

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ОБРАЗЦОВ МЫШЕЧНОЙ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ У СВИНЕЙ (*Sus scrofa domestica* Erxleben, 1777) ПОРОДЫ ДЮРОК: ОСОБЕННОСТИ И КОРРЕЛЯЦИИ*

А.С. ПАВЛОВА¹, А.А. ВАНЮШКИНА¹, Е.А. ЮШИНА¹, А.Н. ЕГОРОВА^{1, 2}, Д.А. ПЕТРОВА¹, А.А. БЕЛОУС³, Н.А. АНИКАНОВ¹, П.В. МАЗИН¹

Определение метаболических характеристик в сочетании с генотипированием, разработка новых специфических маркеров для предсказания индивидуальных фенотипических характеристик на основе корреляционных исследований, создание методов фенотипирования с использованием технологий липидного анализа для оценки комплексного влияния факторов, обуславливающих фенотипические особенности особи, — это актуальные направления исследований по генетике и селекции сельскохозяйственных животных (D.P. Lo Fiego с соавт., 2002; D.P. Lo Fiego с соавт., 2005; R. Rossi с соавт., 2002). На основании данных анализа генетических особенностей животных и метаболических характеристик возможно создание предсказательных моделей для точного количественного фенотипирования животных и их потомства. В представленной работе впервые выполнен сравнительный анализ результатов нетаргетированного масс-спектрометрического исследования липидного состава мясной и жировой ткани различных областей туши в режиме регистрации положительных ионов. Цель исследования — липидный анализ мышечной и жировой тканей свиней для дальнейшего построения предсказательных моделей фенотипирования животных. Исследования осуществляли на образцах мышечной и жировой ткани, отобранных *post mortem* у 9 хрячков (*Sus scrofa domestica*) породы дюрок (возрасте 150–180 сут) отечественной репродукции, выращиваемых с использованием автоматических кормовых станций GENSTAR («Cooperl», Франция) (ООО «СГЦ», п. Верхняя Хава, Воронежская обл.). Образцы отбирали в трех точках длиннейшей мышцы спины, в трех точках двуглавой мышцы бедра, а также в двух точках подкожного дорсального жира (всего проанализировали 72 образца). Детекцию соединений проводили методом жидкостной хроматографии в сочетании с высокоточной времяпролетной масс-спектрометрией. Экстракция липидов проводилась с использованием метил-трет-бутилового эфира и метанола. Тип используемой ионизации — электроспрей. В результате были получены 844 хромато-масс-спектрометрических пика, удовлетворяющие критериям качества детекции, которые были включены в анализ. Пики аннотировали с использованием базы данных LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>) с ограничением точности 10 ppm. Мы выявили достоверные различия по липидному составу между жировой и мышечной тканью, в то время как между двумя разными образцами одной ткани различия незначительны. Коэффициенты корреляции Пирсона между липидными профилями мышечной и жировой ткани были ниже (значения r от 0,48 до 0,86, в среднем $r = 0,69$; 95 % доверительный интервал — от 0,61 до 0,79), а между липидным составом образцов только мышечной или только жировой ткани оказались выше — от 0,73 до 0,99, в среднем $r = 0,93$; 95 % доверительный интервал — от 0,86 до 0,97; в непарном тесте Стьюдента p -значение $< 0,01$). Отличие образцов мышечной ткани от образцов подкожного жира подтвердила кластеризация данных. Для всех исследованных образцов выполнено аннотирование основных групп липидов: три- и диацилглицеролов (TAG и DAG), фосфатидилхолинов (PC) (включая лизофосфатидилхолины LPC), фосфатидилэтаноламинов (PE), фосфатидилсеринов (PS), фосфатидных кислот (PA) и фосфатидилинозитолов (PI). Обнаружено, что образцы жировой ткани обогащены триацилглицеролами, а мышцы — фосфолипидами. Таким образом, в результате проведенного исследования определены основные типы липидов, представленные в различных участках жировой и мышечной ткани свиней, и выявлены различия в липидном составе для разных участков двух типов мышц (*biceps femoris* и *longissimus dorsi*), а также между жировой и мышечной тканью. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что жидкостная хроматография, совмещенная с времяпролетной масс-спектрометрией, позволяет эффективно получать объективные и воспроизводимые данные о липидах сельскохозяйственных животных с целью молекулярного фенотипирования животных для оценки в процессе селекции.

Ключевые слова: липидом, фенотипирование животных, *Sus scrofa domestica*, свиньи, порода дюрок, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, мышечная ткань, жировая ткань.

Развитие молекулярно-генетических методов открывает новые возможности для ускорения селекции животных. С 2000-х годов на смену

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект 14.604.21.0182, идентификатор RFMEFI60417X0182).

традиционной селекции на основе BLUP-AM (Best Linear Unbiased Prediction — Animal Model) приходит геномная селекция (1). Внедрение системы геномной оценки в молочном скотоводстве повысило точность прогноза племенной ценности молодых животных на 15-25 % (2). В современном животноводстве развиваются и применяются технологии генотипирования десятков и сотен тысяч однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNPs), однако вопрос об их взаимосвязи с теми или иными фенотипическими признаками часто остается открытым (3). Синтез важнейших соединений в организме животного напрямую зависит от наличия мутаций в генах соответствующих ферментов. В свою очередь, активность фермента может быть ассоциирована с определенными SNPs и проявиться в относительном количестве метаболитов определенного типа. Часто функцию дефектного фермента выполняет другой родственный фермент на основании компенсирующих биохимических реакций. Исследование разнообразия и представленности метаболитов в биологических образцах позволит внести ясность в вопрос об участии конкретных SNPs в регуляции активности биохимических процессов в организме (4), и в перспективе выявить ассоциации между SNP и определенными хозяйственно ценными признаками. Этим обусловлено значение современных высокопроизводительных технологий исследования метаболома для развития методов геномной селекции в животноводстве.

У свиней наибольший интерес представляют метаболиты, участвующие в формировании основных физико-химических и органолептических свойств мышечной и жировой ткани, формирующих показатели качества мясного сырья (5). Качество и пищевая ценность мяса зависят от его химического состава, на который влияют как генетические, так и паратипические факторы. Питательная ценность свинины определяется жирнокислотным составом, в частности количественным соотношением свободных и связанных длинноцепочечных жирных кислот в мышечной и жировой ткани.

