



УДК 577.115.3:577.125.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛНОГО ЛИПИДОМА МЯГКОГО КОРАЛЛА *SINULARIA SIAESENSIS*<sup>1</sup>

© 2019 г. Т. В. Сикорская\*., А. Б. Имбс\*

\*Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН,  
Россия, 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Поступила в редакцию 30.03.2018 г.

После доработки 17.04.2018 г.

Принята к печати 28.04.2018 г.

Методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии проведено исследование полного липида тропического мягкого коралла *Sinularia siaeensis* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia: Alcionasea), содержащего внутриклеточные симбиотические микроводоросли (зооксантеллы). Определена структура и содержание 144 молекулярных видов основных классов ацильных липидов этой альционарии, к которым относятся воски (WE), триглицериды (TG), моноалкилдиацилглицериды (MADAG), этаноламин-, холин-, серин- и инозитглицерофосфолипиды (PE, PC, PS и PI), церамидаминоэтилфосфонат (CAEP), сульфоинозиддиацилглицерид (SQDG), моно- и дигалактозилдиацилглицериды (MGDG и DGDG). Главными компонентами липида *S. siaeensis* были: воски 16:0/16:0, 16:0/18:0 и 18:0/16:0; TG 16:0/16:0/16:0 и 16:2/16:0/16:0; MADAG 18:0e/16:0/16:0, 16:0e/16:0/18:0 и 16:0e/16:0/16:0; PS 18:0e/24:5, лизо-PC 18:0e, PE 18:1e/20:4, PC 18:0e/20:4, CAEP 18:2b/16:0, SQDG 14:0/16:0 и PI 18:0/24:5. Доминирование насыщенных восков в запасных липидах является видоспецифическим признаком тропических альционарий. Воски синтезируются в организме-хозяине, а зооксантеллы могут увеличивать долю насыщенных восков за счет передачи насыщенных жирных кислот (FA). Остатки полиненасыщенных FA (PUFA) находятся в молекулах TG и MADAG преимущественно в положениях *sn*-1 и *sn*-2 соответственно. Обнаружение MADAG с остатками маркерных FA зооксантелл (18:0e/18:3/16:0, 18:0e/18:4/16:0 и 16:0e/18:3/16:0) подтверждает передачу PUFA от симбионтов к хозяину. Тетракозаполиеновые FA (TPA), хемотаксономические маркеры октокораллов, сосредоточены в молекулярных видах алкилдиацилглицерофосфосеринов (серинглицерофосфолипиды, PS) и алкилдиацилглицерофосфоинозитов (инозитглицерофосфолипиды, PI). Большинство молекулярных видов алкилдиацилглицерофосфоэтанолламинов (этанолминглицерофосфолипидов, PE), PC и PS находятся в алкилдиацильной форме, в то время как для молекул PI характерна диацильная форма. Заметная доля MGDG, DGDG и SQDG указывает на важность зооксантелл в формировании липидного профиля симбиотических мягких кораллов. Определение профиля молекулярных видов липидов необходимо для развития липидного подхода в изучении биохимии и экологии кораллов и других книдарий.

**Ключевые слова:** липидомика, молекулярные виды липидов, липидные маркеры, мягкие кораллы, симбионты, тандемная масс-спектрометрия

DOI: 10.1134/S0132342319010160

### ВВЕДЕНИЕ

Кораллы (тип Cnidaria, класс Anthozoa) распространены от полярных до тропических областей Мирового океана и встречаются на глубинах

до 6 км. Одной из самых важных морских тропических экосистем является экосистема коралловых рифов, которые служат домом для 25% всех тропических видов животных [1]. Подавляющее большинство видов кораллов – колониальные организмы. Колонии шестилучевых рифообразующих, или твердых, кораллов (подкласс Hexacorallia) имеют твердый известковый экзоскелет. Такого экзоскелета нет у колоний восьмилучевых мягких кораллов (подкласс Octocorallia), в которых известковые включения (спикулы) распределены по всему объему колонии. Alcionasea – наиболее многочисленный отряд восьмилучевых кораллов, в котором различают до 40 родов и 1200 видов.

