



ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЗАПАСНЫХ ЛИПИДОВ ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ЧАСТИЧНО ОБЕСЦВЕЧЕННОГО КОРАЛЛА *Sinularia heterospiculata*

© 2023 г. Т. В. Сикорская*, #, Д. Д. Солодий*, **, Е. В. Маськин*, **

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

**Дальневосточный федеральный университет, кафедра биохимии и биотехнологии, Институт Мирового океана,
Россия, 690922 Владивосток, п. Аякс, 10

Поступила в редакцию 09.11.2022 г.

После доработки 15.11.2022 г.

Принята к публикации 16.11.2022 г.

В связи с глобальным потеплением коралл теряет симбиотических динофлагеллят, что приводит к его обесцвечиванию. Исследования по восстановлению кораллов имеют первостепенное значение для сохранения экосистемы коралловых рифов. Липидомный подход может предоставить детальную информацию о процессах, протекающих в организме коралла при обесцвечивании и восстановлении. С помощью сверхкритической флюидной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией была изучена динамика изменений профиля молекулярных видов основных классов запасных липидов триацилглицеридов (ТГ) и моноалкилдиацилглицеридов (МАДАГ) в процессе восстановления октокоралла *Sinularia heterospiculata* после теплового стресса (32°C). Показано, что после перенесенного теплового стресса МАДАГ играют ключевую роль в энергетическом балансе организма *S. heterospiculata*. При стрессе *S. heterospiculata* в первую очередь расходовал насыщенные молекулярные виды МАДАГ. Изменения в профиле молекулярных видов ТГ происходили только на 16-е сутки эксперимента. Вероятно, при восстановлении после перенесенного стресса октокоралл *S. heterospiculata* меняет энергетическую стратегию, поэтому происходит перестройка качественного состава запасных липидов.

Ключевые слова: обесцвечивание кораллов, октокораллы, липидомика, хромато-масс-спектрометрия, запасные липиды

DOI: 10.31857/S0132342323050068, **EDN:** AQFLLS

ВВЕДЕНИЕ

Коралловые рифы – это уникальные тропические и субтропические экосистемы [1]. Половина известных в настоящее время видов коралловых полипов – симбиотические организмы, гастродермальные клетки которых содержат динофлагеллы семейства Symbiodiniaceae (СД). Известно, что коралловые рифы шельфовых зон находятся под угрозой исчезновения. Это связано с глобальным потеплением и, как следствие, повышением температуры воды поверхности океана, что приводит к разрушению симбиоза и потере СД или обесцвечиванию кораллов.

Коралловые рифы, помимо твердых, населяют мягкие кораллы (подкласс Octocorallia), которые

содержат в своих тканях известковые включения (спикулы). *Sinularia heterospiculata* относится к наиболее многочисленному отряду октокораллов Alcyonacea, в котором различают до 40 родов и 1200 видов [2]. Мягкие кораллы, обитающие на больших глубинах, не защищены от воздействий природных и антропогенных явлений, однако они лучше адаптированы к климатическим аномалиям по сравнению с рифообразующими кораллами [3]. На сегодняшний день исследования по различным аспектам обесцвечивания и восстановления основывались главным образом на изучении рифообразующих видов кораллов (подкласс Hexacorallia) [4, 5]. Изучение большего числа видов кораллов различных подгрупп может способствовать формированию более полного понимания механизмов процесса обесцвечивания кораллов. Исследования по восстановлению кораллов имеют первостепенное значение для сохранения экосистем коралловых рифов.

Сокращения: МАДАГ – моноалкилдиацилглицериды; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ТГ – триацилглицериды.

Автор для связи: (тел.: +7 (423) 231-09-05; эл. почта: miss.tatyanna@yandex.ru).

Ткани коралловых полипов богаты липидами [6]. Большую часть липидов кораллов составляют нейтральные липиды [7], к которым относятся триацилглицериды (ТГ), моноалкилдиацилглицериды (МАДАГ), воски (ЭВ, сложные эфиры алифатических спиртов и ЖК), стеринны (СТ), а также эфиры стериннов [8]. Встречаются также гликолипиды (ГЛ), фосфолипиды (ФЛ) и углеводороды. В коралловых полипах ТГ, МАДАГ и ЭВ служат основным резервом энергии, а ФЛ и СТ выполняют структурную функцию и составляют основу клеточных мембран. Измерение уровня липидов, содержания основных классов липидов и их молекулярных видов — один из основных методических подходов в изучении эффективности репродуктивной стратегии кораллов, степени повреждения и скорости восстановления частично обесцвеченных рифов, пищевых и симбиотических отношений кораллов, а также транспорта органического углерода между организм-хозяином и симбионтами [9, 10].

