

*На правах рукописи*

Сикорская Татьяна Васильевна

ЛИПИДОМ СИМБИОТ - СОДЕРЖАЩИХ КОРАЛЛОВ И ЕГО ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОБЕСЦВЕЧИВАНИИ

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН)

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник  
**Имбс Андрей Борисович**

**Официальные оппоненты:**

**Федореев Сергей Александрович**  
доктор химических наук, ведущий научный  
сотрудник, заведующий лабораторией химии  
природных хиноидных соединений  
Тихоокеанского института биоорганической химии  
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

**Некрасов Эдуард Витальевич**  
кандидат биологических наук, старший научный  
сотрудник лаборатории интродукции  
Амурского филиала Ботанического сада-института  
ДВО РАН

**Ведущая организация:**

Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М.Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва

Защита состоится «29» сентября 2020 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 005.005.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423)231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН, [www.piboc.dvo.ru](http://www.piboc.dvo.ru)).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета, к.б.н.



Чингизова Е.А.

## Актуальность исследования и степень его разработанности

Коралловые рифы образуют одну из самых важных экосистем Мирового океана. Структурную основу рифа составляют рифообразующие кораллы (шестилучевые коралловые полипы, Anthozoa: Hexacorallia: Scleractinia), которые имеют твердый известковый экоскелет, а также мягкие кораллы (восьмилучевые коралловые полипы, Anthozoa: Octocorallia), которые можно разделить на горгонарии (Gorgonacea), имеющие внутри колоний кератиноподобный осевой скелет, и альционарии (Alcyonacea), содержащие внутри колонии мелкие известковые спиккулы. На коралловом рифе часто встречаются другие представители шестилучевых коралловых полипов – зоантарии (Anthozoa: Hexacorallia: Zoanthidea), колонии которых, в отличие от твердых кораллов, не имеют экоскелета, но, подобно альционариям, содержат известковые спиккулы.

Почти половина видов коралловых полипов содержит фотосинтетические микроводоросли, которые называют зооксантеллами (zooxanthellae). Такая ассоциация растений и животного сформировала целую экосистему кораллового рифа, который считается «оазисом в пустынном океане». Действительно, коралловые рифы занимают менее чем 0.2% площади Мирового океана и при этом включают 30% известных морских видов. Такое высокое биоразнообразие обеспечивает продовольствием почти 500 миллионов человек, позволяет ежегодно получать доходы от индустрии туризма и защиты прибрежных районов на сумму, оцениваемую примерно в 375 миллиардов долларов США. Из-за экологической важности коралловых рифов и угрозы их исчезновения за прошедшие два десятилетия кораллы изучали весьма интенсивно.

Существование симбиотических видов коралловых полипов полностью зависит от наличия зооксантелл, которые в процессе фотосинтеза вырабатывают питательные вещества, обеспечивая до 90% энергии, необходимой организму-хозяину. При температуре воды выше 32°C зооксантеллы покидают своего хозяина; потеря зооксантелл называется обесцвечиванием (bleaching). Полное обесцвечивание под действием температурного стресса приводит к гибели не только отдельных животных, но и целых морских экосистем, основой которых являются симбиотические животные, в частности, экосистем коралловых рифов. За последние полвека площадь коралловых рифов сократилась на 30%. Предполагается, что к 2050 году исчезнет 70% всех тропических рифов. В связи с этим, опубликовано множество исследований, касающихся механизмов образования симбиоза между полипом и зооксантеллами, регулирования биомассы симбионта организмом-хозяином, метаболизма симбиосом, а также влияния температурного стресса на морфологию и физиологию симбионтов и полипа. Однако липидомный подход к изучению взаимодействия организма-хозяина и симбионтов в коралле не использовался.

Ткани коралловых полипов богаты липидами, которые составляют до 30% сухой массы тканей. В нашей работе мы будем использовать определение, согласно которому липиды – это жирные кислоты и их производные, а также вещества, биосинтетически связанные с этими соединениями. Общие липиды, которые выделяют из колоний кораллов экстракцией органическими растворителями, содержат НЛ, ГЛ, ФЛ, а также СТ и углеводороды. Более половины общих липидов кораллов составляют НЛ, к которым относятся ТГ, МАДАГ, ЭВ или сложные эфиры алифатических спиртов и ЖК, а также эфиры стерина и СТ. В липидах зооксантелл содержится ряд ГЛ: МГДГ, ДГДГ, и СХДГ, которые характерны для мембран фотосинтетического аппарата растений, а также БЛ. Полярные липиды составляют 13–50% от общих липидов тропических кораллов. В состав полярных липидов кораллов входят ФЭ, ФХ, ФС и ФИ, ЛФХ, ЛФЭ, а также фосфолипид – ЦАЭФ. В кораллах ТГ, МАДАГ и ЭВ служат основным резервом энергии, а ФЛ и СТ выполняют структурную функцию и составляют основу клеточных мембран. В организме кораллов липиды вовлечены в ряд важных физиологических процессов, поэтому анализ липидов часто применяют в работах по определению репродуктивной стратегии, симбиотических и трофических связей, спектра питания, степени здоровья и восстановления индивидуальных колоний кораллов, общих энергетических затрат организма коралла и влияния условий окружающей среды. Все эти исследования выполнены с использованием анализа содержания и состава общих липидов, общих ЖК и отдельных классов липидов.

Общие липиды коралловых полипов содержат более десяти основных классов липидов, однако каждый класс липидов представляют собой сложную смесь индивидуальных молекул, неполярная часть которых различается по остаткам ЖК и алифатических спиртов. Кораллы, как и другие биологические объекты, содержат сотни молекулярных видов липидов. По аналогии с геномом, протеомом и метаболомом, общий спектр липидных молекул биологической системы определяется как «липидом», а картирование спектра липидов и определение их биологической роли называется липидомикой.

В настоящее время, благодаря появлению новых инструментальных методов, липидомный анализ широко применяется для диагностики многих заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена. При этом количество опубликованных научных работ по липидому человека и высших наземных животных на два порядка превышает количество исследований липидома морских организмов. Данные о полном липидоме кораллов, а также других видов морских беспозвоночных, отсутствуют. Мы предположили, что переход от классических интегральных показателей к липидомному анализу откроет новые возможности в изучении биохимии и экологии кораллов на молекулярном уровне. Фундаментом для таких исследований является расшифровка липидома коралловых полипов. Кроме того, установление и сравнение липидома симбиотического организма коралла в норме и в условиях стресса позволит изучить динамику изменения липидома коралла в процессе обесцвечивания на молекулярном уровне. Знание о характере изменений липидома симбиотической ассоциации откроют пути для определения ключевых молекулярных видов липидов, которые являются мишенью действия температурного стресса на симбиотический организм.

### **Цель и задачи исследования**

Дать полную характеристику липидомов симбиот-содержащих коралловых полипов из трёх отрядов (Scleractinia, Zoantharia и Alcyonacea), определить причины их сходства и различия, установить закономерности изменения липидома и их связь с морфологией и физиологией коралла при температурном стрессе.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить липидомы (химическую структуру и количество всех молекулярных видов НЛ, ГЛ и ФЛ) симбиот-содержащих коралловых полипов *Sinularia seaesensis*, *S. heterospiculata* (Octacorallia: Alcyonacea), *Palythoa tuberculosa* (Hexacorallia: Zoantharia) и *Acropora cerealis* (Hexacorallia: Scleractinia), собранных в прибрежных водах Вьетнама (Южно-Китайское море).

2. Провести сравнение липидомов коралловых полипов. Определить зависимость липидома книдарий от их таксономического положения. Сравнить состав молекулярных видов восков, главного резервного класса липидов, различных групп кораллов (симбиотических мягких и рифообразующих и асимбиотических мягких кораллов).

3. Из мягкого коралла *S. heterospiculata* и зоантарии *P. tuberculosa* выделить чистые фракции зооксантелл, расшифровать и сравнить липидомы этих фракций, определить зависимость между липидомом и температурной устойчивостью зооксантелл.

4. На примере *S. heterospiculata* исследовать динамику липидома, морфологические и физиологические изменения в клетках симбионтов и организма-хозяина в процессе обесцвечивания колоний под действием повышенной температуры в экспериментальных условиях, установить связь между изменениями липидома и физиологическими процессами, происходящими в симбиотическом организме коралла.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования**

Впервые для морских беспозвоночных животных, расшифрован полный липидом мягкого коралла *S. seaesensis* и *S. heterospiculata*, зоантарии *P. tuberculosa* и рифообразующего коралла *A. cerealis*, установлены химические структуры и содержание 381 молекулярных видов НЛ, ФЛ, ГЛ и БЛ. Впервые определены характерные особенности полных липидомов у трёх основных отрядов Anthozoa, установлены основные пути распределения ЖК при биосинтезе различных классов липидов. Впервые обнаружена способность книдарий без зооксантелл использовать ЖК бактериального происхождения

для биосинтеза молекул восков. Впервые расшифрован полный липидом симбиотических микроводорослей (зооксантелл), выделенных из *S. heterospiculata* и *P. tuberculosa*, найдены особенности состава молекулярных видов гликолипидов различных видов (кладов) зооксантелл с разной температурной устойчивостью. Определён состав молекулярных видов ТГ зооксантелл из альционии и зоантарии. Показана возможность изучения каждого члена симбиотической ассоциации в целой колонии коралла с использованием маркерных молекулярных видов липидов. В экспериментальных условиях, на примере симбиотического мягкого коралла *S. heterospiculata*, впервые определена динамика липидома при обесцвечивании (потере зооксантелл) кораллов под действием повышенной температуры. Показано изменение липидомных показателей на начальной стадии обесцвечивания при отсутствии достоверных изменений классических интегральных показателей, таких как уровень общих липидов и ЖК. Показано, что главной реакцией липидома *S. heterospiculata* на начальной стадии обесцвечивания является нарушение суточного ритма ГЛ, уменьшение уровней ТГ, МАДАГ и ГЛ, при постоянном уровне ЭВ и ФЛ. Этаноламинглицерофосфолипид (ФЭ) определен, как главная мишень теплового стресса среди структурных фосфолипидов *S. heterospiculata*. При действии повышенной температуры на вторые сутки быстро образуется большое количество окисленных и лизо-производных ФЭ. Впервые дана одновременная характеристика изменений липидома, физиологии и морфологии клеток симбионтов и организма-хозяина мягкого коралла в условиях теплового стресса.

На примере анализа морских кишечнополостных предложены новые подходы к анализу сложного комплекса молекулярных видов из смеси разных классов липидов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, сверхкритической флюидной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения; опубликованы схемы фрагментации и характеристические ионы широкого спектра молекулярных видов липидов. Результаты по динамике липидома при обесцвечивании кораллов могут быть использованы широким кругом специалистов по биохимии, экологии и биологии морских беспозвоночных животных для изучения симбиотических и трофических взаимодействий в морских донных сообществах, проведения экологического мониторинга и восстановления экосистемы коралловых рифов. Развитие липидомики морских организмов будет способствовать разработке рекомендаций по регулированию продуктивности морских систем.

### Методология и методы исследования

В данной работе использовали общепринятые методы химии липидов. Анализ молекулярных видов восков, ТГ, МАДАГ, ФЛ, ГЛ и БЛ проводили с помощью газовой, сверхкритической флюидной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГХ, СФХ и ВЭЖХ) с различными детекторами. Идентификацию профиля восков осуществляли масс-спектрометрией низкого разрешения с ионизацией электронным ударом, ТГ и МАДАГ – масс-спектрометрией низкого разрешения с химической ионизацией при атмосферном давлении, ФЛ, ГЛ и БЛ – tandemной масс-спектрометрией высокого разрешения с ионизацией электрораспылением. Морфологический и физиологический анализ клеток симбионтов и организма-хозяина коралла проводили с помощью электронной микроскопии и проточной цитометрии.

### Основные положения, выносимые на защиту

Липидом альционии *S. seaesensis*, альционии *S. heterospiculata*, зоантарии *P. tuberculosa* и рифообразующего коралла *A. cerealis* содержит не менее 129, 157, 150 и 156 молекулярных видов липидов, соответственно. Липидом зооксантелл *Durusdinium trenchii* и *Cladocopium* sp., выделенных из *S. heterospiculata* и *P. tuberculosa*, насчитывает не менее 58 молекулярных видов.

Липидом исследованных видов кораллов и их симбионтов зависит от таксономического положения организма-хозяина. Зооксантеллы и ткани организма-хозяина содержат уникальные молекулярные виды липидов, которые могут применяться, как биохимические маркеры. Кишечнополостные без симбионтов могут использовать для синтеза восков, главного резерва энергии, жирные кислоты ассоциированных бактерий.

