ФХ, ФЭ, ФС, ФИ, лизофосфолипиды и ДФГ были обнаружены у широко распространенных видов голотурий, таких как *Holothuria leucospilota*, *H. atra*, *Cucumaria frondosa*, *Isostichopus fuscus* и др. [8, 13]. Таким образом, состав полярных липидов *E. fraudatrix* (табл. 1) был типичным для голотурий. Основным классом фосфолипидов у *E. fraudatrix* был ФХ, содержание которого составляло 60.8% от общего количества ФЛ. О преобладании ФХ в фосфолипидах сообщалось и для других голотурий [8, 13].

Содержание и состав жирных кислот в кишечнике *E. fraudatrix* определяли газо-жидкостной хроматографией с пламенно-ионизационным детектором. Профиль ЖК голотурий отличался высокой концентрацией полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), при этом основной ПНЖК была эйкозапентаеновая кислота (20:5n-3) (табл. 2). n-3 ПНЖК преобладали в липидах кишечника (39.9% от суммы жирных кислот), в то время как содержание n-6 ПНЖК составляло всего 1.9%. Содержание ЖК с нечетным количеством атомов углерода составляло 9.7%. Обнаружена ЖК 23:1n-9 – маркерная ЖК голотурий.

При кислотном метанолизе из фосфолипидов с алкенильной группой в положении *sn*-1 образуются длинноцепочечные диметилацетали альдегидов (ДМА). Диметилацеталь октадеканала (18:0-ДМА) был единственным ДМА, который составлял 1.03% от смеси МЭЖК и ДМА, полученной из общих липидов голотурии.

Состав ЖК кишечника *E. fraudatrix* был схожим с ранее полученными данными [8]. В нашей

Таблица 2. Состав жирных кислот липидов кишечника *Eupentacta fraudatrix*

Жирная кислота	Содержание, % от общих ЖК и ДМА
14:0	3.17 ± 0.25
ai-15:0	6.17 ± 0.89
16:0	1.77 ± 0.96
16:1n-7	8.30 ± 1.25
ai-17:0	3.47 ± 0.74
16:4n-1	3.51 ± 0.51
18:0	6.80 ± 0.44
18:1n-7	3.71 ± 0.56
18:4n-3	2.06 ± 0.25
20:0	1.60 ± 0.36
20:1n-9	1.58 ± 0.21
20:2(5,11)	0.46 ± 0.09
20:4n-6	0.92 ± 0.13
20:4n-3	3.42 ± 0.88
20:5n-3	20.32 ± 2.21
22:1n-9	1.31 ± 0.27
21:5n-3	1.54 ± 0.14
23:1n-9	1.50 ± 0.66
22:5n-3	1.67 ± 0.74
22:6n-3	6.76 ± 0.87
Другие	23.47 ± 2.14
Разветвленные + нечетные	18.79 ± 2.01
НЖК	29.09 ± 3.12
МНЖК	21.90 ± 3.21
ПНЖК	47.98 ± 2.85
18:0-ДМА	1.03 ± 0.08

Примечание: данные представлены в виде средних значений \pm SD ($n = 5$); ai – жирные кислоты, метилированные по третьему от конца цепи углероду.

работе было показано, что кишечник *E. fraudatrix* содержал более высокую концентрацию 22:6n-3 (6.76% от общего количества ЖК и ДМА) по сравнению с таковым во всем организме ранее исследованной *E. fraudatrix* (2.3% от общего количества ЖК) [8]. Особенностью состава ЖК кишечника изученной нами *E. fraudatrix* был высокий уровень ЖК с разветвленной структурой и нечетным количеством атомов углерода, что согласуется с ранее полученными данными для *E. fraudatrix* [8]. Считается, что разветвленные ЖК синтезируются грамположительными и сульфатредуцирующими бактериями [14]. Кишечник голотурии, возможно, содержит большое количество подобных бактерий.

Высокое содержание кислот 16:4n-1 (3.51%) и 20:5n-3, а также соотношение 16:1n-7/16:0, превышавшее 1, были обнаружены в кишечнике голотурии. Эти параметры указывают на преобладание диатомовых водорослей в рационе *E. fraudatrix* [11]. Ранее было показано, что голотурия *C. frondosa* также питается преимущественно диатомовыми водорослями в период их активного цветения [15].