Целью данной работы — изучение профиля молекулярных видов основных классов запасных липидов ТГ и МАДАГ мягкого коралла (октокоралла) *S. heterospiculata* (тип Cnidaria, класс Anthozoa, подкласс Octocorallia, отряд Alcyoniina, семейство Alcyoniidae), а также изучение закономерностей изменения содержания ТГ и МАДАГ в процессе восстановления частично обесцвеченного коралла *S. heterospiculata* после перенесенного теплового стресса. В данной работе использована сверхкритическая флюидная хроматография с различным детектированием (масс-спектрометрическое, светорассеивающее детектирование).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нейтральные липиды (ТГ, МАДАГ и воски) — запасные соединения, которые кораллы накапливают и, таким образом, запасают энергию. Известно, что в процессе обесцвечивания и последующего длительного восстановления рифообразующие и мягкие кораллы восполняют дополнительную потребность в энергии за счет использования запасных классов липидов, но динамика содержания классов липидов и их молекулярных видов при обесцвечивании все еще не ясна [11].

Мягкий коралл *S. heterospiculata* был подвержен тепловому стрессу (32°C) и обесцвечен, а затем полностью восстановлен за период 205 суток. Изучение динамики суммарного содержания запасных липидов в экстракте показало, что общее содержание и ТГ и МАДАГ резко возросло сразу же после повышения температуры на 3-и сутки эксперимента (0-е сутки: ТГ = $1.83 \pm 0.24\%$ и МАДАГ = $3.74 \pm 0.32\%$; 3-и сутки: ТГ = $4.96 \pm 0.94\%$ и МАДАГ = $9.27 \pm 1.42\%$ от липид-

ного экстракта, $p < 0.05$) (рис. 1а). При этом относительное содержание ТГ и МАДАГ в данной точке достоверно не менялось ($p \geq 0.05$) (рис. 1б). После двухдневного теплового стресса (9-е сутки эксперимента) уровень ТГ и МАДАГ в липидном экстракте достоверно снижался до первоначального значения (ТГ = $1.09 \pm 0.35\%$ и МАДАГ = $1.99 \pm 0.59\%$ от липидного экстракта) (рис. 1а). Ранее было показано резкое снижение содержания ТГ в липидах рифообразующих кораллов, собранных около острова Сесоко (Окинава, Япония) [12], и снижение содержания ТГ и МАДАГ в липидном экстракте мягкого коралла *Sinularia* sp. [13] после теплового стресса. Относительное содержание ТГ и МАДАГ на 9-е сутки эксперимента по-прежнему оставалось неизменным ($p \geq 0.05$), но профиль молекулярных видов начал меняться (рис. 1в, 1г).

Основными ТГ и МАДАГ были 16:0/16:0/16:0, 18:0/16:0/16:0, 16:0алк/16:0/16:0 и 18:0алк/16:0/16:0 ($7.50 \pm 1.61\%$, $3.13 \pm 0.18\%$, $8.39 \pm 1.47\%$ и $23.14 \pm 2.55\%$ от суммы ТГ и МАДАГ), также липидный экстракт *S. heterospiculata* содержал ТГ и МАДАГ с полиненасыщенными ЖК (ПНЖК) 16:2/16:0/16:0, 18:3/18:4/18:3, 16:0алк/18:2/18:0 + 18:0алк/18:2/16:0 и 18:0алк/16:2/16:0 (8.88 ± 0.02 , 4.25 ± 1.04 , 3.85 ± 1.19 и $9.61 \pm 1.11\%$ от суммы ТГ и МАДАГ). Для изучения динамики изменения профиля молекулярных видов ТГ и МАДАГ насыщенные молекулярные виды, а также ТГ и МАДАГ с C₁₈ ПНЖК (маркерные ЖК симбионтов коралла [14–17]) были просуммированы (% от суммы ТГ и МАДАГ). Изменения профиля молекулярных видов запасных липидов исследуемого коралла начинали происходить только на 7-е сутки эксперимента. Первые изменения наблюдались в профиле МАДАГ. На 9-е сутки эксперимента снижалось содержание насыщенных молекулярных видов МАДАГ (0-е сутки: $32.11 \pm 1.56\%$; 9-е сутки: $24.51 \pm 0.98\%$ от суммы ТГ и МАДАГ, $p < 0.05$), на этом фоне возросло относительное содержание МАДАГ с C₁₈ ПНЖК (0-е сутки: $13.27 \pm 1.44\%$; 9-е сутки $17.82 \pm 0.13\%$ от суммы ТГ и МАДАГ, $p < 0.05$). Профиль ТГ начинал достоверно меняться только на 16-е сутки эксперимента (рис. 1в, 1г). Известно, что МАДАГ — маркерный класс липидов организма-хозяина коралла, тогда как основным источником ТГ выступают симбионты [16]. Ранее было показано, что популяция симбиотических динофлагеллят в октокоралле *S. heterospiculata* после двухдневного теплового стресса сокращалась в 3 раза от первоначального значения [18]. Таким образом, при утрате симбионтов как основного источника питательных веществ насыщенные молекулярные виды МАДАГ, синтезируемые самим организм-хозяином, играют важ-