Резкие различия в липидах симбионтов и организма-хозяина можно использовать для исследования состава и динамики липидов каждого члена сообщества без предварительного разделения.

Анализ молекулярных видов липидов, в отличие от анализа общих липидов и ЖК, позволяет отслеживать биохимические изменения в симбиотическом коралле на ранней стадии обесцвечивания.

Кратковременный экспериментальный температурный стресс не вызывает критических изменений структурных липидов в *S. heterospiculata*, что указывает на низкую степень риска потери мягких кораллов в экосистеме кораллового рифа в природных условиях после однодневного повышения температуры воды выше 32°C.

После 48 часов температурного стресса в тканях мягкого коралла происходят резкие физиологические изменения, которые сопровождаются существенными нарушениями липидома и приводят к гибели симбиотического организма.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность исследования обеспечивается использованием современных методов анализа и статистической обработкой экспериментальных данных.

Материалы диссертации были представлены в виде докладов на международной научной конференции «Scientific and technological developments of research and monitoring of marine biological resources» (Владивосток, 2017), конференции к 100-летию со дня рождения Льва Давидовича Бергельсона – основателя науки о липидах в России «Липиды XXI века. Первая четверть» (Москва, 2018), 3-ей международной конференции «SmartBio» (Каунас, Литва, 2019), международной конференции «Marine Biodiversity for a Healthy Ocean – Biodiversity, Functional Groups and Ocean Health» (Владивосток, 2019) и Годичной научной конференции ННЦМБ ДВО РАН (Владивосток, 2019).

### **Публикации**

Основные результаты исследований, проведенных по теме диссертации, опубликованы в российских и международных рецензируемых научных журналах «Биология моря», «Биоорганическая химия», «Химия природных соединений» и «Journal of Experimental Marine Biology and Ecology». Всего по теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах и 6 тезисов докладов на конференциях.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, посвященного липидам симбиотических видов кораллов и процессу обесцвечивания кораллов, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, 34 рисунка, 4 приложения и 208 литературных ссылок.

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность своему научному руководителю д.б.н. Имбсу Андрею Борисовичу и сотрудникам Лаборатории сравнительной биохимии ННЦМБ ДВО РАН Шеиной Валентине Петровне, д.б.н. Светашеву Василию Ивановичу, к.б.н. Харламенко Владимиру Ивановичу, к.б.н. Веланскому Петру Владимировичу, Григорчук Валерии Петровне и к.б.н. Ермоленко Екатерине Владимировне. Автор очень признателен научным сотрудникам ННЦМБ к.б.н. Бороде Андрею Викторовичу, к.б.н. Гинановой Талие Талгатовне, к.б.н. Ефимовой Ксении Владимировне и д.б.н. Латыпову Юрию Яковлевичу. Также автор признателен и благодарен начальнику 50-й экспедиции в Южно-Китайское море к.х.н. Юрченко Антону Николаевичу и всему командному составу НИС «Академик Опарин».

**Список используемых сокращений.** АФК – активные формы кислорода, БЛ – бетаиновые липиды, БЛ – бетаиновые липиды, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ГЛ – гликолипиды, ГХ – газовая хроматография, ДГДГ – дигалактозилдиацилглицериды, ДГКХ – диацилглицерилкарбоксигидроксиметилхолин, ЖК – жирные кислоты, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламин, МАДАГ – моноалкилацилглицериды, МГДГ – моногалактозилдиацилглицериды, НЛ – нейтральные липиды, окФЭ – окисленные этанолламинглицерофосфолипиды, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, СТ – стерины, СФХ – сверхкритическая флюидная хроматография, СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицериды, ТГ –

триацилглицериды, ТПЖК – тетракозаполиеновые жирные кислоты, ФИ – инозитглицерофосфолипиды, ФЛ – фосфолипиды, ФС – серинглицерофосфолипиды, ФХ – холинглицерофосфолипиды, ФЭ – этаноламинглицерофосфолипиды, ЦАЭФ – церамидаминоэтилфосфонат, ЭВ – эфиры восков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1 Материалы и методы

Колонии мягкого коралла *S. siaesensis*, зоантарии *P. tuberculosa* и рифообразующего коралла *A. cerealis* собирали в заливе Нячанг, Южно-Китайское море. Колонии мягкого коралла *S. heterospiculata* выращивали при 27°C в аэрированном резервуаре с морской водой (500 л). Из *P. tuberculosa* и *S. heterospiculata* были выделены чистые фракции динофлагеллят: ZP (из зоантарии) – *Durusdinium trenchii*, *Cladocopium* C1 и C3; ZS (из *S. heterospiculata*) – *Cladocopium* C1 и C3.

Для изучения изменений липидома коралла под действием стресса были проведены эксперименты по обесцвечиванию коралла *S. heterospiculata* при повышенной температуре (33°C). Физиологическое состояние клеток симбионтов и организма-хозяина коралла было проанализировано на проточном цитометре, а ультратонкие срезы тканей колоний *S. heterospiculata* исследовали с использованием просвечивающего и сканирующего электронных микроскопов.

Содержание классов липидов определяли классическими методами липидологии. Анализ молекулярных видов восков, ТГ, МАДАГ, ФЛ и ГЛ проводили различными хроматографическими и масс-спектрометрическими методами. Анализ фракции восков проводили газовой хромато-масс-спектрометрией с ионизацией методом электронного удара (EI). Сумму ТГ и МАДАГ разделяли сверхкритической флюидной хроматографией и анализировали методом масс-спектрометрии низкого разрешения в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Фосфорсодержащие липиды по классам разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на полярной фазе. Структуру молекулярных видов определяли методом tandemной масс-спектрометрии (MS/MS) высокого разрешения в режиме ионизации распылением в электрическом поле (ESI).

Все результаты измерений представлены, как средние значения со стандартным отклонением ( $\pm$ SD). В данной работе применяли различные статистические методы. Порогом значимости считали  $p < 0.05$ .

### 2 Результаты и обсуждение

#### 2.1 Полный липидом некоторых представителей коралловых полипов и их симбионтов

В данной работе впервые был установлен полный липидом некоторых представителей симбиотических кораллов различных подклассов: рифообразующего коралла *A. cerealis* и зоантарии *P. tuberculosa* (подкласс Hexacorallia), мягких кораллов *S. siaesensis* и *S. heterospiculata* (подкласс Octocorallia), а также зооксантелл, выделенных из *S. heterospiculata* и *P. tuberculosa*.

##### *Установление полного липидома на примере S. siaesensis*

В нейтральных липидах (неполярном липидоме) альционии *S. siaesensis* присутствуют воски, ТГ и МАДАГ. На примере *S. siaesensis* впервые расшифрован неполярный липидом коралла.

В масс-спектрах восков (общая формула  $R'OCOR$ , где  $R'$  и  $R$  – алкильные группы алифатического спирта и ЖК, соответственно) присутствуют пики молекулярных ионов  $M^+$ . Относительная интенсивность сигналов молекулярных ионов (относительно базового иона  $m/z$  57, 100%) значительно выше в спектрах насыщенных восков (10–13%), чем в спектрах ненасыщенных восков (1–2%) (рис. 1, А). Характеристическими ионами для насыщенных восков являются  $[RCOOH]^+$  (50–70%) и  $[R'-H]^+$  (7–14%), а для ненасыщенных восков –  $[RCO]^+$  (30–40%),  $[RCOOH]^+$  (6–10%) и  $[R'-H]^+$  (3–10%).

В режиме химической ионизации (APCI) молекулы ТГ образуют молекулярные ионы в протонированной форме  $[M+H]^+$ . В этих условиях наиболее вероятен отрыв ацильной группы в виде нейтральной молекулы  $RCOOH$  из положения  $sn-1$  или  $sn-3$ , что приводит к появлению в масс-спектре наиболее интенсивных сигналов соответствующих фрагмент-ионов (рис. 1, Б). Спектр также содержит

менее интенсивный сигнал иона  $[M-R'COOH]^+$ , образующийся в результате отрыва остатка ЖК в положении *sn*-2.

Масс-спектр каждого молекулярного вида МАДАГ также содержит сигнал иона  $[M+H]^+$ . В масс-спектре МАДАГ с тремя различными алифатическими цепями наиболее интенсивный сигнал (100%) дает ион  $[M-R'COO]^+$ , образованный при отрыве ЖК в положении *sn*-2, отрыв остатка ЖК в положении *sn*-3 дает менее интенсивный сигнал иона  $[M-R''COO]^+$  (<50%), а наименьшую интенсивность (<10%) имеет сигнал фрагмента  $[M-OR''']^+$  при отрыве остатка спирта в положении *sn*-1 (рис. 1, В).

Главными компонентами неполярного липида этой альционии являются (в процентах от общих липидов): цетилпальмитат (16:0/16:0), цетилстеарат (16:0/18:0) и стеарилпальмитат (18:0/16:0) (в сумме 14.07%); гексадекадиеноилдипальмитоилглицерин (16:2/16:0/16:0) и трипальмитин (16:0/16:0/16:0) (в сумме 3.51%); 1-*O*-октадецил-2,3-дипальмитоил-*sn*-глицерин (18:0alk/16:0/16:0), 1-*O*-гексадецил-2-пальмитоил-3-стеароил-*sn*-глицерин (16:0alk/16:0/18:0) и 1-*O*-гексадецил-2,3-дипальмитоил-*sn*-глицерин (16:0alk/16:0/16:0) (в сумме 3.87%).

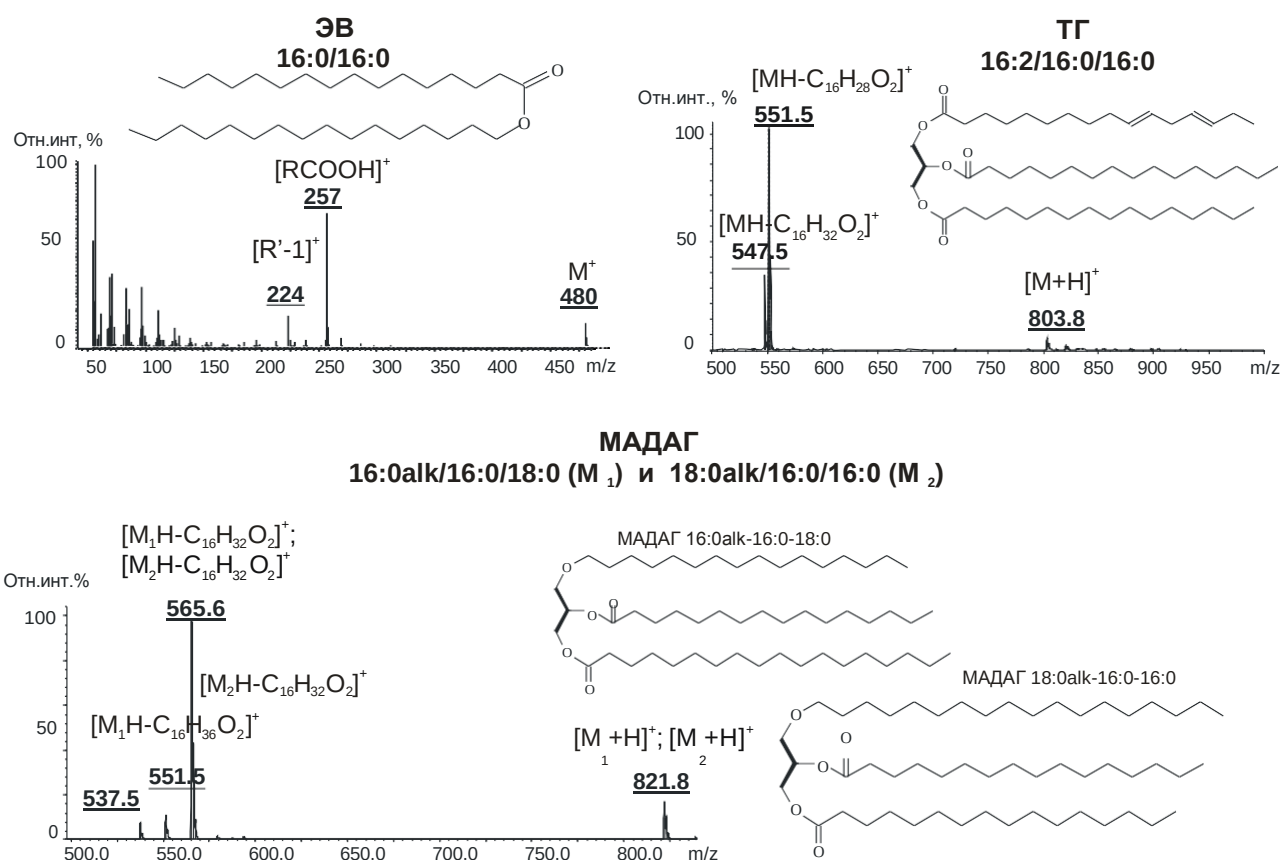


Рисунок 1 – Масс-спектрометрический анализ молекулярных видов неполярного липида мягкого коралла *Sinularia siaesensis*: масс-спектр (EI) цетилпальмитата (16:0/16:0); масс-спектры (APCI) триглицерида 16:2/16:0/16:0 и смеси изомерных моноалкилдиацилглицеролов 16:0alk/16:0/18:0 и 18:0alk/16:0/16:0

В полярной части липида альционии *S. siaesensis* присутствуют фосфолипид ЦАЭФ, глицерофосфолипиды ФЭ, ФХ, ФС, ФИ и ЛФХ, а также гликолипиды МГДГ, ДГДГ и СХДГ. В полярном липидоме альционии *S. siaesensis* идентифицировали 52 молекулярных вида ФЛ, главными компонентами были (в процентах от общих липидов): ФС 18:0alk/24:5 (1.20%), ЛФХ 18:0alk (1.06%), ФЭ 18:1alk/20:4 (0.91%), ФХ 18:0alk/20:4 (0.51%), ЦАЭФ 18:2b/16:0 (0.43%), СХДГ 14:0/16:0 (0.41%), ФИ 18:0/24:5 (0.20%).