На состав внутримышечного жира влияют несколько основных факторов: генетические особенности, пол, соотношение живой массы и возраста животного, состав рациона (6). У свиней липидный состав тканей, отражающий фенотипические характеристики особи, напрямую зависит от способа кормления животного и индивидуальных особенностей усвоения корма (7). Большое влияние оказывает также состав рациона (8). Например, повышенное содержание в корме полиненасыщенных жирных кислот может повышать их содержание в мышечной ткани (9). Известно, что линолевая и линоленовая кислоты, поступающие с кормом, метаболизируются в печени с образованием полиненасыщенных жирных кислот, чувствительных к окислительному процессу. Указанные изменения жирнокислотного состава внутримышечного жира, обусловленные составом рациона, могут повышать чувствительность мяса к воздействию окислителей (9). Липидный состав мышечной и жировой ткани, определяющий качественные характеристики мяса, можно рассматривать как уникальную индивидуальную характеристику животного, отражающую не только его генетическую предрасположенность к усвоению и синтезу липидов, но и фенотипические признаки (10, 11).

Пул липидов (липидом), представленных в мышечной и жировой ткани свиней, помимо известных жирных кислот, включает холестериновые эфиры, триацил-, диацил- и моноацилглицеролы, свободный холестерин и его интермедиаты, а также различные классы фосфолипидов, в том числе фосфатидилэтаноламины и др. (12). Необходимо отметить, что вли-

яние особенностей усвоения жирных кислот на состав липидома мышечной и жировой ткани наибольшим образом отражается на фосфолипидной фракции, а также длине и степени насыщенности жирнокислотных цепей в триацилглицеридах (12-14).

Для оценки фенотипических липидных и других метаболических характеристик организма млекопитающих чаще всего используют методы спектроскопии ядерно-магнитного резонанса и газовой или жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (3, 15-18). Особое внимание уделяется масс-спектрометрии как основному методу детектирования липидов, и в частности жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией, что позволяет идентифицировать одновременно до нескольких десятков тысяч соединений в одном биологическом образце (19).

Актуальные направления селекционных исследований в современном свиноводстве — оценка метаболических характеристик животных в сочетании с полногеномным генотипированием, обнаружение специфических маркеров для предсказания индивидуального фенотипа на основе выявленных корреляций и разработка методов фенотипирования с использованием технологий липидного анализа для оценки комплексного влияния факторов, обуславливающих фенотипические особенности животного (7, 20, 21). Количественный анализ липидов в мышечной и жировой ткани свиней в сочетании с генотипированием может стать основой для определения генов, ассоциированных с липидным составом тканей, что позволит оптимизировать селекционный процесс (в частности, по признакам качества мяса).

В настоящей работе нами впервые применен метод жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией в режиме регистрации положительных ионов для детального изучения липидных профилей мышечной и жировой ткани (молекулярного фенотипирования) у свиней породы дюрок отечественной репродукции. Определено сходство и различия в составе и содержании липидов между исследованными типами ткани, в частности показано, что образцы мышечной ткани обогащены фосфолипидами, тогда как в жировой ткани повышено содержание триацилглицеролов.

Цель исследования — липидный анализ мышечной и жировой ткани свиней с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с высокоточной времяпролетной масс-спектрометрией (УВЭЖХ-МС) для последующего создания предсказательных моделей фенотипирования животных.

Методика. У хряков породы дюрок ($n = 9$, возраст 150-180 сут, масса туши $89,4 \pm 5,67$ кг) отечественной репродукции, которых выращивали на автоматизированных кормовых станциях GENSTAR («Cooperl», Франция) (ООО «СГЦ», п. Верхняя Хава, Воронежская обл.), для анализа отбирали *post mortem* образцы длиннейшей мышцы спины в трех точках (на уровне 5-6-го ребер, LM1; 8-9-го ребер, LM2; поясницы, LM3), двуглавой мышцы бедра в трех точках (верхняя, BF1; средняя, BF2; нижняя часть, BF3), а также подкожного дорсального жира в двух точках на уровне 5-6-го ребер (внутренний и внешний слои, соответственно scat1 и scat2). Всего проанализировали 72 образца. Ткани иссекали не позднее 10 мин после убоя животного. Для снижения активности ферментов образцы отбирали при температуре не выше 4 °С и мгновенно замораживали в парах жидкого азота (-196 °С). Биоматериал хранили и транспортировали при температуре не выше -80 °С. Для анализа использовали по 130-145 мг мышечной ткани и 50-65 мг жировой ткани из каждой точки отбора.

При экстракции растворы предварительно охлаждали до 0 °С. Метод экстракции основан на применении смесей метил-трет-бутилового эфира (МТВЕ) с метанолом (MeOH) (3:1, v/v) и метанола с водой (1:3, v/v) («Scharlau», Испания). В раствор МТВЕ:MeOH добавляли изотопно меченные внутренние стандарты в концентрации 3 мкг/мл: олеиновая кислота $^{13}\text{C}_{18}$, пальмитиновая кислота $^{13}\text{C}_{16}$, стеариновая кислота $^{13}\text{C}_{18}$ («Sigma-Aldrich», Германия); 15:0-18:1-d7-диацилглицерол, холестерин (D7) («Avanti Polar Lipids, Inc.», США). К аликвотам образцов добавляли 1000 мкл экстракционной смеси МТВЕ:MeOH и помещали пробирки в охлажденный до 7 °С гомогенизатор Precellys® Evolution («Bertin Technologies», Франция). Для гомогенизации образцов мышечной ткани использовали режим, состоящий из 3 циклов по 30 с при скорости 10000 об/мин с перерывом 10 с. Образцы встряхивали на вортексе в течение 5 с и переносили в ультразвуковую баню (Sonorex Super RK 103 H, «BANDELIN electronic GmbH & Co. KG», Германия), заполненную льдом, выдерживали в течение 30 мин при 3000 об/мин и температуре 4 °С и повторяли процедуру обработки образцов ультразвуком. Из каждой пробирки (Precellys, «Bertin Technologies», Франция) аккуратно отбирали жидкую фазу и переносили в новые пробирки. В каждую пробирку добавляли по 700 мкл раствора экстракционной смеси MeOH:H₂O и встряхивали на вортексе в течение 5 с. Образцы центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин и температуре 4 °С. После центрифугирования из верхней фазы отбирали 200 мкл в пробирки (Safe-lock, «Eppendorf AG», Германия). Образцы высушивали с открытой крышкой в течение 1,5 ч в центробежном вакуумном концентраторе (Concentrator plus, «Eppendorf AG», Германия) при температуре 30 °С на скорости 1400 об/мин (вакуум 20 гПа, режиме V-NV). Сухие экстракты хранили при температуре не выше -80 °С.