Более 80% всех видов альционарий обитает на мелководье тропических морей Индо-Пацифики. В отличие от бореальных и глубоководных видов, практически все тропические альционарии,

<sup>1</sup> Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на конференции “Липиды XXI века. Первая четверть”, 22–23 октября 2018 г., г. Москва.

Сокращения: WE – эфиры восков; AA – алифатические спирты, HPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография, DGDG – дигалактозилдиацилглицериды, FA – жирные кислоты, CAEP – церамидаминоэтилфосфонаты, MADAG – моноалкилдиацилглицериды, MGDG – моногалактозилдиацилглицериды, MS/MS – тандемная масс-спектрометрия, PUFA – полиненасыщенные жирные кислоты, SQDG – сульфоинозиддиацилглицериды, TG – триглицериды, TPA – тетракозаполиеновые кислоты, PI – инозитглицерофосфолипиды, PS – серинглицерофосфолипиды, PC – холинглицерофосфолипиды, PE – этаноламинглицерофосфолипиды, APC1 – химическая ионизация при атмосферном давлении, ESI – ионизация распылением в электрическом поле.

# Автор для связи: (тел.: +7 (423) 231-09-37; эл. почта: miss.tatyanna@yandex.ru).

обитающие на глубинах до 40 метров, являются симбиотическими животными, ткани которых содержат внутриклеточные микроводоросли или зооксантеллы (динофлагелляты рода *Symbiodinium*) [2]. В процессе фотосинтеза зооксантеллы вырабатывают питательные вещества, обеспечивая до 90% энергии, необходимой организму-хозяину [3, 4]. Полная потеря зооксантелл колониями кораллов при температуре воды более 32°C называется “обесцвечиванием” (bleaching) кораллов и приводит к гибели организма-хозяина [5].

Альционарии богаты липидами, которые составляют до 23% от сухого веса мягкой тканью кораллов [6]. Содержание общих липидов заметно меняется в зависимости от стадии полового цикла коралла, а также от сезона, глубины обитания, освещенности, температуры воды и других факторов окружающей среды [7]. В экстракте общих липидов альционарий присутствуют различные ацильные липиды, которые являются производными жирных кислот (FA), а также углеводороды и стеринны [8–10]. Липиды выполняют важные функции в организме коралла [11]; нейтральные липиды служат для них основным “запасным депо” и источником энергии, а полярные липиды, в первую очередь фосфолипиды, выполняют структурную функцию и составляют основу клеточных мембран.

Нейтральные липиды альционарий, среди которых найдены воски (сложные эфиры FA и алифатических спиртов (AA)), триацилглицериды (TG), моноалкилдиацилглицериды (MADAG) и эфиры стериннов (SE), составляют более половины общих липидов этих животных [7, 8, 10]. В общих липидах тропических альционарий содержится от 13 до 50% полярных липидов [10], в которых обнаружены этаноламин-, холин-, серин- и инозитглицерофосфолипиды (PE, PC, PS и PI), церамидаминоэтилфосфонат (CAEP), дифосфатидилглицерин (DPG), фосфатидилглицерин (PG), фосфатидная кислота (PA), цереброзиды (CE), а также лизоформы PE, PS и PC [9, 12]. Основными классами полярных липидов являются PE и PC. Глицерофосфолипиды альционарий, кроме 1,2-диацилпроизводных, содержат заметную долю 1-*O*-алкил-2-ацил- и 1-*O*-алкенил-2-ацил-глицерофосфолипидов (плазмалогенов) [12–14].