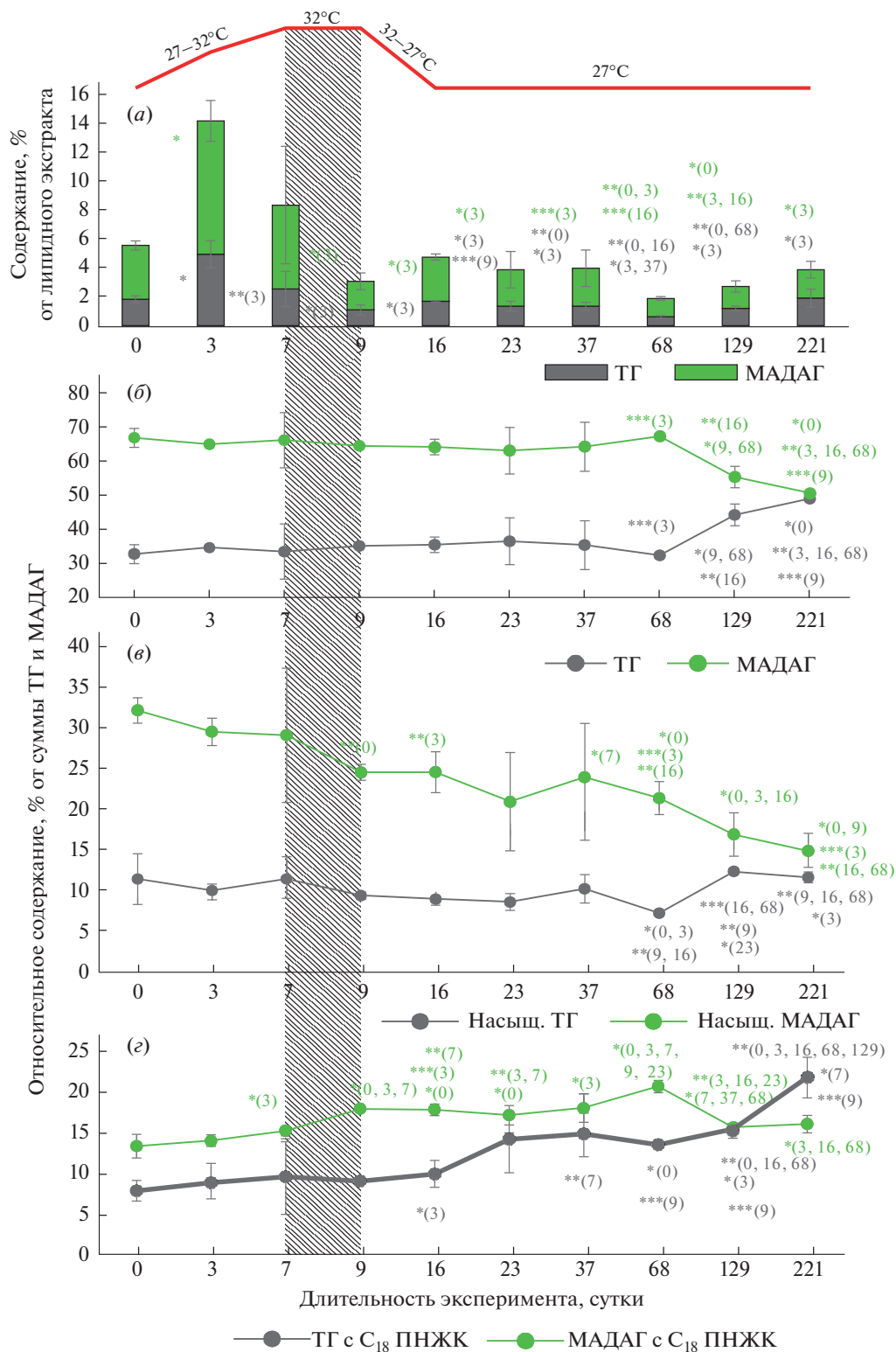


Рис. 1. Динамика изменения профиля запасных липидов при восстановлении октокоралла *S. heterospiculata* после перенесенного теплового стресса (32°C). (а) – Общее содержание триацилглицеролов (ТГ) и моноалкилдиацилглицеролов (МАДАГ) в липидном экстракте; (б) – относительное содержание ТГ и МАДАГ; (в) – относительное содержание насыщенных ТГ и МАДАГ; (г) – относительное содержание ТГ и МАДАГ с C₁₈ полиеновыми жирными кислотами. Дизайн эксперимента: 0–7-е сутки – повышение температуры (27–32°C), 7–9-е сутки – период обесцвечивания (заштрихованная область) при температуре 32°C, 9–16-е сутки – снижение температуры (32–27°C); 16–221-е сутки – период восстановления (27°C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ (парный t -тест); *(сутки) – в скобках указаны достоверно отличающиеся временные точки.

ную роль в энергетическом балансе частично обесцвеченного организма *S. heterospiculata*.

После перенесенного стресса октокоралл *S. heterospiculata* может менять энергетическую стратегию, поэтому мы наблюдали перестройку качественного состава запасных липидов в период восстановления. К концу эксперимента на 221-е сутки относительное содержание МАДАГ снижалось (0-е сутки: $67.17 \pm 2.80\%$; 221-е сутки: $50.81 \pm 0.73\%$, $p < 0.05$), а ТГ — возрастало (0-е сутки: $32.83 \pm 2.80\%$; 221-е сутки: $49.19 \pm 0.73\%$ от суммы ТГ и МАДАГ, $p < 0.05$). Содержание насыщенных ТГ немного возрастало от первоначального значения (221-е сутки: $11.63 \pm 0.66\%$ от суммы ТГ и МАДАГ, $p < 0.05$), существенно возрастало содержание ТГ с C₁₈ ПНЖК (0-е сутки: $7.08 \pm 1.28\%$; 221-е сутки: $21.69 \pm 2.49\%$ от суммы ТГ и МАДАГ, $p < 0.05$) и снижалось содержание насыщенных молекулярных видов МАДАГ (221-е сутки: $14.86 \pm 1.97\%$ от суммы ТГ и МАДАГ, $p < 0.05$) (рис. 1в, 1з). Ранее уже было показано, что после повторного