Для подготовки экстрактов к масс-спектрометрическому анализу к каждому образцу добавляли по 200 мкл смеси ацетонитрил:изопропанол (70:30, v/v) (чистота ЖХ-МС) и встряхивали на вортексе в течение 5 с. Образцы помещали в ультразвуковую ванну на 10 мин. Далее их встряхивали в течение 10 мин при 3000 об/мин и температуре 4 °С. Растворы центрифугировали в течение 10 мин при 15000 об/мин и температуре 4 °С. После центрифугирования полученные липидные экстракты мышечной ткани разбавляли в соотношении 1:50 смесью ацетонитрил:изопропанол (70:30, v/v), жировой ткани — той же смесью в соотношении 1:100. Перед анализом аликвоты (100 мкл) полученного раствора переносили в масс-спектрометрические виалы и загружали в автосамплер хроматографа.

Липидные экстракты анализировали на ультравысокоэффективном жидкостном хроматографе (ultra-high performance liquid chromatograph, UPLC) (Acquity I-class, «Waters», США), совмещенном с времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения (time-of-flight mass spectrometer, Q-TOF) (Maxis Impact II, «Bruker Daltonik GmbH», Германия). Для разделения экстрактов применяли обращенно-фазовую хроматографию на аналитической колонке Acquity UPLC BEH C8 2,1×100 мм, размер частиц 1,7 мкм («Waters», США) с защитной предколонкой Acquity UPLC BEH C8 VanGuard 2,1×5 мм, 1,7 мкм («Waters», США). В качестве элюента А использовали смесь 0,1 % муравьиной кислоты, 10 мМ ацетата аммония и 100 % воды (качество ЖХ-МС), элюент В — 0,1 % муравьиная кислота с 10 мМ ацетата аммония в смеси ацетонитрил:изопропанол (70:30, v/v) (ЖХ-МС). Градиент подачи элюента: 0 мин — 45 % А, 1-я мин — 45 % А, 4-я мин — 20 % А, 12-я мин — 15 % А, 15-я мин — 0 % А, 19,50-я мин — 0 % А, 19,51-я мин — 45 % А, 24-я мин — 45 % А (А + В = 100 %). Ско-

рость подачи — 0,4 мл/мин. Аналитическая колонка термостатировалась (60 °С), в автосамплере поддерживали температуру 4 °С; объем пробы, вводимой в хроматограф, — 3 мкл.

Для ионизации вещества и его подачи в масс-спектрометр применяли электрораспыление. Осушающим и распыляющим газом был N₂, подаваемый генератором (скорость потока соответственно 2 и 6 л/мин); напряжение ионизирующего спрея — 4000 В. В соударительной ячейке использовали азот при давлении 0,04 бар. Температура линии десольватирования составляла 180 °С, радиочастота ионной фокусировки в фокусировочных воронках — 300 Вpp, в соударительной ячейке — 1000 Вpp, время накопления ионов 10 мс, время пропускания ионов 45 мс. Для масс-спектрометрического детектирования применяли полное сканирование в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов. Масс-спектрометрические данные обрабатывались с помощью функций из специализированных пакетов IPO (22), XCMS (23) и Cameta на языке программирования R (<http://www.r-project.org>).

Для анализа данных масс-спектрометрии использовали корреляции по Пирсону, *t*-критерий Стьюдента (выявление различий для двух выборок одного размера с предположением о равных дисперсиях), а также метод Бенджамини-Хохберга (24) для уменьшения числа ложноположительных результатов при множественном тестировании. Согласно методу Бенджамини-Хохберга, для p_1, p_2, \dots, p_M при числе проведенных тестов M без потери общности $p_1 \leq p_2 \leq \dots \leq p_M$. Выбираем уровень значимости Q . Для каждого p_i вычисляем критическое значение $c_i = (iQ/M) \cdot N$ и находим наибольшее p -значение p_k ($p_k < c_k$). Тогда все p_i для $i \leq k$ считаем статистически значимыми даже при $p_i > Q$.

С помощью метода главных компонент выделяли кластеры схожих образцов. Метод главных компонент (25) позволяет построить линейное преобразование, переводящее данные в пространство с меньшей размерностью, где новые оси координат называются главными компонентами. Первая главная компонента была выбрана так, чтобы вдоль нее дисперсия данных была максимальной, вторая — была ортогональна первой с максимально возможной дисперсией вдоль оси. Последующие компоненты выбираются таким образом, чтобы быть ортогональными всем предыдущим компонентам при максимальной дисперсией данных вдоль них. Для расчета главных компонент использовали пакет “scikit-learn” версии 0.19.1 для языка программирования Python 3.5.

Результаты. Схематическое изображение точек отбора образцов и результаты исследований их липидного состава представлены на рисунке 1, А. Всего детектировали не менее 10000 хромато-масс-спектрометрических