ТГ – основная форма хранения энергии как у наземных, так и у морских животных [16]. Состав ТГ липидов кишечника *E. fraudatrix* представлен 53 молекулярными видами. Данные по основным молекулярным видам, расположенным в порядке увеличения времени удерживания, приведены в табл. 3. Основные ТГ содержали ацильные фрагменты 20:5, 16:0, 14:0, 16:1 и 22:6.

В составе ТГ были обнаружены одинаковые по составу молекулярные виды с разным временем удерживания, полученным на колонке с обращенной фазой. Например, ТГ 22:6/16:0/16:1 имел меньшее время удерживания (№ 19, 22.86 мин), чем аналогичный молекулярный вид (№ 21, 24.64 мин). Схожее хроматографическое поведение наблюдалось для пиков № 11 и 18, 24 и 27. Некоторые из молекулярных видов ТГ имели необычное время удерживания для их структуры (количество атомов углерода и число двойных связей в остатках ЖК). Таким образом, ТГ 20:5/18:1/16:0 (пик № 17) имел меньшее время удерживания, чем ТГ 20:5/18:1/15:0 (пик № 19). Различия во временах удерживания аналогичных молекулярных видов ТГ позволяют предположить, что в составе ТГ содержатся разветвленные ЖК. 28 молекулярных видов ТГ содержали маркеры диатомовых водорослей (16:4n-1 и 16:1n-7). Более того, ряд ТГ (16:1/16:1/16:1, 16:1/16:2/16:1, 20:5/16:1/16:1 и 20:5/16:0/16:1) полностью повторяет состав ТГ диатомовых водорослей [17]. Мы обнаружили, что трофические маркерные ЖК присутствуют преимущественно в ТГ.

Структурные липиды в кишечнике *E. fraudatrix* представлены в основном стеринами и фосфолипидами. Гликолипиды также обнаружены у голотурий [9], но мы не определяли содержание и состав этих классов липидов. В липидах кишечника голотурии было идентифицировано 63 молекулярных вида ФЭ, ФХ, ФС, ФИ и ЛФХ. Основными молекулярными видами были 18:1алк/20:5 ФЭ, 18:1алк/20:5 ФХ, 18:1/20:5 ФХ, 18:0/20:5 ФХ, 22:0/20:5 ФС, 22:1/24:1 ФС, 23:1/20:1 ФС, 20:0/20:5 ФИ, 22:1/20:5 ФИ и 22:0/20:5 ФИ (рис. 1). Основной ЖК в составе фосфолипидов *E. fraudatrix* была кислота 20:5n-3 (рис. 1a). Высокая концентрация длинноцепочечных ацильных фрагмен-

Таблица 3. Состав молекулярных видов триацилглицеринов (ТГ) кишечника *Eupentacta fraudatrix*