ГЛ анализировали в тех же условиях, что и ФЛ, при этом времена удерживания МГДГ, ДГДГ и СХДГ находятся в интервалах 2.5–3.5, 11–14 и 13–15.5 мин соответственно. Молекулярные виды МГДГ и ДГДГ образуют интенсивные ионы  $[M+Na]^+$ , СХДГ –  $[M-H]^-$ . При расшифровке масс-спектров ГЛ и ФЛ использовали установленные ранее закономерности.



Методы расшифровки липида альтионии *S. siaesensis* использовали для установления липидомов зоантарии (*P. tuberculosa*, отряд Zoanthidea), альтионии (*S. heterospiculata*, отряд Alcyonacea) и акропоры (*A. cerealis*, отряд Scleractinia). Липидомы этих видов морских беспозвоночных животных имеют свои характерные черты, как в содержании отдельных классов липидов, так и в профиле молекулярных видов.

Липиды всех исследованных коралловых полипов включают воски, ТГ и МАДАГ. Содержание фосфорсодержащих липидов у акропоры превышает 30%, а у синулярии составляет не больше 13% от суммы липидов. ФЛ всех исследованных видов включают ФХ, ФЭ, ФС, которые являются основными классами полярных липидов, а также ФИ, ЦАЭФ и ЛФХ. Содержание ЦАЭФ в несколько раз больше у акропоры, представителя рифообразующих шестилучевых кораллов.

Липидомный подход позволил рассмотреть различия между представителями трёх отрядов на уровне индивидуальных молекул липидов. По профилю ТГ зоантария отличается как от акропоры, так и от синулярий. Только в зоантарии присутствуют ТГ, содержащие полиненасыщенные ЖК (ПНЖК) 22:5, такие как 22:5/16:0/16:0 и 22:5/16:0/18:0, а также относительно большое количество МАДАГ с арахидоновой кислотой. В липидах зоантарии и синулярий основными ТГ являются насыщенные молекулярные виды 16:0/16:0/16:0 и 16:0/16:0/18:0. В то же время, ТГ акропоры включают большой процент молекулярных видов с ПНЖК 18:3 и 22:6, например, 18:3/16:0/16:0 и 22:6/16:0/16:0.

Сравнение профилей молекулярных видов восков из различных групп кораллов (группа АМ – асимбиотические мягкие кораллы (*Mopsella spinosa*, *Menella flora* и *M. praelonga*); группа СР – симбиотические рифообразующие кораллы (*Acropora acuminata*, *A. cytherea* и *Turbinaria peltata*) и группа СМ – симбиотические мягкие кораллы (*Cladiella laciniosa*, *Sinularia brassica* и *S. robusta*)) показало, что общий профиль молекулярных видов ЭВ исследованных кораллов в значительной степени зависит от их таксономического положения и наличия зооксантелл. В этих видах кораллов обнаружили 83 молекулярных вида ЭВ, которые содержали от 28 до 42 атомов углерода. Основными компонентами ЭВ являются 16:0/16:0, 16:0/18:0, 16:0/18:1, 16:0/14:0 и 18:0/16:0. Анализ методом главных компонент показал различие в составе восков между группами СМ, СР и АМ (рис. 2).

Разделение групп СМ и СР по оси ГК1 вызвано прежде всего разным содержанием ненасыщенных восков. Доля молекулярных видов 16:0/16:1, 16:0/18:1 и 16:0/20:1 в восках альтионий достоверно меньше ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ), чем в восках рифообразующих кораллов. Мы полагаем, что зооксантеллы могут модулировать их уровень в кораллах и увеличивать долю насыщенных молекулярных видов восков, передавая организму-хозяину насыщенные ЖК. Разделение симбиотических и асимбиотических видов по оси ГК2 в большей степени обусловлено отрицательным влиянием переменных, суммирующих долю молекулярных видов с нечётным числом атомов углерода. Источником таких ЖК могут быть бактерии. Ассоциированные бактерии могут быть частичной «заменой» фотосинтетических симбиотических микроводорослей, как источника органического углерода в асимбиотических видах кораллов.

Профили молекулярных видов каждого класса ФЛ, которые заметно различаются как по составу ЖК, так и по молекулярной форме. Все основные молекулярные виды ФЭ всех видов мягких и рифообразующих кораллов, зоантарии, а также холодноводных гидрокораллов содержат арахидоновую кислоту и имеют алкилацильную форму, например, ФЭ 18:1alk/20:4, 16:1alk/20:4, 18:0alk/20:4 и 20:1alk/20:4. В отличие от ЖК шестилучевых кораллов, ЖК восьмилучевых кораллов и зоантарий содержат  $C_{24}$  ЖК, поэтому отличительной чертой ФЭ мягких кораллов является наличие небольшого количества молекулярных видов с тетракозаполиеновыми ЖК (ТПЖК) (18:1alk/24:5 и 18:0alk/24:5), а у зоантарии – с  $C_{24}$  метиленразделёнными ЖК (18:1alk/24:3).

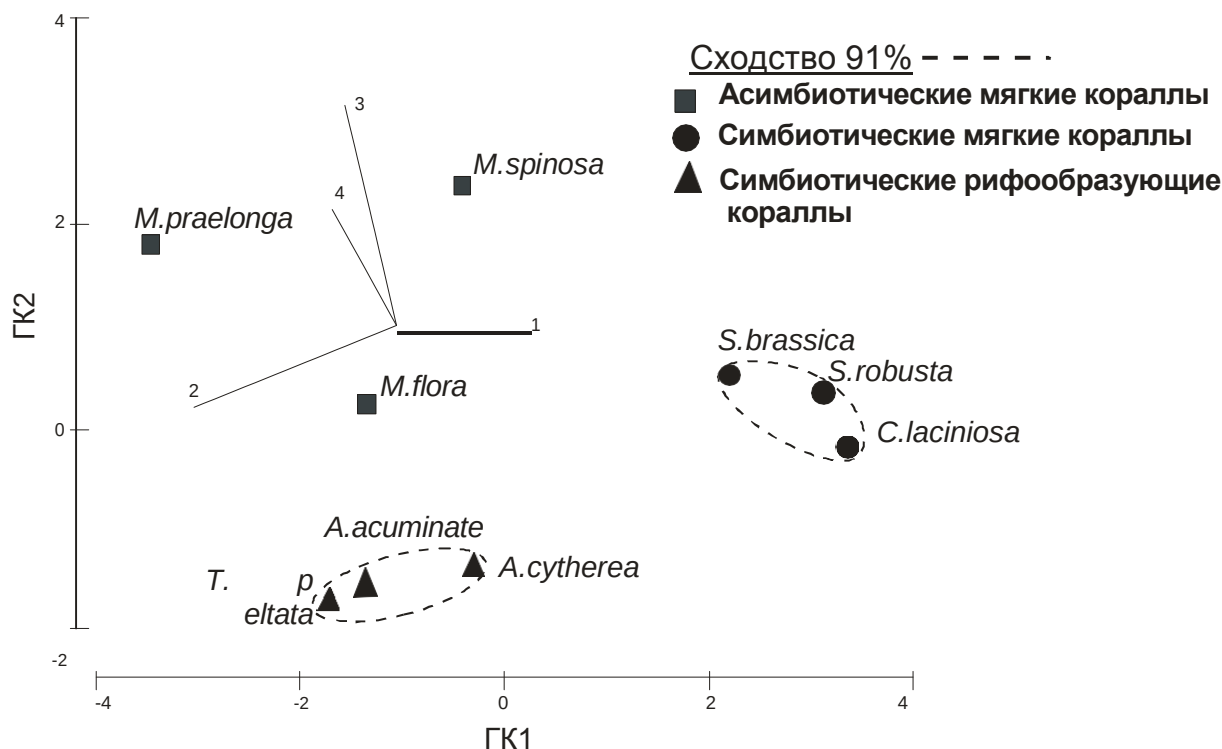


Рисунок 2 – Анализ по методу главных компонент данных по составу молекулярных видов восков различных групп кораллов. Анализ проведен по четырем переменным: 1 – общее содержание насыщенных восков с четным числом атомов углерода; 2 – общее содержание ненасыщенных восков с четным числом атомов углерода; 3 – общее содержание насыщенных восков с нечетным числом атомов углерода; 4 – общее содержание ненасыщенных восков с нечетным числом атомов углерода

Основные молекулярные виды ФХ в мягких и рифообразующих кораллах находятся в алкилацильной форме, тогда как в тропической зоантарии и в холодноводном гидрокоралле *Allopora steinegeri* на долю диацильных молекулярных видов приходится 41 и 45% от суммы ФХ, соответственно. Склерактиния *A. cerealis* и зоантария *P. tuberculosa* содержат большое количество молекулярных видов ФХ, в состав которых входит как  $C_{20}$ , так и  $C_{22}$  ПНЖК. В альционариях *S. siaesensis* и *S. heterospiculata* практически все молекулярные виды ФХ в положении *sn*-2 содержат  $C_{20}$  ПНЖК (20:4 и 20:5), что указывает на существенную разницу в путях биосинтеза ФХ в шестилучевых и восьмилучевых кораллах. Резкое различие состава неполярных частей молекул ФХ и ФЭ указывает на отсутствие в коралловых полипах биосинтеза ФХ путем модификации полярной части молекулы ФЭ, которая известна для высших животных.

Молекулярные виды ФС тропических мягких кораллов находятся в алкилацильной форме, а у акропоры, равно как у тропических и холодноводных гидрокораллов, идентифицировали только диацильные формы ФС. Тропическая зоантария и холодноводные альционарии заняли «промежуточное положение» и содержали как диацильные, так и алкилацильные молекулярные виды ФС. В молекулярных видах ФС гидрокораллов *Millepora* sp. найдены ацильные группы 22:4 и 22:5, т.е. ПНЖК с максимально возможной длиной углеводородной цепи для данной группы книдарий (Imbs et al., 2019). Известно, что ТПЖК являются хемотаксономическим маркером мягких кораллов и концентрируются в молекулярных видах ФС это группы кораллов. ТПЖК входят в состав основных молекулярных видов ФС мягких кораллов *Xenia* и *Gersemia* (Imbs et al., 2019; Imbs and Dang, 2017). У исследованных нами синулярий основными молекулярными видами ФС являются 18:0alk/24:5 и 18:0alk/24:6. В зоантарии *P. tuberculosa* самыми длинноцепочечными ЖК являются 24:2, 24:3 и 24:4, которые также сосредоточены в алкилацильных молекулярных видах ФС, но при этом основным диацильным молекулярным видом является ФС 18:0/22:4. Таким образом, ФС исследованных видов коралловых полипов состоит, в основном, из молекулярных видов, содержащих ПНЖК с максимально возможной длиной углеродной цепи для данного вида книдарий: рифообразующие кораллы и гидрокораллы –  $C_{22}$  ПНЖХ в составе диацильных ФС, а мягкие кораллы и зоантарии –  $C_{24}$  ПНЖК в составе алкилацильных ФС, при этом липиды зоантарии содержат также диацильные ФС с  $C_{22}$  ПНЖК.