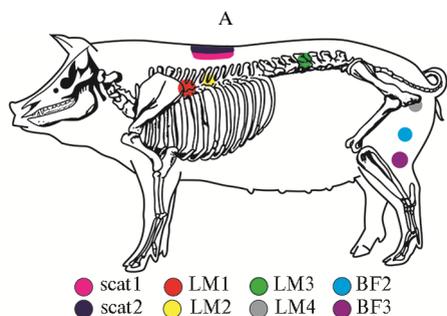
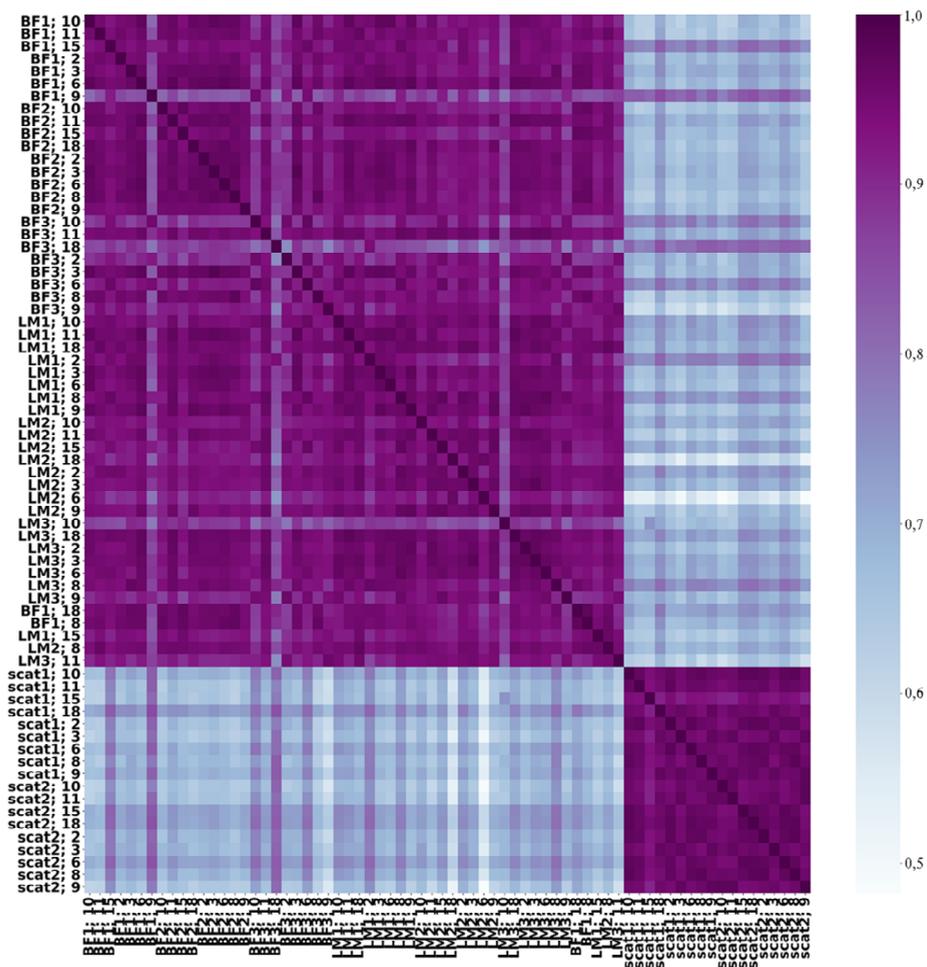


Рис. 1. Сравнение липидного состава тканей у хряков породы дюрок ($n = 9$, масса $89,4 \pm 5,67$ кг, возраст 150–180 сут). А: Схема отбора образцов для анализа (scat1 и scat2 — подкожный жир из дорсальной области, соответственно верхний и нижний слой; BF1, BF2 и BF3 — бицепс бедра сверху от спины, в середине и у колена; LM1, LM2 и LM3 — длиннейшая мышца между 5–6-м, 8–9-м позвонками и в основании хвоста). Б: Расчет корреляций по Пирсону (r) для пар образцов жировой и мышечной ткани (интенсивность фиолетового цвета отражает силу положительной корреляции, голубой цвет — слабая корреляция, белый — нулевая). Значения r , соответствующие шкале интенсивности цвета, приведены справа. Липидный состав анализировали методом жид-

кромато-масс-спектрометрии.

костной хроматографии в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией (приборы Acquity I-class, «Waters», США и Maxis Impact II, «Bruker Daltonik GmbH», Германия).

Б



пиков, каждый из которых может соответствовать определенному липидному соединению. Пики аннотировали при помощи поиска по базе данных LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>) (26) с точностью 10 ppm. Для этого выбрали аддукты M+H, M+NH₄, M+Na. Всего 1397 пиков было проаннотировано хотя бы одним липидом, многие пики получили множественную аннотацию, максимальное число липидов, отнесенных к одному пику, составило 134. В дальнейшей работе использовали только аннотированные пики. После аннотации и фильтрации пиков по времени удерживания в хроматографической колонке (от 0,6 до 19 мин), а также исключения вероятных контаминантов, осталось 844 пика.

Сравнение липидных профилей показало значительные различия между образцами жировой и мышечной ткани, в то время как между двумя разными образцами мышечной или жировой ткани различия были незначительными. Значения коэффициентов корреляции Пирсона по липидному составу для всех пар образцов представлены на рисунке 1, Б. Темные левый верхний и правый нижний квадраты показывают, что для мышечных тканей была характерна сильная корреляция в парах образцов. То же верно и для жировых тканей. Корреляции, выявленные при сравнении разных типов тканей, оказались существенно слабее. Так, коэффициенты корреляции между парами образцов из одной ткани (ткани мышц

объединили в одну группу) были равны в среднем 0,93 (разброс 0,73-0,99; 95 % доверительный интервал — от 0,86 до 0,97). При сравнении пар образцов из разных тканей коэффициенты корреляции составили в среднем 0,69 (разброс 0,48-0,86; 95 % доверительный интервал — от 0,61 до 0,79). Доверительные интервалы не перекрываются, следовательно, корреляции между образцами одной ткани по липидным профилям достоверно сильнее, чем между образцами разных тканей. Непарный тест Стьюдента также показал, что корреляции липидного состава в одних и тех же и в разных тканях различаются на уровне значимости $p < 0,01$.