№	Время удерживания, мин	Молекулярный вид триацилглицерина	Содержание липидов	
			% от суммы ТГ	% от липидного экстракта
1	9.23	20:5/16:4/20:5	2.68 ± 0.84	0.45 ± 0.29
2	9.38	20:5/16:0/16:4 ; 18:3/14:0/16:4	2.07 ± 0.57	0.37 ± 0.23
3	10.00	20:5/16:1/16:4	3.23 ± 1.68	0.61 ± 0.48
4	11.07	20:5/16:3/20:5; 18:4/14:1/18:3	1.57 ± 0.54	0.24 ± 0.08
5	13.35	16:1/16:2/16:3; 20:5/16:3/16:1; 20:5/18:4/20:5	4.50 ± 0.29	0.74 ± 0.29
6	12.30	20:5/16:1/16:3	1.92 ± 0.92	0.35 ± 0.28
7	13.62	20:5/20:5/20:5; 14:0/20:5/20:5	4.62 ± 1.89	0.86 ± 0.57
8	14.38	20:5/16:0/20:5 ; 16:1/16:1/16:3	3.01 ± 0.75	0.49 ± 0.23
9	14.97	20:5/16:2/16:1	1.81 ± 1.50	0.36 ± 0.37
10	15.18	20:5/14:0/22:6; 20:5/20:4/20:5; 20:5/15:0/20:5	8.28 ± 1.63	1.41 ± 0.69
11	16.37	20:5/16:0/16:1 ; 20:5/15:0/16:0	4.79 ± 1.56	0.86 ± 0.57
12	16.88	16:1/16:2/16:1; 22:6/16:2/16:1; 18:3/16:2/16:1	3.72 ± 0.77	0.59 ± 0.17
13	17.27	20:5/16:1/16:1; 20:5/15:0/16:1; 20:4/16:1/16:1	8.14 ± 1.97	1.43 ± 0.79
14	17.69	18:4/16:0/20:5	4.22 ± 0.58	0.68 ± 0.22
15	20.23	16:1/16:1/16:1; 16:1/15:0/16:1; 20:5/16:1/20:5	9.61 ± 4.86	1.39 ± 0.46
16	21.20	20:5/18:1/20:5; 18:3/16:0/20:5	2.87 ± 0.57	0.45 ± 0.14
17	21.96	20:5/18:1/16:0 ; 20:5/18:0/16:3	1.25 ± 0.22	0.22 ± 0.12
18	22.26	20:5/16:0/16:1; 20:5/16:0/15:0; 16:1/16:0/16:1; 16:1/15:0/16:0	1.90 ± 0.36	0.30 ± 0.10
19	22.86	20:5/18:1/16:1; 22:6/16:0/16:1 ; 20:5/18:1/15:0	2.00 ± 1.40	0.33 ± 0.30
20	23.49	20:5/18:0/18:4	2.95 ± 1.07	0.50 ± 0.34
21	24.64	22:6/16:0/16:1; 16:1/15:0/16:0	1.42 ± 0.32	0.25 ± 0.13
22	25.76	16:1/18:1/16:1	1.60 ± 0.39	0.27 ± 0.16
23	26.97	20:5/18:0/20:5	5.15 ± 3.42	0.71 ± 0.38
24	28.12	20:5/18:0/16:0 ; 18:3/18:0/20:5	0.96 ± 0.19	0.17 ± 0.09
25	30.17	20:5/18:0/16:1; 20:5/18:0/15:0	4.61 ± 1.55	0.79 ± 0.46
26	34.86	16:1/18:0/16:1; 22:6/18:0/16:1	1.14 ± 0.75	0.16 ± 0.04
27	38.14	20:5/18:0/16:0	1.12 ± 0.66	0.19 ± 0.15
		Другие	8.85 ± 4.57	1.50 ± 1.16

Примечание: содержание липидов представлено в виде средних значений ± SD ($n = 5$). Полужирным шрифтом выделены молекулярные виды триацилглицеринов, содержащие разветвленную жирную кислоту.

тов (до 42 атомов углерода) характерна для **ФС** (77.4% от суммы **ФС**) и **ФИ** (61.2% от суммы **ФИ**).

Алкил/ацильные молекулярные виды **ФЛ** были характерны для **ФЭ** (94.1% от суммы всех **ФЭ**), **ФХ** (32.5% **ФХ**) и **ЛФХ** (65.7% **ЛФХ**) (рис. 1б). Единственным алкил/ацильным молекулярным видом **ФИ** с концентрацией менее 2% был 18:0алк/20:5 **ФИ**. **ФС** не содержал алкил/ацильные молекулярные виды.

Высокое содержание алкил/ацильных молекулярных видов было обнаружено в **ФЭ**, **ФХ** и **ЛФХ**, что согласуется с ранее полученными данными для голотурий [13]. Молекулярные виды с алкиль-

ной связью в положении *sn*-1 встречались преимущественно в **ФХ** ряда голотурий, в то время как алкенильная связь характерна для **ФЭ** [13]. Липиды с простой эфирной связью – основные структурные компоненты клеточных мембран. Простая эфирная связь в фосфолипидах изменяет их физические свойства и влияет на динамику мембран [18]. Отсутствие карбонильного кислорода в положении *sn*-1 способствует образованию более прочных межмолекулярных водородных связей между головными группами [19]. Алкенильная группа плазмалогенов в положении *sn*-1 способствует более плотной упаковке фосфоли-