обесцвечивания меняется динамика энергетического запаса и кальцификация рифообразующих кораллов *Orbicella faveolata*, *Porites divaricata* и *P. astreoides*. После первого обесцвечивания через 6 месяцев восстановления энергетический запас *O. faveolata* увеличивался, а после повторного обесцвечивания при восстановлении достоверно не менялся [19]. Вероятно, качественная перестройка запасных липидов — один из адаптационных механизмов в организме *S. heterospiculata* после перенесенного стресса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн эксперимента. Колонии коралла *S. heterospiculata* ($n = 40$) были вегетативно выращены в резервуаре объемом 500 л с аэрированной морской водой, подключенной к общей системе сквозной циркуляции морской воды (залив Петра Великого, Японское море). Колонии кораллов выращивали до 10 см в течение 1 года при 27°C. Колонии освещали белыми люминесцентными лампами (National, FL20SS-N/18). Фотопериод составлял 9 ч света, 15 ч темноты. Для выбора временных промежутков эксперимента по обесцвечиванию *S. heterospiculata* был проведен предварительный эксперимент. Экспериментальное обесцвечивание и дальнейшее восстановление *S. heterospiculata* длилось 221 сутки. С использованием автоматического термостата Platinum Heater (Aquael, Польша; $\pm 0.4^\circ\text{C}$) температура воды была повышена с 27 до 32°C с 0-х по 7-е сутки эксперимента. Затем, с 7-х по 9-е сутки (двухдневный период обесцвечивания), температуру поддерживали на постоянном уровне (32°C). С 9-х по 16-е сутки (7 суток) температура воды была снижена с 32 до 27°C. В течение

следующих 205 суток (с 16-х по 221-е сутки эксперимента) колонии коралла подвергали воздействию температуры 27°C для восстановления (рис. 1а). В десяти экспериментальных временных точках были отобраны по четыре колонии *S. heterospiculata* для экстракции липидов. Липиды выделяли из каждой колонии.