Профили молекулярных видов ФИ акропоры и зоантарии очень схожи, но в ФИ зоантарии доля диацильных молекулярных видов ( $88.99 \pm 0.45\%$ ) меньше, чем в ФИ акропоры. В гидрокораллах *Millepora platyphylla* и *M. dichotoma* основные диацильные молекулярные виды ФИ те же, но при этом больше половины составляют алкилацильные молекулярные виды (18:0alk/17:1, 16:0alk/22:5 и 18:0alk/22:5) (Imbs et al., 2019). В исследованных нами двух видах синулярий, *S. siaesensis* и *S. heterospiculata*, которые способны синтезировать ТПЖК, основными ФИ являются 18:0/24:5 и 18:0/22:4, которые ранее идентифицировали в мягких кораллах *Xenia* и *Gersemia* (Imbs et al., 2019; Imbs and Dang, 2017).

ЦАЭФ – класс фосфоносфинголипидов, который обнаружен в липидах морских беспозвоночных. Наличие С-Р связи в аминоэтилфосфонатной полярной части молекулы определяет устойчивость ЦАЭФ к гидролитическим ферментам. Роль ЦАЭФ в формировании симбиотического сообщества до конца не ясна; существует гипотеза, что устойчивость ЦАЭФ к гидролизу помогает поддерживать целостность клеток зооксантелл при установлении симбиоза с коралловым полипом. Исследованные нами виды кораллов различаются не только по содержанию ЦАЭФ, но и по профилю молекулярных видов этого фосфонолипида. У мягких кораллов обнаружили 3 молекулярных вида ЦАЭФ с пальмитиновой кислотой в ацильной части и 18 атомами углеродов в сфингозиновом основании, при этом основным ЦАЭФ является 18:2b/16:0, так же как в гидрокораллах *Millepora dichotoma* и *M. platyphylla* (Imbs et al., 2019). Молекулярный вид ЦАЭФ с остатком гидроксикислоты (18:2b/16:0-ОН) составил 6.20 и 17.40% от суммы ЦАЭФ мягких кораллов *S. siaesensis* и *S. heterospiculata*, соответственно. У рифообразующего коралла также обнаружены в большом количестве молекулярные виды ЦАЭФ с гидроксильными группами как в ацильной части молекулы, так и в сфингозиновом основании, например, 18:2ОНb/16:0 и 18:3ОНb/16:0ОН являются основными и составляют более 50% от суммы ЦАЭФ. Только в зоантарии *P. tuberculosa* обнаружили *N*-метил производное ЦАЭФ церамидметиламиноэтилфосфонат (ЦМАЭФ), где такие молекулярные виды (ЦМАЭФ 18:2b/16:0, 18:2b/16:0-ОН и 19:2b/16:0) составляют более 60% от суммы фосфонолипидов.

#### *Липиды зооксантелл из P. tuberculosa и S. heterospiculata*

Из тканей альционии *S. heterospiculata* и зоантарии *P. tuberculosa* были выделены фракции чистых зооксантелл, которые обозначили, как ZS и ZP, соответственно. Генетическими методами установлено, что альциония содержит зооксантеллы клада С (*Cladocopium* C1 и C3), а зоантария содержит смесь зооксантелл клада С (*Cladocopium* C1 и C3) и клада D (*Durusdinium trenchii*). Известно, что симбиотические динофлагелляты рода *Durusdinium* более устойчивы к действию повышенной температуры, чем *Cladocopium*, поэтому фракцию ZP рассматривали, как термоустойчивую, а фракцию ZS – как термочувствительную. Определили липидом каждой фракции (ZS и ZP).

Известно, что основными классами липидов микроводорослей являются мембранные (ГЛ, ФЛ и БЛ) и запасные липиды (ТГ и ЭВ); в небольших количествах содержатся сфинголипиды, углеводороды и стерин. В составе общих липидов зооксантелл, выделенных из альционии и зоантарии, преобладают ГЛ и ФЛ, содержание которых в ZS и ZP является сходным (HSD test,  $p > 0.05$ ). В меньших количествах присутствуют ТГ, ЭВ, стерин и углеводороды. Среди фосфолипидов ZS идентифицировали ФХ, а в фосфолипидах ZP обнаружили ФХ, лизо-ФХ и ФЭ. По данным метода ВЭЖХ-МС в обеих фракциях зооксантелл присутствует бетаиновый липид ДГКХ. Если сравнивать липиды зооксантелл и организмов, из которых они были выделены, то можно сказать, что МАДАГ и ЦАЭФ являются маркерами тканей организма-хозяина, а бетаиновые липиды (ДГКХ) и гликолипиды (МГДГ, ДГДГ и СХДГ) характеризуют фотосинтезирующие симбионты.

Во фракциях ZP и ZS идентифицировали 10 молекулярных видов ДГКХ, два из которых (16:0/22:6 и 40:9) составили около 60% от суммы ДГКХ (рис. 3). Недавно на примере симбиотического рифообразующего коралла *A. valida* было показано, что в зооксантеллах *D. trenchii* основными молекулярными видами ДГКХ являются 38:6, 42:11 и 44:12, а в зооксантеллах *Cladocopium* C3 – 38:6, 36:5 и 44:12, при этом 44:12 составляет около 11% от суммы ДГКХ (Rosset et al., 2019). Молекулярный вид 22:6/22:6 (или 44:12) составляет не более 3% от суммы ДГКХ (рис. 3) в исследованных нами зооксантеллах, которые также, как и зооксантеллы коралла *A. valida*, принадлежат к родам *Durusdinium* и

*Cladocopium*. Только в зооксантеллах зоантарии (ZP) обнаружили ДГКХ с остатком сверхдлинноцепочечной C<sub>28</sub> ПНЖК (18:0/28:7), ранее найденной в свободноживущих динофлагеллятах *Amphidinium carterae*, *Cystodinium* sp. и *P. aciculiferum* (Rezanka et al., 2017). Возможно, что профиль бетаинового класса липидов зооксантелл (симбионтов) существенно модифицируется в зависимости от таксономического положения кораллового полипа (организма-хозяина).

Во фракциях ZP и ZS идентифицировали 21 молекулярный вид различных классов гликолипидов (МГДГ, ДГДГ и СХДГ). Содержание СХДГ+ДГДГ во фракции ZP (10.42±1.23%), состоящей из смеси зооксантелл *Durusdinium* и *Cladocopium*, было выше (HSD test,  $p < 0.05$ ), чем во фракции ZS (6.83±0.20%), которая состояла только из зооксантелл *Cladocopium*. В то же время содержание МГДГ в ZP (5.60±0.39%) было меньше (HSD test,  $p < 0.05$ ), чем в ZS (6.77±0.31%). Содержание высоко ненасыщенных молекул МГДГ было больше в ZP, чем ZS. Содержание 18:4/18:5 МГДГ было достоверно больше (HSD test,  $p < 0.05$ ) в ZP по сравнению с ZS, а содержание более насыщенных молекулярных видов МГДГ (36:8 и 18:3/18:4) во фракции ZP было в несколько раз меньше, чем во фракции ZS (рис. 3).

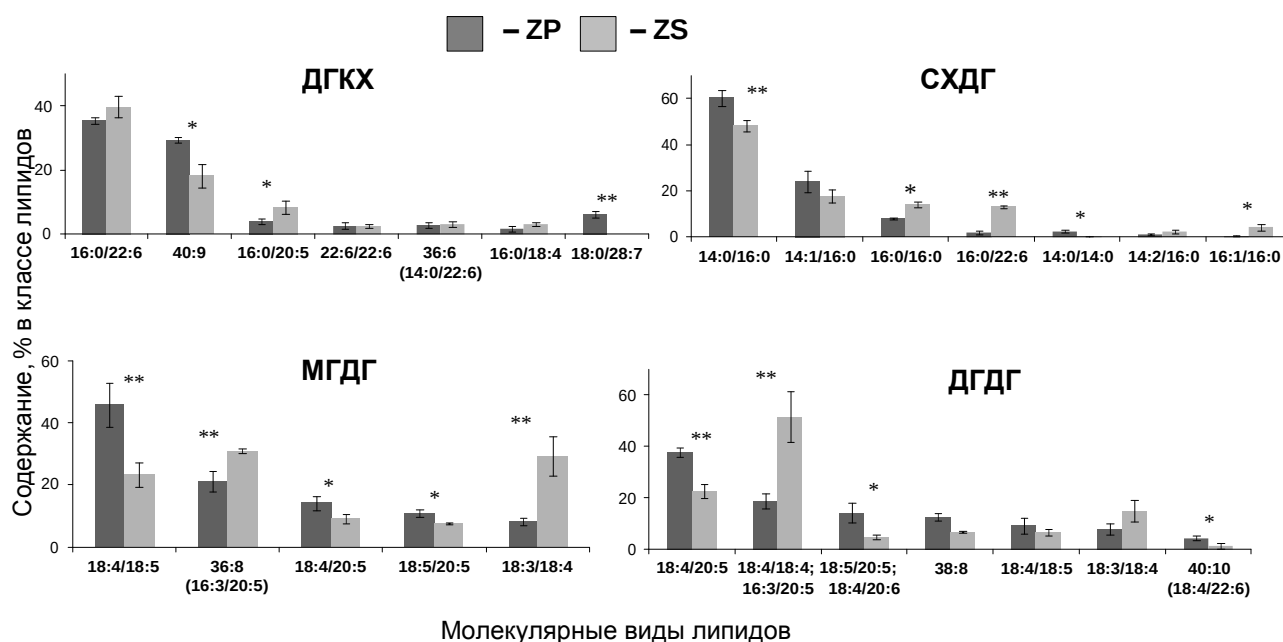


Рисунок 3 – Состав основных молекулярных видов (% от класса)

диацилглицерилкарбоксигидроксиметилхолинов (ДГКХ), сульфохинозидиацилглицеролов (СХДГ), моно- и дигалактозилдиацилглицеролов (МГДГ и ДГДГ) в зооксантеллах, выделенных из альционии *S. heterospiculata* (ZS) и зоантарии *P. tuberculosa* (ZP). Звездочкой отмечены молекулярные виды липидов, значения содержаний которых достоверно отличаются между различными видами зооксантелл (HSD test,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ )

Содержание высоко ненасыщенных молекулярных видов ДГДГ (40:10, 38:10 и 38:9) было в несколько раз больше в ZP (HSD test,  $p < 0.05$ ), тогда как содержание 36:8 ДГДГ было больше в ZS (HSD test,  $p < 0.05$ ) (рис. 3). Липиды ZP содержали больший процент насыщенных молекулярных видов СХДГ (14:0/16:0+16:0/16:0), чем ZS (HSD test,  $p < 0.05$ ) (рис. 3), а липиды ZS – большее количество моно- и диеновых молекулярных видов СХДГ (HSD test,  $p < 0.05$ ). Среди липидов обеих фракций зооксантелл также был обнаружен СХДГ 16:0/22:6. Его количество в ZS было в несколько раз больше, чем в ZP (HSD test,  $p < 0.05$ ).

На примере альционии и зоантарии мы показали, что липиды фракции зооксантелл, содержащие термоустойчивый вид *D. trenchii*, достоверно отличается повышенным содержанием СХДГ и насыщенных молекулярных видов СХДГ, а также пониженным уровнем МГДГ и большим содержанием высоко ненасыщенных молекул МГДГ и ДГДГ. Такие же закономерности состава ГЛ, отличающие *Durusdinium* от *Cladocopium*, были недавно найдены для зооксантелл, выделенных из рифообразующего коралла. Таким образом, видоспецифические особенности состава ГЛ зооксантелл, связанные с их термоустойчивостью, сохраняются независимо от таксономического положения организма-хозяина.

Повышение температуры морской воды выше 32°C вызывает повреждение фотосинтетического аппарата зооксантелл кораллов и, как следствие, обесцвечивание и массовую гибель коралловых рифов. Различные виды симбиотических микроводорослей семейства Symbiodiniaceae отличаются по степени устойчивости к повышению температуры окружающей среды. Установлено, что кораллы, которые содержат устойчивые к повышению температуры кланы зооксантелл, более устойчивы к обесцвечиванию. Известно, что род *Durudinium* является термически устойчивым, тогда как *Cladocopium*, наоборот, более термически восприимчивый. Наша работа и другие исследования липидома зооксантелл указывают на важность состава и степени насыщенности различных классов гликолипидов в термоустойчивости этих симбионтов. Предполагается, что повышенное содержание образующего бислой гликолипида ДГДГ является характерной чертой более термоустойчивых видов зооксантелл. Этот класс гликолипидов ДГДГ вносит вклад в поддержание правильной структуры и тепловой устойчивости фотосистемы. Повышенное содержание ДГДГ и более низкая степень ненасыщенности молекулярных видов СХДГ зооксантелл *Durudinium* может быть одной из причин устойчивости симбиотического организма в целом к температурному стрессу.