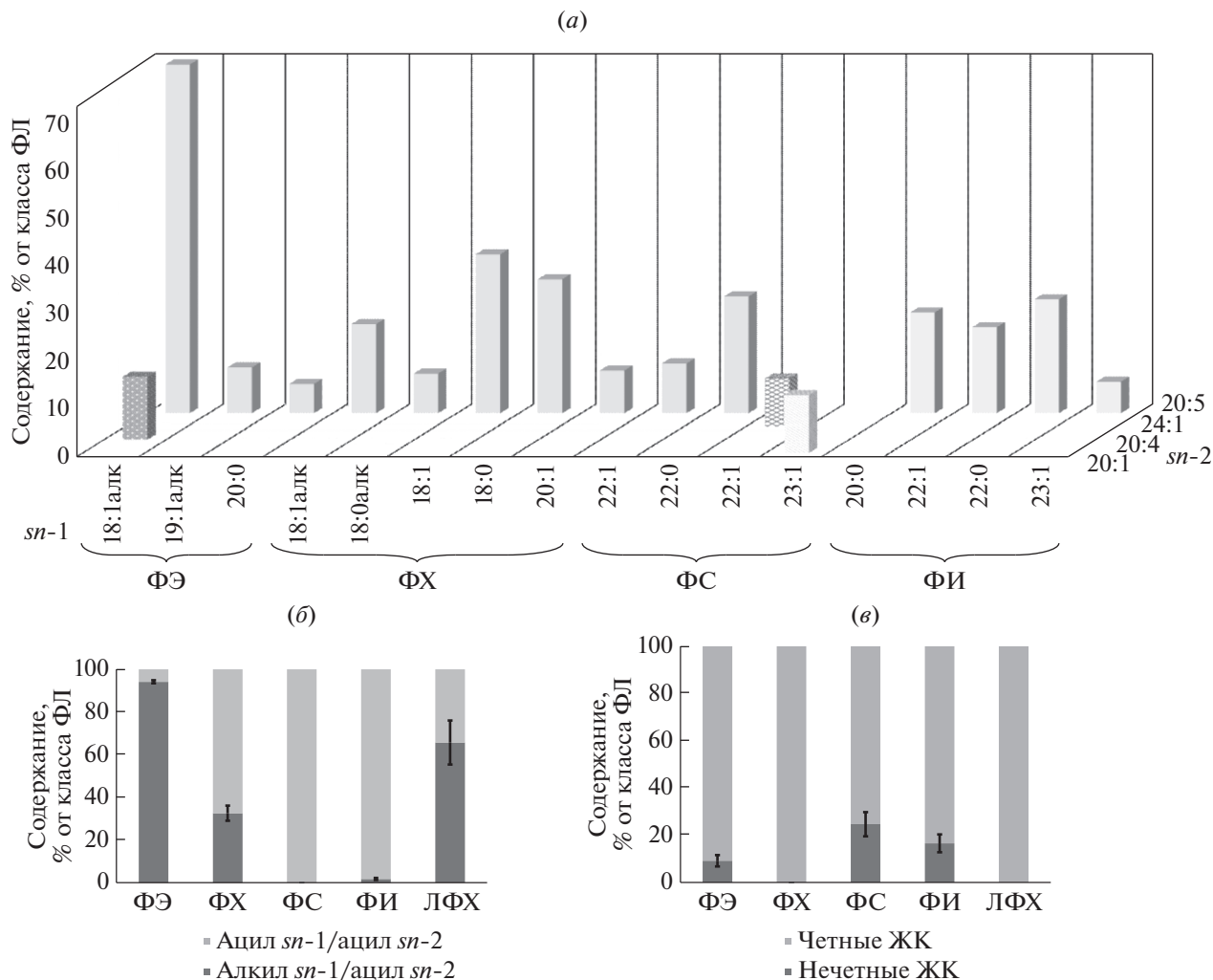


Рис. 1. (а) – Содержание основных молекулярных видов (% от класса фосфолипидов) фосфатидилэтаноламинов (ФЭ), фосфатидилхолинов (ФХ), фосфатидилсеринов (ФС) и фосфатидилинозитолов (ФИ) в кишечнике *Eupentacta fraudatrix*. На осях *sn*-1 и *sn*-2 расположены алкильные и ацильные группы в положениях *sn*-1 и *sn*-2 соответственно молекулы соответствующего класса фосфолипидов. Алкильные (X:Yalk) и ацильные группы (X:Y) содержат X атомов углерода и Y двойных связей; (б) – распределение алкил/ацильных и диацильных молекулярных видов в каждом классе фосфолипидов; (в) – распределение нечетных и четных ацильных фрагментов в каждом классе фосфолипидов.