Липидомный анализ. Общие липидные экстракты были получены в соответствии с методикой Фолча [20] с некоторыми модификациями. Образец (~2 г) свежих тканей колоний коралла гомогенизировали в 4 мл смеси хлороформ/метанол (2 : 1, v/v) диспергатором (IKA T25 digital Ultra-Turrax, Германия), фильтровали. Остатки промывали 2 мл смеси хлороформ/метанол (2 : 1, v/v), а затем 6 мл хлороформа. В экстракт добавляли дистиллированную воду (15 мл) и оставляли на ночь для разделения фаз при 4°C. Нижний слой отбирали, упаривали и перерастворяли в хлороформе до конечной концентрации 10 мг/мл. Экстракты хранили в среде аргона при -40°C .

К липидному экстракту добавляли внутренний стандарт ТГ 18:1/18:1/18:1 (Avanti Polar Lipids, США). Молекулярные виды ТГ разделяли методом сверхкритической флюидной хроматографии на оборудовании Nexera UC (Shimadzu, Япония) на двух последовательно соединенных колонках Shim-Pack XR-ODSII (2.0 × 150 мм; Shimadzu, Япония) при постоянной скорости элюирования (0.6 мл/мин) сверхкритическим CO₂ с добавлением 35% метанола; максимальное давление в колонке составляло 50 МПа, температура колонки 17°C. Для оценки содержания молекулярных видов ТГ использовали светорассеивающий детектор ELSD LT II (Shimadzu, Япония; температура испарительной трубки 40°C, давление распыляемого газа (N₂) 0.4 МПа). Для идентификации молекулярных видов ТГ использовали масс-спектрометр с тройным квадрупольным масс-анализатором LCMS-8060 (Shimadzu, Япония); HCOOH (0.1% в MeOH) добавляли к элюенту, вытекающему из хроматографической колонки, с помощью микромиксера с прокачкой через постколону (0.2 мл/мин). Анализ проводили с помощью химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) в режиме положительных ионов. Спектры регистрировали при m/z 300–1200. Масс-спектры интерпретировали в соответствии со схемами фрагментации, опубликованными ранее [21, 22].

Статистический анализ. Значения приведены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. После проверки на нормальность (тест Шапиро–Уилка) достоверные различия между выборками исследовали с помощью множественного однофакторного ANOVA с последующим парным t -тестом. Статистическую вероятность $p < 0.05$ считали

значимой. Все статистические анализы проводили с использованием статистического программного обеспечения R (<https://www.r-project.org/>).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые была изучена динамика изменений профиля молекулярных видов запасных классов липидов (ТГ и МАДАГ) при восстановлении октокоралла *S. heterospiculata* после перенесенного теплового стресса (32°C). Показана повышенная потребность в энергии подверженного стрессу коралла *S. heterospiculata*. Насыщенные молекулярные виды МАДАГ, синтезируемые организмом-хозяином октокоралла, расходуются в первую очередь при стрессе. В период восстановления происходит качественная перестройка запасных классов липидов.