Впервые был установлен состав молекулярных видов ТГ зооксантелл, выделенных из альционии и зоантарии. Идентифицировали 13 молекулярных видов ТГ, различающиеся ЖК остатком в положениях *sn*-1(3) и *sn*-2. Среди молекулярных видов ТГ преобладал 18:3/18:4/18:3 (ZP – 22.35±4.16, ZS – 40.47±1.26% от суммы ТГ). Во фракции зооксантелл *S. heterospiculata* высокое содержание ТГ 18:3/18:4/18:3 коррелировало с высоким содержанием МГДГ 18:3/18:4 (рис. 3). Теоретически, ТГ 18:3/18:4/18:3 синтезируется из МГДГ 18:3/18:4 и локализуется в хлоропластах зооксантелл. Другие молекулярные виды ТГ зооксантелл с 16:0 ацильной группой в положении *sn*-2 (16:0/16:0/22:6, 16:2/16:0/22:6, 16:2/16:0/16:2, 16:2/16:0/16:0, 22:6/16:0/22:6, 18:0/16:0/22:6, 16:0/16:0/14:0 и 16:0/16:0/18:1) повторяют некоторые молекулярные виды целых колоний *S. heterospiculata* и *P. tuberculosa* (16:0/16:0/14:0, 16:2/16:0/16:2, 16:2/16:0/16:0 и 16:0/16:0/22:6). Если существует транспорт ТГ из клеток зооксантелл, то такие молекулярные виды могут составлять часть общих ТГ коралла и могут накапливаться в тканях организма-хозяина. Таким образом, молекулярные виды ТГ, различающиеся остатком ЖК в положении *sn*-2, могут иметь различные функции и локализуются в различных частях клеток зооксантелл.

## 2.2 Экспериментальное обесцвечивание альционии *Sinularia heterospiculata* под действием теплового стресса

Чтобы определить роль липидов в процессе обесцвечивания кораллов, экспериментальные колонии альционии *S. heterospiculata* в течение 36 часов подвергали тепловому стрессу (33°C), контрольные колонии содержали при естественной температуре обитания (27°C) и каждые 12 часов анализировали состав общих липидов, классов липидов и молекулярных видов каждого класса липидов в экспериментальных и контрольных образцах. Общие липиды *S. heterospiculata* включали запасные липиды, гликолипиды и структурные липиды ФЛ и БЛ. Основными запасными липидами были ТГ, ЭВ и МАДАГ, а среди гликолипидов обнаружили МГДГ, ДГДГ и СХДГ. Количество ДГДГ и СХДГ определяли в сумме из-за неполного разделения при анализе ТСХ. Среди структурных липидов присутствовали ФХ, ФЭ, ФИ, ФС, ЦАЭФ и ЛФХ. Лизо- и окси-производные этаноламинглицерофосфолипидов (ЛФЭ и окФЭ) были обнаружены только в экспериментальных колониях на 36-й час эксперимента. Ни экспериментальные, ни контрольные колонии не показали достоверных различий в содержании общих липидов на протяжении всего эксперимента (2-ways ANOVA).

В условиях теплового стресса уровни ТГ и МАДАГ зависели от времени. Через 36 часов содержание ТГ и МАДАГ в экспериментальных колониях снизилось вдвое по сравнению с контрольными образцами (HSD test,  $p < 0.05$ ). Хотя абсолютное среднее значение уровня восков (основного запасного класса липидов *S. heterospiculata*) в экспериментальных колониях увеличилось на 25%, статистически достоверной разницы между началом и концом эксперимента не обнаружили, поэтому общее

содержание запасных липидов (ТГ+МАДАГ+ЭВ) во всех исследуемых образцах достоверно не изменилось. Тепловой стресс не повлиял на уровень общих ФЛ во всех исследуемых образцах.

Ожидаемое снижение уровней МАДАГ и ТГ в колониях альционарий под действием температурного стресса сопровождалось необычным повышением содержания нескольких молекулярных видов восков с ацильной группой 16:2. Наша гипотеза об увеличении синтеза 16:2n-7 в тканях коралла в условиях стресса может объяснить накопление таких молекулярных видов ЭВ на ранней стадии обесцвечивания кораллов. Уменьшение содержания ТГ и увеличение содержания ЭВ в общих липидах твердого коралла *Montipora digitata* и мягкого коралла *Sinularia capitalis* были ранее зарегистрированы во время 48-часового экспериментального теплового стресса (33°C) (Imbs and Yakovleva, 2012). Напротив, для нескольких видов твердых кораллов после длительного периода обесцвечивания было зарегистрировано резкое снижение доли как восков, так и ТГ. Повышенный уровень восков у некоторых видов кораллов способствовал их термической устойчивости во время обесцвечивания в естественной среде обитания. Таким образом, в отличие от ТГ и МАДАГ, воски следует рассматривать, как резервный класс липидов кораллов, который может накапливаться при кратковременном тепловом стрессе и расходоваться во время длительного процесса восстановления после обесцвечивания.

Несмотря на стабильность общего содержания ФЛ, в экспериментальных колониях было замечено существенное снижение концентраций ФХ, ФЭ, ФИ после 36-ти часов теплового воздействия (HSD test,  $p < 0.05$ ) (рис. 4, А). Пропорция ЦАЭФ в экспериментальных колониях повысилась вдвое относительно контрольных образцов после 24-х часов эксперимента (HSD test,  $p < 0.05$ ). Тепловой стресс не повлиял на уровень ФС и ЛФХ. После 36 часов в ФЛ экспериментальных колоний обнаружили 23.9% окФЭ и 2.8% ЛФЭ (рис. 4, А). В контрольных колониях достоверных изменений в содержании отдельных классов ФЛ обнаружено не было (HSD test,  $p > 0.05$ ) (рис. 4, Б).

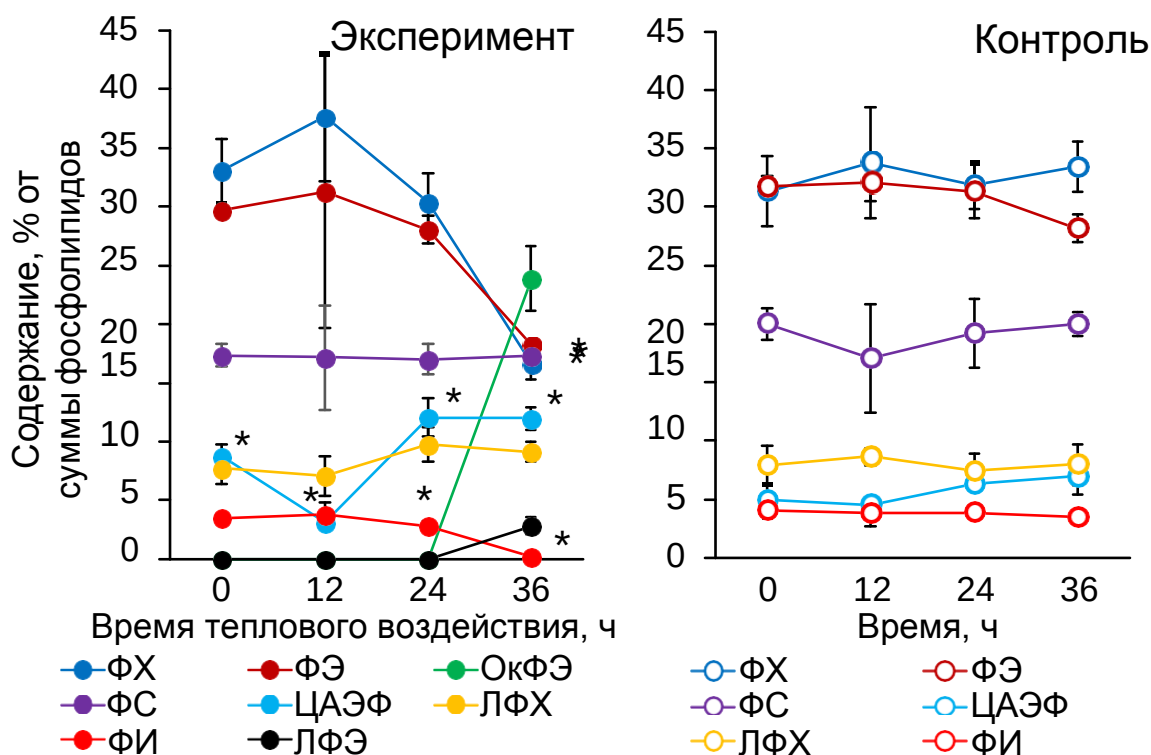


Рисунок 4 – Динамика изменений содержания (% от ФЛ) холин-, этаноламин-, серин- и инозитглицерофосфолипидов (ФХ, ФЭ, ФС и ФИ), лизо-ФЭ (ЛФЭ), лизо-ФХ (ЛФХ), перамидаминоэтилфосфоната (ЦАЭФ) и окисленного ФЭ (окФЭ) (% от ФЛ) в экспериментальных (33°C) и контрольных (27°C) колониях *S. heterospiculata*. Звездочкой отмечены точки, в которых значения достоверно отличаются от контроля (HSD test,  $p < 0.05$ )

Существенного влияния теплового стресса на содержание молекулярных видов ЦАЭФ не было замечено. Были обнаружены молекулярные виды окисленного ФС. Содержание трех молекулярных видов окФС ( $C_{37}H_{74}NO_{10}P$ ,  $C_{44}H_{82}NO_{12}P$ , и  $C_{45}H_{82}NO_{12}P$ ) в общих липидах всех колоний на протяжении

24-х часов достоверно не менялось, а на 36-й час немного возрастало (HSD test,  $p < 0.05$ ). ЦАЭФ и ФС на ранней стадии обесцвечивания, в отличие от ФИ, ФХ и ФЭ, не так подвержены тепловому воздействию и, вероятно, не участвуют в ответной реакции полипа на тепловой стресс. Распределение ЦАЭФ и ФС в клетках организма-хозяина и их роль в деградации симбиосом при обесцвечивании кораллов требуют дальнейших исследований. Два молекулярных вида ФИ, 18:0/22:4 и 18:0/24:5, составили 80% от суммы ФИ. Эти молекулярные виды ФИ содержат n-6 ПНЖК, а остальные – остатки n-3 ПНЖК. В экспериментальных колониях существенно снизилось содержание ФИ к концу эксперимента (рис. 4, А). Соотношение молекулярных видов ФИ с ПНЖК n-6/n-3 зависит от факторов температуры и времени и увеличивается вдвое (HSD test,  $p < 0.05$ ) после 36-ти часов тепловой обработки. Содержание ФХ с  $C_{16,18}$  ПНЖК снизилось, а концентрация ФХ с ЖК 20:4, наоборот, увеличилась с течением времени. Двукратное снижение во время эксперимента процентного содержания молекулярных видов ФХ с ПНЖК-маркерами зооксантелл (16:0alk/16:2, 16:0alk/16:3, 16:0alk/18:3 и 16:0alk/18:4) (рис. 4, А) указывает на быстрый катаболизм таких молекулярных видов при уменьшения поступления  $C_{16-18}$  ПНЖК после частичной потери зооксантелл на ранней стадии обесцвечивания. В начале эксперимента были идентифицированы только алкилацильные молекулярные виды ФЭ, но после 24 часов теплового воздействия в экспериментальных колониях появились диацильные формы ФЭ, содержание которых достигло 22% от суммы ФЭ к концу эксперимента. Повышение доли диацильных ФЭ привело к существенному снижению содержания всех алкилацильных ФЭ (HSD test,  $p < 0.05$ ).

В конце эксперимента в липидоме *S. heterospiculata* обнаружили два молекулярных вида нового класса фосфолипидов, которые составили 23% от суммы ФЛ (рис. 4, А). Эти молекулярные виды дают ионы  $[M-H]^-$  с  $m/z$  842.5660 и 870.5897, что согласуется с брутто-формулами  $[C_{45}H_{81}NO_{11}P]^-$  (расчетная масса 842.5547) и  $[C_{47}H_{85}NO_{11}P]^-$  (расчетная масса 870.5864). В результате  $MS^2$  фрагментации ионов  $[M-H]^-$  образуются пики с  $m/z$  464.3178 и  $m/z$  464.3188, что соответствует иону  $[C_{23}H_{47}NO_6P]^-$  (расчетная масса 464.3141; 1-О-октадеценилглицерофосфоэтаноламин). Сигнал иона глицеролфосфоэтаноламина с  $m/z$  196.0373, характерный для всех молекулярных видов ФЭ, появляется в  $MS^3$  спектре обоих компонентов. Мы идентифицировали новые молекулярные виды, как окисленные производные ФЭ (окФЭ), ацильные группы которых содержат четыре дополнительных атома кислорода.