пидов в мембране, что приводит к снижению текучести мембраны и увеличению жесткости [18].

ЖК с нечетным количеством атомов углерода были характерны для ФЭ (9.2% от суммы ФЭ), ФС (24.6% от суммы ФС) и ФИ (16.5% от суммы ФИ) (рис. 1в). ЖК 19:1 присутствовала в ФЭ, более длинноцепочечные кислоты 23:0 и 23:1 встречались только в ФС и ФИ.

Наибольшая концентрация нечетных ЖК была обнаружена в ФС (рис. 1в). Наличие остатков 21:0 и 23:0 указывает на возможное удлинение ЖК бактериального происхождения (15:0, 17:0 и 19:0) в тканях морских организмов для дальнейшего биосинтеза собственных липидов [20]. Кислота 23:1n-9, характерная для голотурий, обнару-

жена только в ФС и ФИ. Предполагается, что эта ЖК образуется в результате α -окисления 24:1n-9 [21]. Ранее маркерные для мягких кораллов тетракозаполиненасыщенные ЖК (24:5n-6 и 24:6n-3) также были обнаружены в основном в ФИ и ФС [22, 23]. Взаимосвязь биосинтетических путей ФС и ФИ с маркерными ЖК нуждается в дополнительных исследованиях.

Состав и содержание основных классов липидов голотурии *E. fraudatrix* значительно не отличается от липидов других видов голотурий [8, 13]. Молекулярные виды ФЭ и ФХ содержат в основном эйкозапентаеновую кислоту (20:5n-3), что согласуется с ранее полученным данным для шести съедобных голотурий [13]. Длинноцепочеч-

ные ЖК (>21 атома углерода) как с четным, так и с нечетным количеством атомов углерода были обнаружены преимущественно в ФС и ФИ, что подтверждено ранее [13]. Особенность липидов кишечника голотурии *E. fraudatrix* – высокое содержание ПНЖК в составе ФЭ и ФХ (97.2% от суммы ФЭ и 99.6% от суммы ФХ).

Голотурия *E. fraudatrix* используется для изучения механизмов регенерации [4] и в качестве источника биологически активных соединений [7]. Запасные и структурные липиды кишечника *E. fraudatrix* впервые были проанализированы различными методами хроматографии и масс-спектрометрии. Ранее было высказано предположение, что фосфолипиды – относительно консервативная часть липидома, в гораздо меньшей степени подверженная влиянию источников питания, чем неполярные резервные классы липидов [24]. Мы показали, что жирные кислоты, поступающие из пищи и бактерий, живущих в кишечнике, входят в состав резервного класса липидов – триацилглицеринов. Биосинтез ФЛ включал элонгацию жирных кислот, поступающих из пищи. Изучение липидома морских организмов может помочь в установлении биосинтетических путей и распределении трофических маркеров в липидах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Для экстракции липидов и тонко-слойной хроматографии (ТСХ) использовали гексан, бензол, хлороформ, метанол и 28%-ный раствор NH_4OH аналитической чистоты; для ВЭЖХ – гексан, 2-пропанол, HCOOH и триэтиламин (Sigma-Aldrich, США). Стандарты триацилглицеринов и фосфолипидов были приобретены у Avanti Polar Lipids Inc. (США), тридецилпальмитат (ч.д.а.) – у КНПО “Диагностикум” (Россия).

Животные. Взрослые особи голотурии *E. fraudatrix* были собраны в заливе Петра Великого Японского моря и содержались в резервуарах объемом 3 м³ с проточной аэрированной морской водой при 16°C в течение одной недели. Ткани кишечника были взяты из пяти особей (через разрез стенки тела голотурии). Кишечник промывали стерильной морской водой для удаления остатков пищи.