Данная работа показала, что липидомный анализ позволяет получить более детальную информацию о состоянии организма коралла в процессе обесцвечивания и восстановления. Полученные данные вносят важный вклад в изучение проблематики обесцвечивания и восстановления коралловых рифов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spalding M.D., Grenfell A.M. // Coral Reefs. 1997. V. 16. P. 225–230. <https://doi.org/10.1007/s003380050078>
2. Fabricius K., Alderslade P. // Soft Corals and Sea Fans: a Comprehensive Guide to the Tropical Shallow Water Genera of the Central-West Pacific, the Indian Ocean and the Red Sea. Townsville, Australia: Australian Institute of Marine Science, 2001. P. 77–103.
3. Rowley S.J., Robert T.E., Coleman R.R., Spalding H.L., Joseph E., Dorricott M.K.L. // Pohnpei, Federated States of Micronesia. In: Mesophotic Coral Ecosystems / Eds. Loya Y., Puglise K.A., Bridge T.C.L. Springer International Publishing, Cham, 2019. V. 12. P. 301–320. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0_17
4. McLachlan R.H., Price J.T., Solomon S.L., Grottoli A.G. // Coral Reefs. 2020. V. 39. P. 885–902. <https://doi.org/10.1007/s00338-020-01931-9>
5. Oliver T.A., Palumbi S.R. // Coral Reefs. 2011. V. 30. P. 429–440. <https://doi.org/10.1007/s00338-011-0721-y>
6. Yamashiro H., Oku H., Higa H., Chinen I., Sakai K. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 1999. V. 122. P. 397–407. <https://doi.org/10.1016/S0305-0491%2899%2900014-0>
7. Imbs A.B., Dang L.P.T., Nguyen K.B. // PLoS One. 2019. V. 14. e0215759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215759>
8. Hamoutene D., Puestow T., Miller-Banoub J., Wareham V. // Coral Reefs. 2008. V. 27. P. 237–246. <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0318-7>
9. Imbs A.B., Ermolenko E.V., Grigorchuk V.P., Dang L.T.P. // Coral Reefs. 2021. V. 40. P. 719–734. <https://doi.org/10.1007/s00338-021-02073-2>
10. Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Efimova K.V. // Coral Reefs. 2022. V. 41. P. 277–291. <https://doi.org/10.1007/s00338-022-02222-1>
11. Imbs A.B. // Russ. J. Mar. Biol. 2013. V. 39. P. 153–168. <https://doi.org/10.1134/s1063074013030061>
12. Yamashiro H., Oku H., Onaga K. // Fisheries Science. 2005. V. 71. P. 448–453. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.00983.x>
13. Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Imb, A.B. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2020. V. 524. 151295. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151295>
14. Imbs A.B. // Biochem. Syst. Ecol. 2014. V. 54. P. 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.01.016>
15. Imbs A.B., Latyshev N.A., Dautova T.N., Latypov Y.Y. // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2010. V. 409. P. 65–75. <https://doi.org/10.3354/meps08622>
16. Imbs A.B., Yakovleva I.M., Pham L.Q. // Fisheries Science. 2010. V. 76. P. 375–380. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0213-y>
17. Joseph J.D. // Prog. Lipid Res. 1979. V. 18. P. 1–30. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(79\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0163-7827(79)90002-X)
18. Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Boroda A.V., Ginanova T.T. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2021. V. 255. P. 110609. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110609>
19. Grottoli A.G., Warner M.E., Levas S.J., Aschaffenburg M.D., Schoepf V., McGinley M., Baumann J., Matsui Y. // Global Change Biology. 2014. V. 20. P. 3823–3833. <https://doi.org/10.1111/gcb.12658>
20. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.A. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
21. Byrdwell W.C. // Lipids. 2005. V. 40. P. 383–417. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-1398-9>
22. Sikorskaya T.V., Efimova K.V., Imbs A.B. // Phytochemistry. 2021. V. 181. 112579. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112579>

Dynamics of Storage Lipids during the Recovery of Partially Bleached Coral *Sinularia heterospiculata*

T. V. Sikorskaya*, #, D. D. Solodiy*, **, and E. V. Maskin*, **

#Phone: +7 (423) 231-09-05; e-mail: miss.tatyanna@yandex.ru

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

**Far Eastern Federal University, Department of Biochemistry and Biotechnology, Ajaks 10, Vladivostok, 690922 Russia

Global warming is causing the loss of coral symbionts and their bleaching. Researches of coral recovery are very important for the conservation of coral reefs. The lipidomic approach can provide detailed information about the processes that take place in the coral during bleaching and recovery. Using supercritical fluid chromatography in combination with mass-spectrometry, the dynamics of the main classes of storage lipids triacylglycerols (TG) and monoalkyldiacylglycerols (MADAG) during the recovery of the octocoral *Sinularia heterospiculata* after heat stress (32°C). It was shown that MADAG plays an important role in the energy balance of *S. heterospiculata* after heat stress. Under stress, the coral *S. heterospiculata* primarily consumed saturated MADAG molecular species. Changes in the profile of TG molecular species occurred only on the 16th day of the experiment. Probable, the stressed octocoral *S. heterospiculata* changes its energy strategy during recovery; therefore, the qualitative composition of reserve lipids is rearranged during the recovery period.

Keywords: coral bleaching, octocorals, lipidomics, chromatography-mass-spectrometry, storage lipids