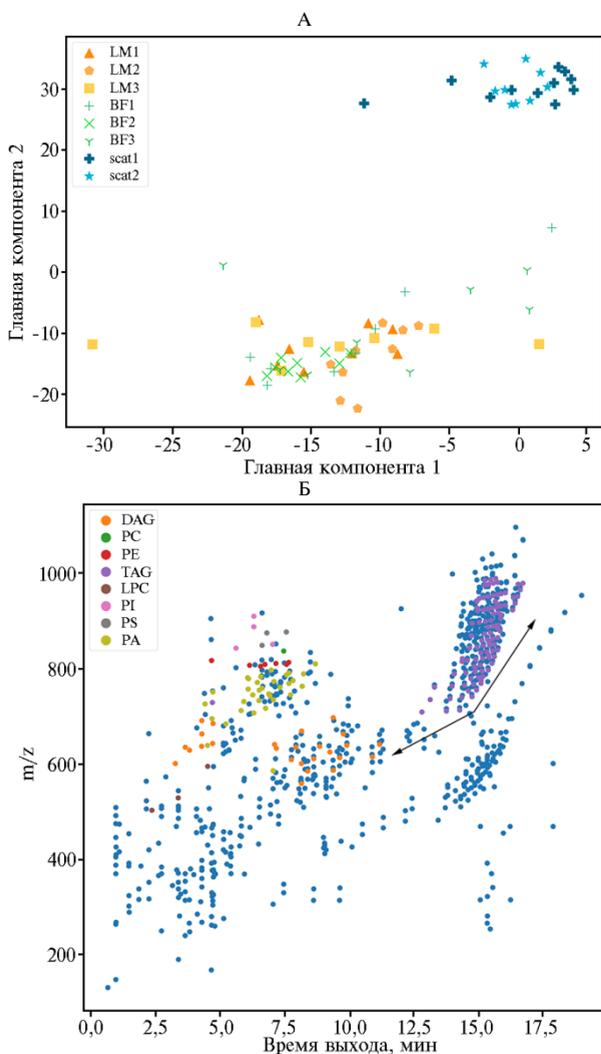


Рис. 2. Кластеризация изученных образцов жировой и мышечной ткани хряков породы дюрок ($n = 9$, масса $89,4 \pm 5,67$ кг, возраст 150-180 сут) по липидному составу: А — анализ методом главных компонент (показаны две первые компоненты, см. раздел «Методика»), Б — распределение отношения массы к заряду (m/z) по времени выхода для основных групп липидов; scat1 и scat2 — подкожный жир из дорсальной области, соответственно верхний и нижний слой, BF1, BF2 и BF3 — бицепс бедра сверху от спины, в середине и у колена, LM1, LM2 и LM3 — длинейшая мышца между 5-6-м, 8-9-м позвонками и в основании хвоста; TAG — триацилглицеролы, DAG — диацилглицеролы, PC — фосфатидилхолины, PE — фосфотидилэтаноламины, PS — фосфатидилсерины, PA — фосфатидные кислоты, PI — фосфатидилинозитолы, LPC — лизофосфатидилхолины. Стрелки указывают направления удлинения цепи (вправо вверх) и увеличения количества двойных связей (влево вниз). Точка соответствует одному образцу (Б). Измерения проводили методом жидкостной хроматографии в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией (приборы Acquity I-class, «Waters», США и Maxis Impact II, «Bruker Daltonik GmbH», Германия).

На рисунке 2, А показаны две первые главные компоненты. Видно, что образцы сгруппированы в два кластера — LM + BF и scat1 + scat2, которые линейно разделимы. Этим подтверждаются различия образцов мышечной и жировой ткани по составу липидов.

Мы аннотировали основные группы липидов: три- и диацилглицеролы (TAG и DAG), фосфатидилхолины (PC, включая лизофосфатидилхолины LPC), фосфатидилэтаноламины (PE), фосфатидилсерины (PS), фосфатидные кислоты (PA) и фосфатидилинозитолы (PI) для всех образцов жировой и мышечной ткани (см. рис. 2, Б). Как оказалось, образцы жировой ткани обогащены триацилглицеролами, мышечной — фосфолипидами.

График отношения m/z (масса/заряд для соответствующего иона) ко

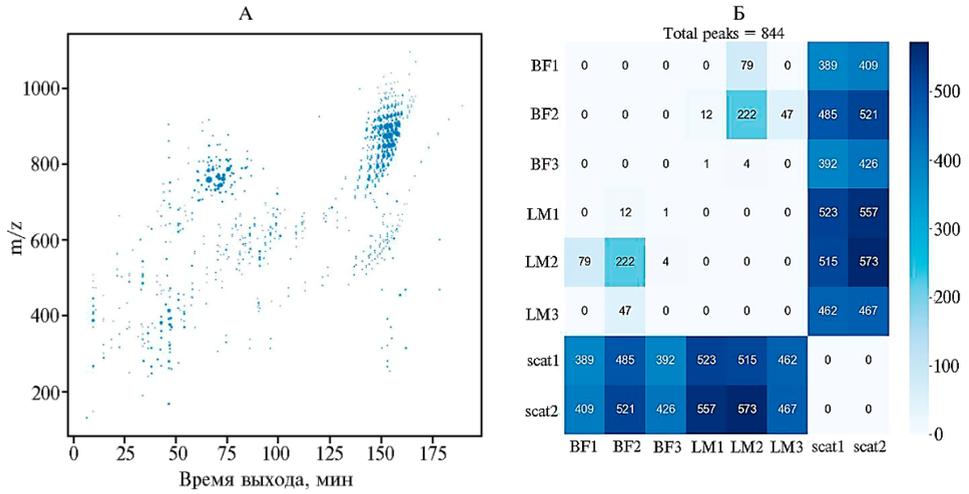


Рис. 3. Разнообразие липидного состава мышечной и жировой ткани у хряков породы дюрок ($n = 9$, масса $89,4 \pm 5,67$ кг, возраст 150-180 сут): А — распределение отношения массы к заряду (m/z) по времени выхода (размер точек соответствует средней интенсивности пика по всем образцам); Б — таблица, отражающая число статистически значимых пиков для пар тканей (при $p = 0,05$), оцененных t -критерием Стьюдента с поправкой Бенджамини-Хохберга. Полное число оцениваемых пиков — 844. Интенсивность синего цвета соответствует числу различающихся пиков, белый цвет — отсутствие или минимальное число таких пиков. Обозначения scat1 и scat2 — подкожный жир из дорсальной области, соответственно верхний и нижний слой, BF1, BF2 и BF3 — бицепс бедра сверху от спины, в середине и у колена, LM1, LM2 и LM3 — длинная мышца между 5-6-м, 8-9-м позвонками и в основании хвоста. Измерения проводили методом жидкостной хроматографии в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией (приборы Acquity I-class, «Waters», США и Maxis Impact II, «Bruker Daltonik GmbH», Германия).