Мы полагаем, что на ранних стадиях обесцвечивания альционии *S. heterospiculata* сильнее всего тепловой стресс влияет на ФЭ, о чем свидетельствуют резкое снижение уровня ФЭ и появление продуктов гидролиза (ЛФЭ) и окисления (окФЭ) этого класса липидов. Лизофосфолипиды и свободные ЖК обычно присутствуют в липидах коралловых полипов. Известно, что колонии кораллов содержат разнообразные молекулярные виды лизофосфолипидов, которые связаны с модуляцией мембранных свойств клеток кораллов, однако окисленные липиды ранее в кораллах обнаружены не были. В альционии *S. heterospiculata*  $C_{20-24}$  ПНЖК замещают положение sn-2 в глицериновом остове молекулярных видов ФЭ. По данным масс-спектрометрии общее количество атомов углерода в ацильных группах двух молекулярных видов окФЭ соответствует окисленным производным  $C_{22}$  и  $C_{24}$  ПНЖК. Мы полагаем, что окФЭ, найденные нами в липидах альционии после тепловой обработки, содержат в положении sn-2 окисленные ПНЖК. Интересно отметить, что фосфолипиды похожей структуры участвуют в регуляции воспаления, тромбоза, ангиогенеза и других важных процессов у высших животных. Предположительно, окФЭ может синтезироваться либо путем прямого окисления молекул ФЭ, либо этерификацией ЛФЭ окисленными ПНЖК. Одновременное появление ЛФЭ и окФЭ в экспериментальных колониях коралла (рис. 4, А) указывает на возможную биосинтетическую связь между ЛФЭ и окФЭ. Необходимы дальнейшие исследования для определения химической структуры, путей биосинтеза и биологических функций окФЭ в кораллах, подверженных тепловому стрессу.

Содержание хлорофилла и липидов в зооксантеллах может до некоторой степени варьироваться при термическом стрессе, но одновременное значительное снижение уровня хлорофилла и маркерных липидов четко указывает на повреждение и потерю зооксантелл в экспериментальных колониях *S. heterospiculata*. Уровень хлорофилла в этих колониях ( $120 \pm 19$  мкг/г с.в.) достоверно снизился (HSD test,  $p < 0.05$ ) уже после 12-ти часов теплового воздействия и составил  $53 \pm 4$  мкг/г с.в. к концу эксперимента. В контрольных колониях уровень хлорофилла не изменился (HSD test,  $p > 0.05$ ). Уровень ГЛ в колониях альционии достоверно менялся в зависимости от времени теплового воздействия. Через 36 часов в

экспериментальных колониях уровень МГДГ уменьшился на 80%, а уровень ДГДГ+СХДГ уменьшился в три раза (HSD test,  $p < 0.05$ ). В контрольных колониях уровень ГЛ достоверно не изменился ( $p > 0.05$ ). Кроме того, анализ ЖК, показал, что достоверно снижается относительное содержание маркерной ЖК зооксантелл 18:4n-3. Была обнаружена положительная корреляция между уровнями МГДГ ( $r = 0.7699$ ), ДГДГ+СХДГ ( $r = 0.7029$ ) и ПНЖК 18:4n-3.

Каждые сутки все колонии кораллов 12 часов находились на свету и 12 часов – в темноте. В контрольных колониях *S. heterospiculata* наблюдали циклические суточные колебания (HSD test,  $p < 0.05$ ) содержания некоторых молекулярных видов ГЛ (рис. 5), а именно, ДГДГ 16:0/16:3, ДГДГ 16:3/18:4 и СХДГ 16:0/16:2, а также суммы МГДГ (32:6, 32:5, 32:4, 16:0/16:3, и 16:3/18:5) с низким молекулярным весом (НМВ) и суммы МГДГ (16:3/18:4, 18:4/18:5, и 16:3/20:5) с высоким молекулярным весом (ВМВ). Процентное содержание ДГДГ 16:3/18:4, СХДГ 16:0/16:2 и НМВ было достоверно ниже (HSD test,  $p < 0.05$ ) в темновые периоды (0 и 24 ч), чем в световые периоды (12 и 36 ч). Напротив, концентрация ДГДГ 16:0/16:3 и ВМВ была достоверно выше в темновые периоды (HSD test,  $p < 0.05$ ). Была обнаружена отрицательная корреляция ( $r = -0.9702$ ) между концентрациями НМВ и ВМВ.

Суточные колебания в содержании липидов и ЖК известны для растений и, в частности, для водорослей. В отличие от контрольных колоний, в экспериментальных колониях альционии достоверных колебаний в составе молекулярных видов каждого класса ГЛ не было (HSD test,  $p > 0.05$ ), что указывает на нарушение суточного ритма биосинтеза ГЛ в оставшихся зооксантеллах альционии *S. heterospiculata* в условиях теплового стресса.

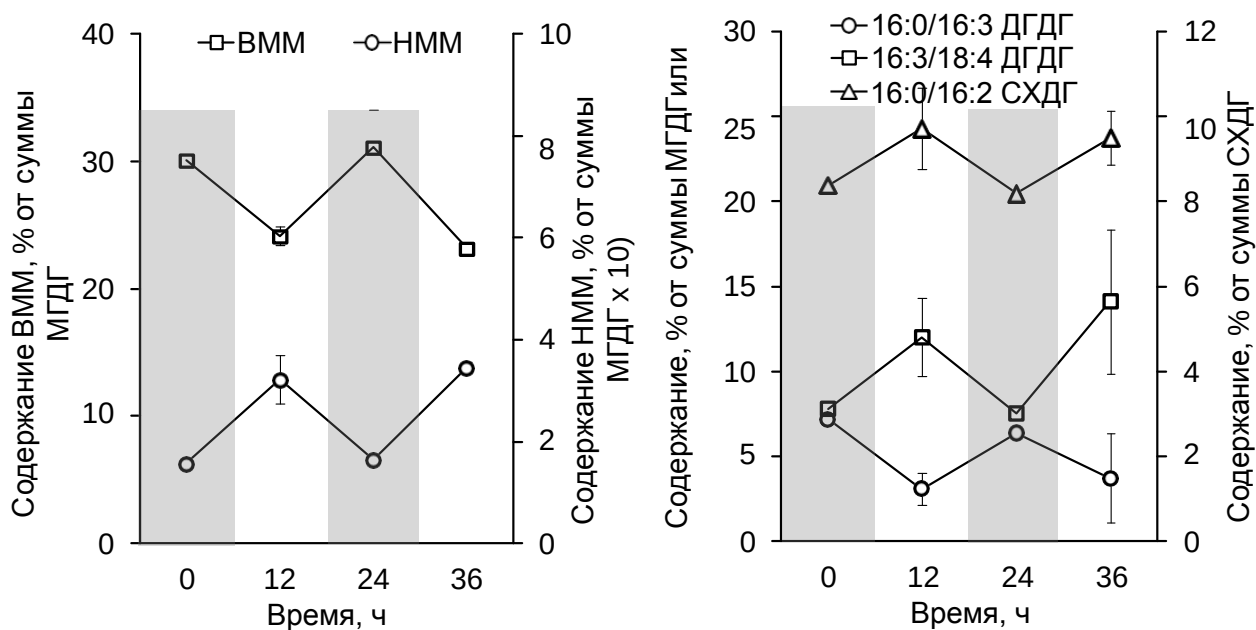


Рисунок 5 – Изменение содержания (% от класса липидов) молекулярных видов МГДГ с низкими и высокими молекулярными массами (НММ и ВММ), 16:0/16:3 ДГДГ, 16:3/18:4 ДГДГ, и 16:0/16:2 СХДГ в контрольных (27°C) колониях *S. heterospiculata*. Темным и светлым фоном обозначены, соответственно, темновой (12 ч) и световой (12 ч) периоды культивации колоний

ЖК синтезируются в пластидах водорослей, затем используются в синтезе пластидных липидов, включая «прокариотические» ГЛ (прокариотический путь), или экспортируются в эндоплазматический ретикулум (ЭР) для синтеза непластидных липидов (эукариотический путь), которые могут транспортироваться обратно в пластиды, чтобы служить предшественниками «эукариотических» молекулярных видов гликолипидов. ГЛ, синтезированные по прокариотическому пути, содержат  $C_{16}$  ПНЖК, а ГЛ эукариотического пути –  $C_{18-22}$  ПНЖК. Таким образом, суточные колебания в пропорции НМВ/ВМВ в *S. heterospiculata* связаны с балансом между прокариотическими и эукариотическими путями синтеза ЖК и/или обратным транспортом ПНЖК из ЭР в пластиды, а нарушение суточной цикличности можно объяснить влиянием теплового стресса на упомянутые процессы синтеза и транспорта ЖК в зооксантеллах.



Изучение физиологических и биохимических изменений в симбиотической ассоциации кораллов на ранней стадии обесцвечивания при тепловом стрессе важно для понимания механизмов запуска и развития процесса обесцвечивания кораллов. Липиды, которые являются структурной основой клеточных мембран и энергетическим резервом у кишечнорастворимых, принимают участие в ответной реакции симбионтов и организма-хозяина на термический стресс. Наш эксперимент показал, что не только общие липиды и отдельные их классы чувствительны к тепловому стрессу, но и профиль молекулярных видов липидов симбиотического коралла претерпевает существенные изменения, поэтому анализ липидома позволяет более углубленно изучить липидные изменения, в отличие от классического анализа состава общих ЖК и уровня общих липидов. Обнаруженные нами существенные изменения липидома коралла указывают, что 1) среди полярных липидов главной мишенью теплового воздействия является ФЭ; 2) тепловой стресс влияет на баланс между прокариотическими и эукариотическими путями синтеза ГЛ в зооксантеллах и обратный транспорт ПНЖК из ЭР в пластиды; 3) тепловой стресс нарушает перенос ПНЖК от симбионтов к тканям полипов коралла. Анализ динамики липидома позволяет предположить, что мягкий коралл *S. heterospiculata*, типичный представитель экосистемы коралловых рифов, способен быстро восстановить повреждения после перенесенного однодневного теплового стресса (24 ч), однако более продолжительный тепловой стресс вызывает качественную перестройку липидома, которая является критичной для нормального функционирования организма коралла и, скорее всего, потребует длительного периода восстановления.

### **2.3 Эксперимент по обесцвечиванию *S. heterospiculata* с дополнительным анализом методами электронной микроскопии и проточной флуориметрии**

Для того чтобы подтвердить основные закономерности в динамике липидома *S. heterospiculata*, которые мы наблюдали при действии теплового стресса, а также изучить физиологические изменения, происходящие в тканях коралла, и сопоставить их с изменениями липидома, мы повторили эксперимент по обесцвечиванию *S. heterospiculata*, но увеличили число повторов ( $n = 4$ ) и время эксперимента до 72 часов. Кроме того, для улучшения условий обитания колоний, вместо 40-литрового экспериментального аквариума, использовали аквариум большего объема (400 л). Липидомный анализ был проведен для контрольных колоний (27°C) и колоний, отобранных сразу после повышения температуры (0 ч) и через 24, 48 и 72 ч теплового воздействия (33°C). Так как липидные показатели контрольных образцов и собранных сразу после повышения температуры (0 ч) достоверно не отличались (HSD test,  $p > 0.05$ ), для упрощенного представления данных липидомного анализа контрольная точка не использовалась. Параллельно с анализом липидома, методом проточной флуориметрии оценивали физиологическое состояние (степень апоптоза и некроза) клеток коралла и зооксантелл в колониях при 27°C (контроль), в колониях сразу после поднятия температуры до 33°C (0 часов), а также через 24, 48 и 72 часа теплового воздействия (33°C). Морфологический анализ тканей проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) для контрольных колоний и колоний после 48 ч теплового воздействия.

По данным электронной микроскопии в гастродермальном слое коралла *S. heterospiculata* после 48 часов тепловой обработки заметно уменьшилась плотность зооксантелл, что также подтверждают данные проточной флуориметрии.