Анализ липидов. Экстракты общих липидов получали по методу Фолча [25] с некоторыми модификациями. Содержание фосфорсодержащих общих липидов измеряли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония), исходя из количе-

ства неорганического фосфора при окислении в HClO_4 , как опубликовано ранее [12].

Метилвые эфиры жирных кислот (МЭЖК) из липидов кишечника *E. fraudatrix* получали в соответствии с методом Carreau и Dubacq [26]. МЭЖК анализировали методом газовой хроматографии на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой 30 м × 0.25 мм (i.d.) Supelcowax 10 (США). Анализ проводили при следующих условиях: температура колонки 205°C, температура инжектора и детектора 250°C. В качестве газа-носителя использовали гелий. Пики МЭЖК были идентифицированы путем сравнения времен удерживания индивидуальных эфиров жирных кислот и значений эквивалентной длины цепи со стандартами (смесь PUFA-3 из масла менхадена, Supelco, Bellefonte, США). Концентрацию МЭЖК (% от суммы ЖК) определяли по площадям хроматографических пиков соответствующих соединений, при этом общую площадь пиков МЭЖК принимали за 100% и вычисляли процентную концентрацию отдельных ЖК по отношению к их общему содержанию.

Содержание и структуру молекулярных видов ФЛ определяли на хроматографе LC-20A Prominence (Shimadzu, Япония) с тандемным масс-спектрометром высокого разрешения LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония) согласно ранее описанным условиям [23]. Определение содержания и идентификацию молекулярных видов проводили, как описано ранее [27, 28].

Состав и количество ТГ в общих липидах были определены с использованием сверхкритической флюидной хроматографии Nexera UC (Shimadzu, Япония) со светорассеивающим детектором ELSD LT II (Shimadzu, Япония) и масс-спектрометром низкого разрешения LCMS-8060 (Shimadzu, Япония) в режиме химической ионизации при атмосферном давлении и регистрации положительных ионов [23]. Для количественного определения ТГ использовали внутренний стандарт 16:0/16:0/18:1 ТГ (Avanti Polar Lipids Inc., США).

Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение, повторность пятикратная. Данные обрабатывали в программе MS Excel.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые были идентифицированы молекулярные виды запасных и структурных липидов кишечника *E. fraudatrix* методами газо-жидкостной и жидкостной хроматографии с использованием масс-спектрометрического, пламенно-ионизационного и светорассеивающего детекто-