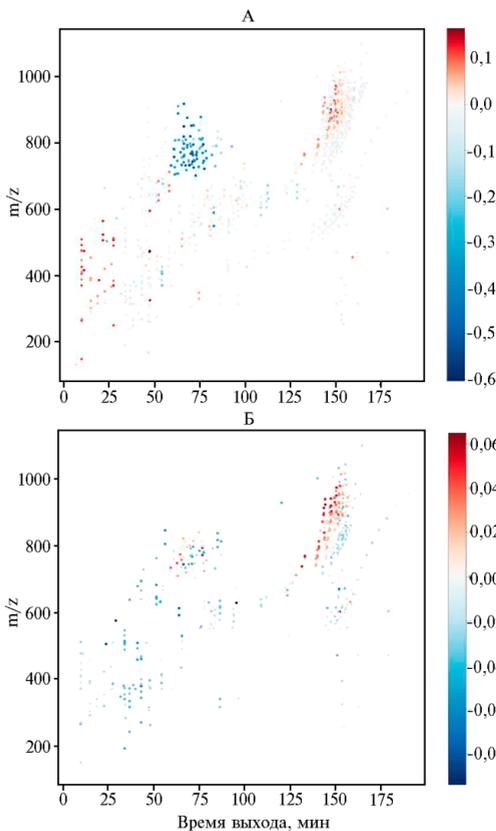


Рис. 4. Графики зависимости m/z (масса/заряд) от времени выхода пиков липидов для мышечной и жировой ткани (А) и двух участков мышечной ткани — усредненного образца мышечной ткани бицепса BF и усредненного образца длинной мышцы LM (Б). Графики построены на основании натуральных логарифмов (\ln) отношения интенсивности пиков. Цветом обозначены различия интенсивности пиков: красный цвет — интенсивность пика выше в жировом образце (А) и в бицепсе (Б), синий — в мышечном образце (А) и длинной мышце (Б); белый цвет означает, что интенсивности пиков в сравниваемых образцах равны. Измерения проводили методом жидкостной хроматографии в сочетании с времяпролетной масс-спектрометрией (приборы Acquity I-class, «Waters», США и Maxis Impact II, «Bruker Daltonik GmbH», Германия).

времени выхода (рис. 3, А) показывает различия в интенсивности пиков разных липидов. Размер точки на графике соответствует средней интенсивности пика по всем образцам. Чтобы найти различия между тканями, проводили множественный t -тест. Для каждой пары тканей и для каждого пика рассчи-

тывали р-значение для гипотезы о равных средних. Величины р-значения скорректировали для множественного тестирования по Бенджамини-Хохбергу, пики со скорректированными р-значениями менее 0,05 считали статистически значимыми (см. рис. 3, Б). Видно, что образцы жировой ткани существенно не различались между собой, но заметно отличались от образцов мышечной ткани. Хотя в целом доминировали различия между мышечной и жировой тканью, некоторые липиды статистически значимо различались также в двух мышцах — BF2 и LM2. Различия между мышечной и жировой тканью для всех отфильтрованных пиков интенсивности оценивали по величине натурального логарифма отношения между интенсивностью пиков усредненного мышечного и усредненного жирового образцов (рис. 4, А). Различия между тканями бицепса (BF) и тканями длиннейшей мышцы (LM) по пикам оценивали аналогичным образом (см. рис. 4, Б).

Полученные нами результаты показывают эффективность жидкостной хроматографии, совмещенной с времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения при молекулярном фенотипировании сельскохозяйственных животных, в частности свиней.

Жирнокислотный состав в общем случае дает только опосредованное представление о жировом составе мяса, недостаточное для описания его липидной композиции (6, 27). Масс-спектрометрический анализ в режиме регистрации положительно заряженных ионов дает развернутое представление о жировом составе тканей и охватывает большинство классов липидов — TAG, DAG, PC, PE, PS, PA, PI, LPC и др. (28). Результаты проведенного нами анализа показывают отсутствие существенных различий в общем жировом составе между участками мышц, но проявление ожидаемого существенного различия в липидных профилях мышечной и жировой ткани. На основании такого анализа можно оптимизировать процедуру оценки жирового состава мышечных тканей животных.

Отметим, что у свиней липидный анализ образцов тканей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения, в режиме регистрации положительных ионов никем ранее не выполнялся. Нами выявлено различие между коэффициентами корреляции липидного состава для образцов из одних и тех же ($r = 0,93$) и из разных ($r = 0,69$) тканей. Достоверность этих различий подтверждена непересекающимися доверительными интервалами на уровне значимости $p < 0,05$ и непарным тестом Стьюдента с р-значением $< 0,01$. Высокая корреляция липидных профилей между образцами, полученными из одного органа или из двух разных мышц, свидетельствует о хорошей воспроизводимости метода. Наши результаты показывают, что образцы мышечной ткани обогащены фосфолипидами, а жировой — триацилглицеролами. Триацилглицеролы различаются по суммарной длине цепей образующих их жирнокислотных остатков и по суммарному количеству двойных связей. Увеличение суммарной длины приводит к увеличению времени удерживания в хроматографической колонке, в то время как добавление двойной связи, напротив, его сокращает. Благодаря этому хромато-масс-спектрометрические пики, относящиеся к триацилглицеролам, образуют на графике зависимости m/z от времени удержания паттерны, похожие на сеть (29). Ненасыщенные триацилглицеролы объединяются в единую группу пиков в верхней левой части облака всех пиков, относящихся к триацилглицеролами (см. рис 2, Б). Интересно, что различия между мышечной и жировой тканью, равно как и различия между двумя мышцами, в основном затрагивают полине-

насыщенные триацилглицеролы, в то время как представленность 0-2-ненасыщенных жиров фактически не изменяется. Использование автоматической аннотации хромато-масс-спектрометрических пиков позволяет существенно очистить данные от контаминантов. Аннотация может быть дополнительно улучшена при помощи внутренних стандартов или учета сетеподобных паттернов, описанных выше. Перечисленные направления выходят за рамки представляемой публикации, но мы планируем продолжить эти исследования в дальнейшем.

Итак, полученные нами результаты показывают, что у свиней мышечная ткань обогащена фосфолипидами, а жировая — триацилглицеролами. В целом липидные профили образцов из разных тканей различаются, из одной и той же — проявляют сходство. Образцы, взятые из разных точек одной мышцы, не различаются значимо между собой, тогда как несходство для разных мышц статистически достоверно при $p < 0,05$ (в непарном тесте Стьюдента p -значение $< 0,01$). Жидкостная хроматография, совмещенная с времяпролетной масс-спектрометрией, позволяет быстро, надежно, эффективно и объективно определять молекулярные фенотипы сельскохозяйственных животных, в частности их липидные профили, с целью качественной оценки особей в процессе селекции.