Процентное содержание хлорофилл-положительных клеток (зооксантелл) в суспензии поверхностных тканей коралла уменьшилось сразу после повышения температуры, достоверно снизилось с 31% до 8.6% через 24 ч теплового воздействия и затем не менялось до конца эксперимента (Z test,  $p < 0.05$ ) (рис. 6). Как и в первом эксперименте, в условиях повторного эксперимента основная потеря зооксантелл происходила в течение суток, тогда как количество клеток, подверженных окислительному стрессу (АФК-положительные клетки), достоверно нарастало после 24 ч теплового воздействия (рис. 6). Через 24 ч теплового воздействия в тканях коралла примерно вдвое снизилось количество хлорофилла *a* и содержание гликолипидов ДГДГ+СХДГ (HSD test,  $p < 0.05$ ) (рис. 6). Прямая корреляция между содержанием зооксантелл, хлорофилла и ГЛ означает, что основная причина снижения уровней хлорофилла и ГЛ – это снижение плотности зооксантелл, поэтому эти показатели

можно использовать для оценки потери зооксантелл (или степени обесцвечивания коралла) при тепловом стрессе.

Известно, что при повышении температуры в фотосинтетическом аппарате зооксантелл происходят нарушения, а ГЛ являются структурной основой тилакоидных мембран растений. Нами был сделан предварительный вывод о том, что тепловой стресс влияет на баланс между прокариотическими и эукариотическими путями синтеза ГЛ в зооксантеллах. По данным электронной микроскопии после 48 часов термического воздействия наиболее заметные признаки структурной деградации обнаружили в хлоропластах. Местами участки хлоропластов сливались, образуя более крупные и округлые органелльные тела. Нарушалась структура тилакоидов. Весьма вероятно, что это нарушение уменьшает скорость биосинтеза в пластидах зооксантелл «прокариотических» молекулярных видов МГДГ, при этом уровень таких МГДГ уменьшается, а уровень «эукариотических» молекулярных видов МГДГ, соответственно, увеличивается. Через 48 часов теплового воздействия уровень «прокариотических» молекулярных видов МГДГ достоверно снизился с  $44.06 \pm 4.46$  до  $30.86 \pm 2.13\%$ , а «эукариотических» – возрос с  $55.94 \pm 4.46\%$  до  $69.14 \pm 2.13\%$  от суммы МГДГ (HSD test,  $p < 0.05$ ).

В зооксантеллах экспериментальных колоний *S. heterospiculata* визуально было замечено увеличение числа пероксисом. Известно, что в неблагоприятных условиях клетки зооксантелл подвержены окислительному стрессу в связи с большой выработкой АФК. Наши данные проточной флуориметрии подтвердили, что тепловое воздействие привело к увеличению содержания АФК-положительных клеток зооксантелл с 30 до 63% после 72-х часов (рис. 6). Пероксисомы тесно связаны с хлоропластами и митохондриями. Одной из функций этих структур является утилизация молекул АФК, индуцируемые другими органеллами, например, фотосинтетическим аппаратом зооксантелл при фотоингибировании. Возможно, что именно поэтому количество АФК-положительных клеток зооксантелл возрастает одновременно с увеличением числа пероксисом в клетках симбионтов мягкого коралла.

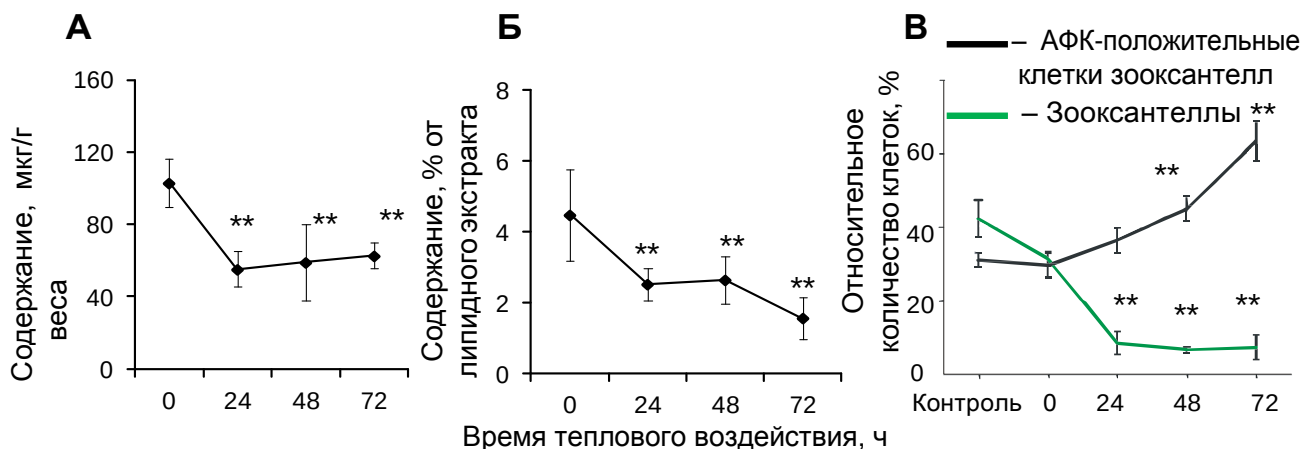


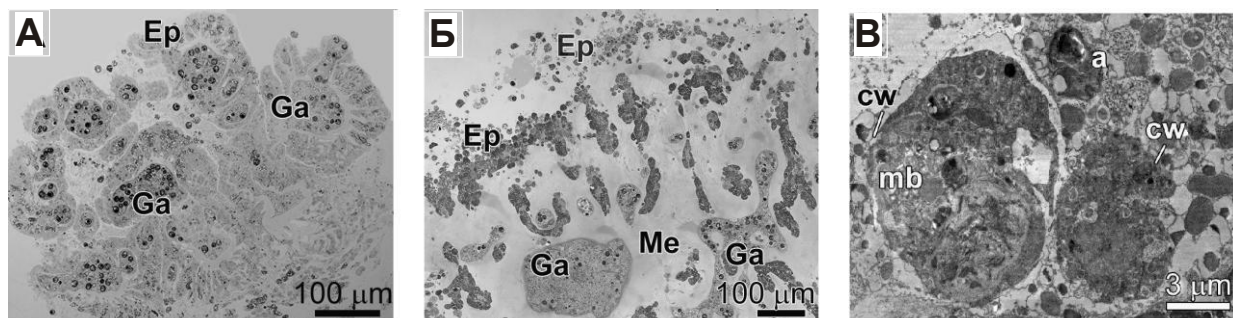
Рисунок 6 – Изменение содержания (А) хлорофилла *a* (мкг/г влажной ткани) и (Б) суммы ДГДГ+СХДГ (% от общих липидов) в колониях *S. heterospiculata* при действии повышенной температуры (33°C) в течение 72 ч. \*\* достоверные отличия (HSD test,  $p < 0.01$ ), (0) – достоверное отличие только от значения в 0-ой точке. (В) Изменение процентного содержания зооксантелл (хлорофилл-положительных клеток) и клеток зооксантелл, подверженных окислительному стрессу (АФК-положительных клеток), в суспензии клеток альционии *S. heterospiculata* при действии повышенной температуры (33°C) в течении 72 ч.

АФК – активные формы кислорода. \*\* достоверное отличие от контроля (Z test,  $p < 0.01$ )

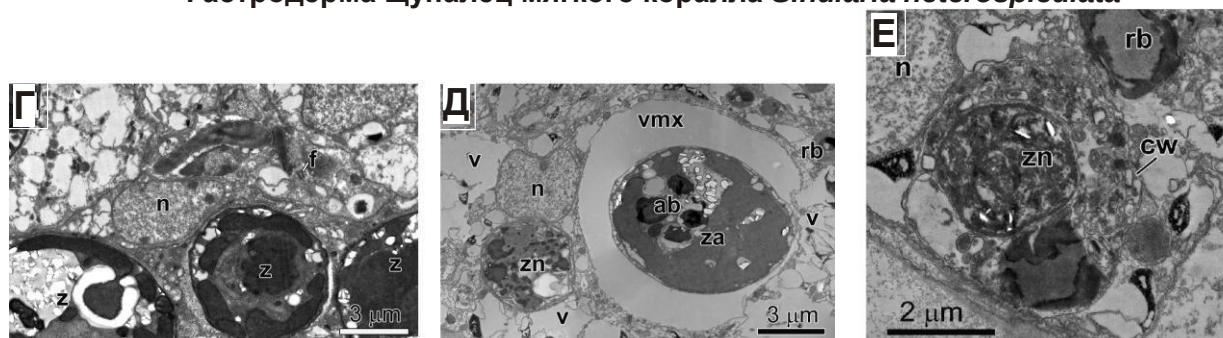
В процессе повторного эксперимента по обесцвечиванию альционии *S. heterospiculata* существенные морфологические и физиологические изменения происходили не только в зооксантеллах, но и в клетках самого организма-хозяина. Ультраструктурные исследования клеток хозяина в гастродерме после воздействия повышенной температуры показали, что большинство их имело вакуолизированную цитоплазму (рис. 7, Г, Д, Е). Цитоплазма содержала крупные вакуоли, фагосомы и остаточные тела (рис. 7, Д, Е). В части клеток были симбиофагосомы, содержащие деградирующие зооксантеллы (рис. 7, Г, Д, Е). Некрозные зооксантеллы, найденные в цитоплазме клеток хозяина, имели

извилистую клеточную стенку. Многие остаточные тела представляли собой фрагменты деградированных хлоропластов. В некоторых из них просматривались участки с параллельными мембранами тилакоидов. По данным электронной микроскопии после 48 ч теплового воздействия в щупальцах полипов происходило разрушение структуры эпидермиса (рис. 7, А, Б). Он состоял из неупорядоченных скоплений гранулярных амебоцитов и утративших признаки дифференцировки эпителиально-мышечных клеток. В фагосомных вакуолях и цитоплазме гранулярных амебоцитов были найдены некротизированные клетки эпидермиса (рис. 7, В).

#### Эпидермис щупалец мягкого коралла *Sinularia heterospiculata*



#### Гастродерма щупалец мягкого коралла *Sinularia heterospiculata*



Нормальные условия (27°C)

После температурного стресса (33°C)

Рисунок 7 – Микроанатомия клеток хозяина в гастродерме и эпидермисе щупалец мягкого коралла *Sinularia heterospiculata* при нормальной температуре (27°C) и после 48 ч теплового воздействия (33°C).

Микрофотографии поперечных срезов, полученные с использованием ТЭМ. А, Б – общий вид тканей щупалец; В – некротизированные клетки эпидермиса в пищеварительной вакуоли и цитоплазме гранулярных амебоцитов; Г – клетка хозяина с симбиосомой; Д – клетка хозяина с симбиофагосомой; Е – некротическая зооксантелла и остаточные тела в цитоплазме клетки хозяина. Условные обозначения: а – гранулярный амебоцит, ab – апоптотическое тело, f – жгутик, n – ядро клетки хозяина, rb – остаточное тело, v – вакуоль, vmx – вакуолярный матрикс, z – зооксантелла, za – апоптотическая зооксантелла, zn – некротическая зооксантелла, cw – клеточная стенка, mb – миелоноподобное тело, Ga – гастродерма, Ep – эпидермис, Me – мезоглея

Функциональная активность клеток организма-хозяина до и после теплового воздействия представлена на рисунке 8. Доля живых клеток организма-хозяина составила около 80% в течение 48-ми часов эксперимента, однако достоверно снизилась до 66% через 72 часа теплового воздействия. Апоптотические (аннексин-позитивные) клетки составили около 18% от всех клеток организма-хозяина в контроле и эксперименте, за исключением достоверного снижения их концентрации до 7.7% (Z test,  $p < 0.05$ ) в точке 48 ч, совпадающего с максимумом уровня АФК-положительных клеток. В начале эксперимента доля мертвых (некротических) клеток составила не более 5% и постепенно увеличивалась до 16% к концу эксперимента.

В условиях теплового стресса заметные морфологические и физиологические изменения клеток организма-хозяина сопровождались существенными изменениями в составе липидов тканей полипов *S. heterospiculata*. Через 48 часов повторного эксперимента было отмечено достоверное уменьшение (HSD test,  $p < 0.05$ ) количества общих липидов в тканях колонии коралла. В первом эксперименте после 36-ти

часов теплового воздействия окФЭ составил около 23% от суммы ФЛ. В повторном эксперименте те же молекулярные виды окФЭ были обнаружены в следовых количествах после 48 ч теплового воздействия и к концу эксперимента составили в сумме  $16.56 \pm 5.62\%$  от общих ФЛ.