ров. Показано, что жирные кислоты, поступающие из пищи и бактерий, живущих в кишечнике, входят в состав резервного класса липидов — триацилглицеринов. Для биосинтеза фосфолипидов использовались диетические жирные кислоты, подвергшиеся элонгации. Изучение липидома морских организмов может помочь в установлении биосинтетических путей и распределения маркерных жирных кислот в липидах.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Du H.X., Bao Z.M., Hou R., Wang S., Su H.L., Yan J.J., Tian M.L., Li Y., Wei W., Lu W., Hu X.L., Wang S., Hu J.J. // PLoS One. 2012. V. 7. P. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033311>
- Dolmatov I.Y., Ginanova T.T. // Cell Tissue Res. 2009. V. 336. P. 41–58. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0761-6>
- Mashanov V.S., Dolmatov I.Y., Heinzeller T. // Biol. Bull. 2005. V. 209. P. 184–193. <https://doi.org/10.2307/3593108>
- Boyko A.V., Girich A.S., Tkacheva E.S., Dolmatov I.Y. // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58470-0>
- Kalinin V.I., Avilov S.A., Kalinovskii A.I., Stonik V.A. // Chem. Nat. Compd. 1992. V. 28. P. 635–636. <https://doi.org/10.1007/BF00630455>
- Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andriyjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I. // Nat. Prod. Commun. 2012. V. 7. P. 1157–1162.
- Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Popov R.S., Kalinin V.I., Andriyjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A. // Nat. Prod. Commun. 2018. V. 13. P. 137–140.
- Svetashev V.I., Levin V.S., Lam C.N., Nga D.T. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 1991. V. 98. P. 489–494. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90242-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90242-6)
- Lou Q.M., Wang Y.M., Liu X.F., Xue C.H. // J. Food Biochem. 2012. V. 36. P. 317–321. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00544.x>
- Drazen J.C., Phleger C.F., Guest M.A., Nichols P.D. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2008. V. 151. P. 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.013>
- Kharlamenko V.I., Stepanov V.G., Borisovets E.E., Kiyashko S.I., Svetashev V.I. // Russ. J. Mar. Biol. 2015. V. 41. P. 448–455. <https://doi.org/10.1134/s106307401506005x>
- Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 129–141.
- Wang X.C., Cong P.X., Chen Q.S., Li Z.J., Xu J., Xue C.H. // J. Food Compos. Anal. 2020. V. 94. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103626>
- de Carvalho C., Caramujo M.J. // Molecules. 2018. V. 23. P. 36. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>
- Hamel J.F., Mercier A. // Can. J. Zool. Rev. Can. Zool. 1998. V. 76. P. 1194–1198. <https://doi.org/10.1139/cjz-76-6-1194>
- Parrish C., Abrajano T., Budge S., Helleur R., Hudson E., Pulchan K., Ramos C. // Lipid and Phenolic Biomarkers in Marine Ecosystems: Analysis and Applications / Ed. Wangersky P. Berlin: Springer-Verlag, 2000. P. 193–223.
- Li S., Xu J.L., Chen J., Chen J.J., Zhou C.X., Yan X.J. // J. Appl. Phycol. 2014. V. 26. P. 1389–1398. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0159-4>
- Dean J.M., Lodhi I.J. // Protein & Cell. 2018. V. 9. P. 196–206. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0423-5>
- Lohner K. // Chem. Phys. Lipids. 1996. V. 81. P. 167–184. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(96\)02580-7](https://doi.org/10.1016/0009-3084(96)02580-7)
- Bosh T.V., Long P.Q. // Russ. J. Mar. Biol. 2017. V. 43. P. 471–478. <https://doi.org/10.1134/s1063074017060049>
- Kaneniwa M., Itabashi Y., Endo S., Takagi T. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 1986. V. 84. P. 451–455. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(86\)90105-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90105-7)
- Imbs A.B., Dang L.P.T., Rybin V.G., Nguyen N.T., Pham L.Q. // Biochem. Anal. Biochem. 2015. V. 4. P. 205. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000205>
- Sikorskaya T.V., Imbs A.B. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 712–723. <https://doi.org/10.1134/s1068162019010151>
- Chen H.K., Song S.N., Wang L.H., Mayfield A.B., Chen Y.J., Chen W.N.U., Chen C.S. // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0132519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132519>
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.A. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
- Carreau J.P., Dubacq J.P. // J. Chromatogr. 1978. V. 151. P. 384–390. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)88356-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)88356-9)
- Imbs A.B., Dang L.P.T., Nguyen K.B. // PLoS One. 2019. V. 14. P. 22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215759>
- Imbs A.B., Dang L.P.T., Rybin V.G., Svetashev V.I. // Lipids. 2015. V. 50. P. 575–589. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4021-0>

Distribution of Fatty Acids in Storage and Structural Lipids of the Holothurian *Eupentacta fraudatrix*

E. V. Ermolenko^{*, #}, T. V. Sikorskaya^{*}, and I. Yu. Dolmatov^{*}

[#]Phone: +7 (423) 231-09-05; e-mail: ecrire_711@mail.ru

^{*}Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Palchevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia

The holothurian *Eupentacta fraudatrix* is widely used for studying regeneration mechanisms and as a source of biological active compounds. Data on the lipid content and composition of *E. fraudatrix* are limited to the description of fatty acid (FA) composition. The storage and structural lipids of *E. fraudatrix* gut have been analyzed by different chromatographic and mass spectrometry methods. Triacylglycerols, as storage lipids, are characterized by a high concentration of trophic FA markers. Among structural lipids, phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines contain a high concentration of molecular species with ether linkage. Phosphatidylserines (PS) and phosphatidylinositols (PI) differ from other lipids with very-long-chain FA in composition. The FA 23:1n-9, which is characteristic of holothurians, has been detected in PS and PI. The study of marine organisms' lipidome may contribute to understanding the biosynthetic pathways and distribution of trophic markers in lipids.

Keywords: holothurian, fatty acids, lipidome, mass spectrometry