¹Центр наук о жизни, АНОА ВО Сколковский институт науки и технологий,

143026 Россия, г. Москва, ул. Нобеля, 3,
e-mail: A.Pavlova@skoltech.ru ✉, A.Vanyushkina@skoltech.ru,
E.Yushina@skoltech.ru, A.Egorova@skoltech.ru, D.Petrova@skoltech.ru ✉,
N.Anikanov@skoltech.ru, P.Mazin@skoltech.ru;

²ФГАОУ ВПО Московский физико-технический институт (государственный университет),

141701 Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9;

³ФГБНУ Федеральный научный центр

животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: belousa663@gmail.com

Поступила в редакцию
17 сентября 2018 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 6, pp. 1262-1273

LIPID COMPOSITION OF MUSCLE AND FAT TISSUES OF DUROC PIGS (*Sus scrofa domesticus* Erxleben, 1777) — FEATURES AND CORRELATIONS

A.S. Pavlova¹, A.A. Vanyushkina¹, E.A. Ushina¹, A.N. Egorova^{1, 2}, D.A. Petrova¹,
A.A. Belous³, N.A. Anikanov¹, P.V. Mazin¹

¹Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, 3, ul. Nobelya, Moscow 143026 Russia, e-mail A.Pavlova@skoltech.ru (✉ corresponding author), A.Vanyushkina@skoltech.ru, E.Yushina@skoltech.ru, A.Egorova@skoltech.ru, D.Petrova@skoltech.ru (✉ corresponding author), N.Anikanov@skoltech.ru, P.Mazin@skoltech.ru;

²Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 9, Institutskii per., Dolgoprudny, Moscow Province, 141700 Russia;

³Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail belousa663@gmail.com

ORCID:

Pavlova A.S. orcid.org/0000-0003-0726-8395

Vanyushkina A.A. orcid.org/0000-0002-2538-689X

Ushina E.A. orcid.org/0000-0001-7774-4145

Egorova A.N. orcid.org/0000-0002-0405-9590

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant No. 14.604.21.0182, identification No. RFMEFI60417X0182)

Received September 17, 2018

Petrova D.A. orcid.org/0000-0001-6803-1717

Belous A.A. orcid.org/0000-0001-7533-4281

Anikanov N.A. orcid.org/0000-0001-7774-4145

Mazin P.V. orcid.org/0000-0001-9268-3352

doi: 10.15389/agrobiol.2018.6.1262eng

Abstract

A key direction in animal genetics and animal breeding is currently the study of metabolic characteristics of animals in combination with their genotyping, which leads to the development of the new specific markers for prediction the individual phenotypic characteristics of animals based on

correlation studies. This would further make possible to create new methods for animal phenotyping using lipid analysis techniques to assess the complex effect of environmental and genetic factors (D.P. Lo Fiego et al., 2002; D.P. Lo Fiego et al., 2005; R. Rossi et al., 2002). Data obtained as a result of the analysis of the genetic features of the animal and its metabolic characteristics make it possible to create predictive models for accurate phenotyping of animals and their offspring. In this work we have for the first time performed the comparative non-targeted mass-spectrometry study of the lipid composition of muscle and adipose tissue in Russian Duroc pigs using positive ion registration mode. The aim of the work was to carry out lipidomic analysis of the pig muscle and adipose tissue as an input for predictive models for animal phenotyping. The study was carried out on the samples of adipose and muscle tissue collected post-mortem from 150-180 day-old Duroc boars ($n = 9$). Samples were taken from three regions of the longest back muscle, three regions of the biceps femoris, and two regions of subcutaneous dorsal fat (72 samples in total). Analysis of the lipid compounds was performed by liquid chromatography coupled with high-precision time-of-flight mass spectrometry, preceded by the methyl tert-butyl ether and methanol extraction of lipids. Type of ionization used was electrospray. A total of 844 mass spectrometry peaks satisfied the quality criteria and were used for the statistical analysis. Peaks were annotated using the LIPID MAPS database search (<http://www.lipidmaps.org>), with an accuracy of 10 ppm. Statistical analysis shows significant differences in the Pearson correlation for adipose and muscular tissue samples compared or the same tissue samples compared. Correlation coefficients between lipid patterns of adipose and muscular tissue samples are lower (from 0.48 to 0.86, $r = 0.69$ on average with 95 % confidence interval from 0.61 to 0.79). Correlation coefficients between lipid patterns in two samples of muscle or adipose tissue are higher (from 0.73 to 0.99, $r = 0.93$ on average with 95 % confidence interval from 0.86 to 0.97). Unpaired t-test shows differences at p -value < 0.01 . Data clustering confirms the difference between muscle samples and subcutaneous fat samples. The main classes of lipids detected in the samples were triglycerides (TAG), diglycerides (DAG), phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylserines (PS), phosphatidic acids (PA), phosphatidylinositols (PI), and lysophosphatidylcholines (LPC). We have found that adipose tissue samples are enriched in triacylglycerols, while muscle tissue samples are enriched in phospholipids. To summarize, we have identified the main lipid types present in different regions of muscle and adipose tissue of pigs, and revealed the similarities and differences in the lipid composition between the two analyzed tissue types, as well as between two different types of muscles (biceps femoris and longissimus dorsi), and also between muscle and fat tissues. Considering the results obtained in this work we may conclude that liquid chromatography coupled with high-precision time-of-flight mass spectrometry efficiently produces accurate and reproducible lipidomes data. These data may be used in animal breeding, in the search for new genetic markers associated with economically important traits and in breeding programs to evaluate the traits determined by lipid composition.

Keywords: lipidome, animal phenotyping, *Sus scrofa domesticus*, pigs, Duroc boars, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, muscle tissue, adipose tissue.

REFERENCES

1. VanRaden P.M. Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.*, 2008, 91(11): 4414-4423 (doi: 10.3168/jds.2007-0980).
2. Sermyagin A.A., Gladyr' E.A., Kharitonov S.N., Ermilov A.N., Strekozov N.I., Brem G., Zinovieva N.A. Genome-wide association study for milk production and reproduction traits in Russian Holstein cattle population. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51(2): 182-193 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.2.182eng).
3. Koshiba S., Motoike I., Kojima K., Hasegawa T., Shiota M., Saito T., Saigusa D., Danjoh I., Katsuoka F., Ogishima S., Kawai Y., Yamaguchi-Kabata Y., Sakurai M., Hirano S., Nakata J., Motohashi H., Hozawa A., Kuriyama S., Minegishi N., Nagasaki M., Takai-Igarashi T., Fuse N., Kiyomoto H., Sugawara J., Suzuki Y., Kure S., Yaegashi N., Tanabe O., Kinoshita K., Yasuda J., Kawai Y. The structural origin of metabolic quantitative diversity. *Sci. Rep.*, 2016, 6: Article number 31463 (doi: 10.1038/srep31463).
4. Saito K., Matsuda F. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2010, 61(1): 463-489 (doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092035).
5. Zabolotnaya A.A., Bekenev V.A. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2013, spetsvyпуск 2: 29-31 (in Russ.).
6. Wood J.D., Enser M., Fisher A.V., Nute G.R., Sheard P.R., Richardson R.I., Hughes S.I., Whittington F.M. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Science*, 2008, 78(4): 343-358 (doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.019).
7. Lo Fiego D.P., Santoro P., Macchioni P., De Leonibus E. Influence of genetic type, live weight at slaughter and carcass fatness on fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue of raw ham in the heavy pig. *Meat Science*, 2005, 69(1): 107-114 (doi: 10.1016/j.meatsci.2004.06.010).
8. Cameron N.D., Cameron N.D., Enser M., Nute G.R., Whittington F.M., Penman J.C., Fisker A.C., Perry A.M., Wood J.D. Genotype with nutrition interaction on fatty acid composition of intramuscular fat and the relationship with flavour of pig meat. *Meat Science*, 2000, 55(2): 187-195 (doi: 10.1016/S0309-1740(99)00142-4).