Было замечено существенное снижение концентраций двух основных классов полярных липидов (ФХ, ФЭ) после 72 ч эксперимента (HSD test,  $p < 0.05$ ). Концентрация суммы ЦАЭФ и ЛФЭ достоверно увеличилась после 72 ч эксперимента (HSD test,  $p < 0.05$ ). Тепловой стресс не повлиял на концентрацию ФС и ЛФХ. Наблюдались существенные изменения в содержании ФИ (HSD test,  $p < 0.05$ ), его количество начало падать уже на 24-й час эксперимента, к 48-ми часам снизилось до следового уровня и было ниже уровня детектирования к концу эксперимента.

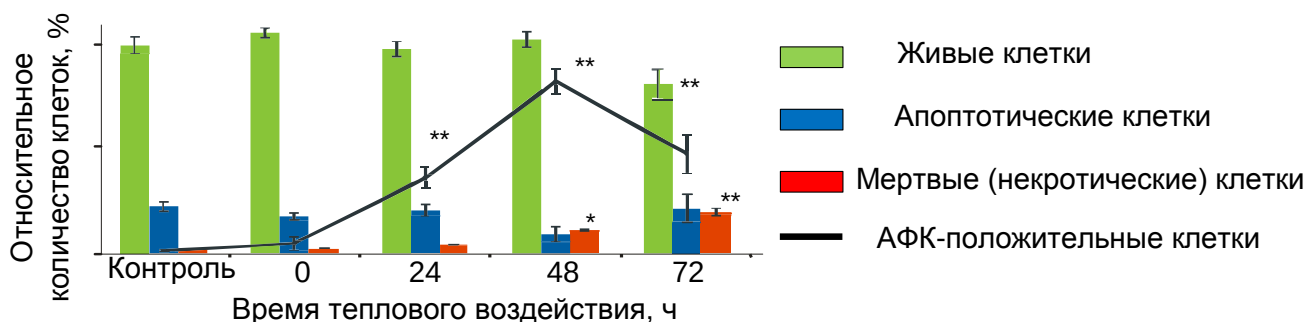


Рисунок 8 – Функциональная активность контрольных (27°C) и подверженных тепловому воздействию (33°C) клеток организма-хозяина альционии *S. heterospiculata*. Уровни значимости отличий от контроля \* (Z test,  $p < 0.05$ ) и \*\* (Z test,  $p < 0.01$ ) АФК-активные формы кислорода

Также были обнаружены молекулярные виды окисленного фосфатидилсерина (окФС) с общей формулой  $C_nH_mNO_{10}P$  и  $C_nH_mNO_{12}P$ . Содержание этих молекулярных видов в ФС на протяжении 48-ми часов было неизменным, однако на 72-й час достоверно возросло с  $3.54 \pm 0.79$  до  $5.78 \pm 1.18\%$  (HSD test,  $p = 0.013$ ).

Таким образом, в повторном эксперименте динамика молекулярных видов полярных липидов показала те же основные тенденции, которые были найдены в первом эксперименте.

В исследовании, где термическому стрессу подвергали культуры клеток актинии *Anemonia viridis*, было показано, что сами клетки организма-хозяина, не содержащие зооксантелл, устойчивы при повышении температуры до 37°C. Образование симбиосомы – это фагоцитоз, в котором, благодаря механизмам подавления врожденного иммунитета организма-хозяина коралла, нормальное поглощение чужеродного материала приостанавливается на неопределенный срок. При неблагоприятных условиях в зооксантеллах происходит фотоокислительный стресс, в результате которого вырабатываются АФК. Если стресс имеет продолжительный характер, то антиоксидантная система симбионтов перестает справляться, и АФК накапливаются (рис. 6), что может быть причиной обнаружения организмом-хозяином чужеродных клеток симбионтов. Известно, что клетки симбиотических кишечнополостных обладают фагоцитарными способностями, экспрессируют ферменты, подобные тем, что используются иммунными клетками млекопитающих для фагоцитоза и деградации патогенов. По данным микроскопии визуально отмечалось увеличение числа симбиофагосом, содержащие деградирующие зооксантеллы (рис. 7, Д, Е). Можно предположить, что запускается врожденный иммунный ответ организма-хозяина и зооксантеллы уничтожаются в процессе аутофагии.

При тепловом стрессе организм-хозяин кишечнополостных пытается избавиться от условно патогенных динофлагеллят, и мы наблюдаем аналог воспалительного процесса. В нашем случае этому соответствует появление окФЭ к концу как первого, так и повторного экспериментов (рис. 4). Окисленные фосфолипиды могут нарушать структуру клеточных мембран, поскольку окисленные ацильные цепи обращены в водную среду, что делает их физически доступными для участия в сигнальных событиях, включая и распознавание макрофагами для утилизации поврежденных клеток. Перекисное окисление фосфолипидов происходит при многих состояниях, связанных с воспалением, окисленные липиды обладают как про-воспалительным, так и противовоспалительным действиями. Ферментативно



окисленные ФЛ играют важную роль в раннем врожденном иммунитете, например, в защите от инфекций. В тканях организма-хозяина *S. heterospiculata* появление окФЭ на 48-й час эксперимента совпало с увеличением количества фагосом и симбиофагосом в гастродерме щупалец коралла (рис. 7, Д, Е) и гранулярных амебоцитов в эпидермисе, содержащих мертвые клетки эпителия (рис. 7, В). В конце повторного эксперимента резкое снижение уровня АФК (рис. 8), необходимого для окисления ФЛ, может быть результатом использования АФК для синтеза окФЭ, содержание которого достигло 16% от ФЛ, и синтеза окФС, уровень которого также увеличился.

Коралловые рифы – это уникальная морская экосистема, а ее основой является удивительный метаорганизм коралла. Парадоксально, но симбиоз с динофлагеллятами для коралла в нормальных условиях является жизненно необходимым, и в то же время, при наступлении неблагоприятных условий окружающей среды, становится губительным, поскольку у коралла включается врожденный иммунный ответ, который при уничтожении патогенных зооксантелл способствует гибели всего организма. Уже на 48-й час теплового воздействия происходит расслоение эпителиальной ткани альционарий (рис. 7 А, Б) и появляются клетки с некротическими признаками (рис. 7, В). Таким образом продолжительный температурный стресс (48-72 ч, 33°C) является губительным для организма коралла, а происходящие физиологические и биохимические нарушения оказываются необратимыми.

## ВЫВОДЫ

1. Исследованы липидомы коралловых полипов из отрядов Alcyonacea (*Sinularia seaesensis* и *S. heterospiculata*), Zoantharia (*Palythoa tuberculosa*) и Scleractinia (*Acropora cerealis*), а также их симбионтов; структурно охарактеризован 381 молекулярный вид липидов и установлено их содержание.
2. Показано, что липидом представителя каждого отряда имеет характерные черты. В липидоме *P. tuberculosa* содержатся триацилглицеролы с жирной кислотой 22:5, фосфатидилэтаноламины с неметиленразделёнными C<sub>24</sub> жирными кислотами и N-метил-церамидаминоэтилфосфонаты; в липидоме *A. cerealis* – триацилглицеролы с жирными кислотами 18:3 и 22:6 и гидроксильированные церамидаминоэтилфосфонаты; в липидах *S. seaesensis* и *S. heterospiculata* – фосфатидилсерины и фосфатидилинозитолы с C<sub>24</sub> ПНЖК.
3. Установлено, что профиль молекулярных видов восков, зависит от наличия зооксантелл и таксономического положения этих животных. Кораллы без симбионтов содержат больше восков с ацильными и алкильными группами бактериального происхождения. В липидах рифообразующих кораллов (подкласс Hexacorallia) больше мононенасыщенных восков, чем в мягких кораллах (подкласс Octocorallia).
4. Показано, что в зооксантеллах, в отличие от профиля бетаиновых липидов, профиль гликолипидов не зависит от таксономического положения организма-хозяина и определяет температурную устойчивость симбионтов. Термоустойчивый вид зооксантелл *Duruzdinium trenchii* содержит более насыщенные сульфохиновозилдиацилглицериды, менее насыщенные галактолипиды и имеют более высокое отношение дигалактозилдиацилглицеридов к моногалактозилдиацилглицеридам, чем термочувствительные виды *Cladocopium* C1/C3.
5. Установлено, что в зооксантеллах существуют два разных направления биосинтеза и использования триацилглицеридов (ТГ). Одна часть ТГ может синтезироваться из гликолипидов в хлоропластах, другая – *de novo* в эндоплазматическом ретикулуме и формировать общий пул ТГ симбиотических организмов *P. tuberculosa* и *S. heterospiculata*.
6. Показано, что на ранней стадии обесцвечивания *S. heterospiculata* потеря зооксантелл уменьшает уровень хлорофилла и гликолипидов, сопровождается падением уровня запасных липидов триацилглицеридов и моноалкилдиацилглицеридов, не влияет на общий уровень фосфолипидов и увеличивает синтез восков. Повреждения хлоропластов зооксантелл нарушают естественную суточную цикличность уровня некоторых гликолипидов и баланс между биосинтезом «прокариотических» и «эукариотических» видов галактолипида моногалактозилдиацилглицерида.

7. Показано, что при глубоком обесцвечивании *S. heterospiculata* падает содержание восков и фосфолипидов, происходят существенные изменения в профиле молекулярных видов структурных липидов (холин -, этаноламин - и инозитглицерофосфолипидов), появляются лизо- и окисленные формы фосфатидилэтаноламина. Клетки поврежденных зооксантелл уничтожаются организмом-хозяином посредством аутофагии, а также увеличивается количество гранулярных амебоцитов в эпидермисе, что в конечном итоге приводит к гибели коралла.

### Публикации по теме диссертации

#### Статьи в рецензируемых журналах

1. Bosh T.V., Long P.Q. A Comparison of the composition of wax ester molecular species of different coral groups (subclasses Hexacorallia and Octocorallia) // Russian Journal of Marine Biology 2017. V. 43 – P. 471–478.
2. Sikorskaya T.V., Imbs A.B. Study of total lipidome of the *Sinularia siaesensis* soft coral // Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2018. V. 44 – P. 712–723.
3. Sikorskaya T.V. Investigation of the total lipidome from a zoantharia *Palythoa* sp. // Chemistry of Natural Compounds 2020. V. 56 – P. 44–49.
4. Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Imbs A.B. Effect of experimental thermal stress on lipidomes of the soft coral *Sinularia* sp. and its symbiotic dinoflagellates // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 2020. V. 524 – 151295.
5. Sikorskaya T.V., Imbs A.B. The coral lipidomes and their changes during coral bleaching // Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2020. <https://doi.org/10.31857/S0132342320050231>

#### Материалы конференций

1. Bosh T.V. Contribution of symbiotic dinoflagellate (zooxanthellae) in lipid and fatty acid compositions of the soft coral *Capnella* sp. // Scientific and technological developments of research and monitoring of marine biological resources: Book of Abstracts. – Vladivostok: Far Eastern Federal University, 2017. – P. 17.
2. Сикорская Т.В., Веланский П.В., Имбс А.Б. Сочетание различных инструментальных методов для исследования липидома альционии *Sinularia siaesensis* // «Липиды XXI века. Первая четверть». Конференция к 100-летию со дня рождения Льва Давидовича Бергельсона – основателя науки о липидах в России. – Москва: ИБХ РАН, 2018. – С. 63.
3. Имбс А.Б., Веланский П.В., Сикорская Т.В., Ермоленко Е.В., Григорчук В.П., Харламенко В.И., Данг Л.Т.Ф., Фам Л.К. Липидомика морских беспозвоночных // «Липиды XXI века. Первая четверть». Конференция к 100-летию со дня рождения Льва Давидовича Бергельсона – основателя науки о липидах в России. – Москва: ИБХ РАН, 2018. – С. 30.
4. Sikorskaya T.V., Imbs A.B., Ermolenko E.V. Lipidome changing of the soft coral *Sinularia* sp. under experimental thermal stress // 3rd international conference SmartBio. – Kaunas: Vytautas Magnus University, 2019. – P. 172.
5. Sikorskaya T.V., Ermolenko E.V., Imbs A.B. Lipidomic approach to the study of the zooxanthellae and polyp host contribution in total lipid composition of the soft coral *Sinularia siaesensis* // Marine Biodiversity for a Healthy Ocean – Biodiversity, Functional Groups and Ocean Health : Proceedings of the Russia-China Bilateral Workshop – Vladivostok : Publishing House of the Far Eastern Federal University, 2019 – P. 125–129.
6. Сикорская Т.В., Ермоленко Е.В., Имбс А.Б. Влияние температурного стресса на липидом мягкого коралла *Sinularia* sp. (Anthozoa: Alcyonacea) // Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Годичная научная конференция – Владивосток: Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, 2019. – С. 114–124.