9. Hogberg A., Pickova J., Babol J., Andersson K., Dutta P.C. Muscle lipids, vitamins E and A and lipid oxidation as affected by diet and RN genotype in female and castrated male Hampshire crossbreed pigs. *Meat Science*, 2002, 60(4): 411-420 (doi: 10.1016/S0309-1740(01)00153-X).
10. Smith S.J., Iverson S.J., Bowen W.D. Fatty acid signatures and classification trees: new tools for investigating the foraging ecology of seals. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1997, 56(4): 1377-1386 (doi: 10.1139/z97-026).
11. Joensen H., Grahl-Nielsen O. The redfish species *Sebastes viviparus*, *Sebastes marinus* and *Sebastes mentella* have different composition of their tissue fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2001, 129(1): 73-85 (doi: 10.1016/S1096-4959(01)00305-0).
12. Gallardo E., Narvaez-Rivas M., Pablos F., Jurado J. M., Leon-Camacho M. Subcutaneous fat triacylglycerols profile from Iberian pigs as a tool to differentiate between intensive and extensive fattening systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60(7): 1645-1651 (doi: 10.1021/jf2045312).
13. Perona J.S., Ruiz-Gutierrez V. Quantitative lipid composition of Iberian pig muscle and adipose tissue by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005, 28(15): 2445-2457 (doi: 10.1080/10826070500187707).
14. Narvaez-Rivas M., Pablos F., Jurado J. M., Leon-Camacho M. Authentication of fattening diet of Iberian pigs according to their volatile compounds profile from raw subcutaneous fat. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399(6): 2115-2122 (doi: 10.1007/s00216-010-4387-z).
15. Rezzi S., Ramadan Z., Martin F.P.J., Fay L.B., Van Bladeren P., Lindon J.C., Nicholson J.K., Kochhar S. Human metabolic phenotypes link directly to specific dietary preferences in healthy individuals. *J. Proteome Res.*, 2007, 6(11): 4469-4477 (doi: 10.1021/pr070431h).
16. Wilson I.D. Metabolic phenotyping by liquid chromatography-mass spectrometry to study human health and disease. *Anal. Chem.*, 2015, 87(5): 2519-2519 (doi: 10.1021/acs.analchem.5b00409).
17. Clausen M.R., Christensen K.L., Hedemann M.S., Liu Y., Purup S., Schmidt M., Callesen H., Stagsted J., Bertram H.C. Metabolomic phenotyping of a cloned pig model. *BMC Physiol.*, 2011, 11(1): 14 (doi: 10.1186/1472-6793-11-14).
18. Christensen K.L., Hedemann M.S., Jorgensen H., Stagsted J., Knudsen K.E. Liquid chromatography-mass spectrometry based metabolomics study of cloned versus normal pigs fed either restricted or ad libitum high-energy diets. *J. Proteome Res.*, 2012, 11(7): 3573-3580 (doi: 10.1021/pr201253h).
19. Rainville P.D., Theodoridis G., Plumb R.S., Wilson I.D. Advances in liquid chromatography coupled to mass spectrometry for metabolic phenotyping. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 61: 181-191 (doi: 10.1016/j.trac.2014.06.005).
20. Lo Fiego D.P., Macchioni P., Minelli G., Santoro P. Lipid composition of covering and intramuscular fat in pigs at different slaughter age. *Italian Journal of Animal Science*, 2010, 9(2): 200-205 (doi: 10.4081/ijas.2010.e39).
21. Rossi R., Corino C. Influence of long-term nutrition with different dietary fats on fatty acid composition of heavy pigs backfat. *Italian Journal of Animal Science*, 2002, 1(1): 7-16 (doi: 10.4081/ijas.2002.7).
22. Libiseller G., Dvorzak M., Kleb U., Gander E., Eisenberg T., Madeo F., Neumann S., Trausinger G., Sinner F., Pieber T., Magnes C. IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC Bioinformatics*, 2015, 16(1): 118 (doi: 10.1186/s12859-015-0562-8).
23. Smith C., Want E., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G. XCMS: Processing mass-spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.*, 2006, 78(3): 779-787 (doi: 10.1021/ac051437y).
24. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1995, 57(1): 289-300 (doi: 10.2307/2346101).
25. Hotelling H. Relations between two sets of variates. *Biometrika*, 1936, 28(3/4): 321-377 (doi: 10.2307/2333955).
26. Bozek K., Khrameeva E., Reznick J., Omerbaši D., Bennett N., Lewin G., Azpurua J., Gorbunova V., Seluanov A., Regnard P., Wanert F., Marchal J., Pifferi F., Aujard F., Liu Z., Shi P., Pääbo S., Schroeder F., Willmitzer L., Giavalisco P., Khativich P. Lipidome determinants of maximal lifespan in mammals. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5 (doi: 10.1038/s41598-017-00037-7).
27. Cameron N., Enser M. Fatty acid composition of lipid in Longissimus dorsi muscle of Duroc and British Landrace pigs and its relationship with eating quality. *Meat Science*, 1991, 29(4): 295-307 (doi: 10.1016/0309-1740(91)90009-F).
28. Cajka T., Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 61: 192-206 (doi: 10.1016/j.trac.2014.04.017).
29. Hummel J., Segu S., Li Y., Irgang S., Jueppner J., Giavalisco P. Ultra performance liquid chromatography and high resolution mass-spectrometry for the analysis of plant lipids. *Front. Plant Sci.*, 2011, 2: 54 (doi: 10.3389/fpls.2011.00054).