Маркером тканей полипов (организма-хозяина) в альционариях можно считать MADAG. Этот класс липидов характерен для книдарий [15] и отсутствует в липидах зооксантелл [16]. В тканях полипов альционарий доля MADAG может достигать 35% от суммы липидов [16]. Предполагается, что присутствие MADAG и CAEP в мембранах клеток книдарий повышает их устойчивость к действию высокоактивных липолитических ферментов [15, 17, 18].

В липидах зооксантелл обнаружены несколько классов гликолипидов [19], а именно, сульфохинозиддиацилглицерол (SQDG), моно- и дигалактозилдиацилглицериды (MGDG и DGDG), которые характерны для биомембран фотосинтетического аппарата растений. Галактолипиды, а также некоторые полиненасыщенные FA (PUFA), которые входят в состав ацильных групп этих липидов, рассматриваются, как главные маркеры зооксантелл [20–22]. Отсутствие галактолипидов в полярных липидах фракции тканей полипов из мягкого коралла *Clavularia viridis* послужило доказательством высокой чистоты этой фракции [23].

Измерение уровня общих липидов, содержания основных классов липидов и состава FA является одним 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 симбионтами и организмом-хозяином [24–29]. За время скрининговых исследований липидов кораллов [30] накоплена огромная информация о их составе и составе FA [7, 10, 31]. Однако следует учесть, что общие липиды, равно как и отдельные классы липидов, представляют собой сложную смесь молекулярных видов липидов, насчитывающую несколько сотен компонентов. FA являются набором “обломков”, которые образуются при гидролизе молекулярных видов липидов. Мы полагаем, что для развития новых направлений в области биохимии и экологии кораллов необходимо иметь данные о составе молекулярных видов липидов этих организмов.

По аналогии с геномом, протеомом и метаболизмом, общий спектр липидных молекул биологической системы определяется как липидом, а картирование спектра липидов и определение их биологической роли называется липидомикой [32]. На фоне множества медико-фармакологических исследований липидома человека, получены первые результаты в области липидомики морских организмов, например, макроводорослей [33], кальмаров [34] и актиний [35]. Сведения о липидомике альционарий ограничены описанием состава молекулярных видов полярных липидов трех тропических и одного холодноводного видов [13, 14, 36].

В настоящей работе впервые проведен анализ полного липидома тропического симбиотического мягкого коралла *Sinularia siaesensis* с использованием комплекса методов, включая газовую хромато-масс-спектрометрию, HPLC и tandemную масс-спектрометрию высокого разрешения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Классический метод экстракции [37] позволил получить общие липиды с выходом 4.85% от массы сухой ткани альционии *S. siaesensis*. Общие липиды содержали, %: воски 18.25, TG 5.83, MADAG 7.79, PE 2.14, PC 2.53, PS 1.50, PI 0.32, CAEP 0.71, MGDG 0.29, DGDG 0.18 и SQDG 0.82. Общий профиль липидов, в котором доминируют неполярные липиды (воски, TG и MADAG), а среди фосфолипидов преобладают PE и PC, характерен для тропических видов альционий [10]. Кроме 10 основных классов ацильных липидов, в экстракте присутствовали другие липофильные вещества, в частности, углеводороды, стеринны, свободные FA и пигменты. Ранее было показано, что в составе углеводородов тропической синулярии преобладает 2-изопропенил-4a,8-диметил-1,2,3,4,4a,5,6,7-октагидронафталин [9], а среди стериннов – 24-метиленхолестерол и кампестерол [6]. Свободные FA не следует применять для характеристики общих липидов, поскольку составы свободных FA [38] и FA ацильных липидов [10] мягких кораллов резко различаются. Общие липиды *S. siaesensis* имели высокое содержание лизофосфатидилхолина (1.35%), что согласуется с данными работы [12]. Неспецифический гидролиз липидов при экстракции не может быть причиной высокого уровня лизо-PC в тканях *S. siaesensis*, поскольку лизо-формы других классов фосфолипидов практически отсутствовали.

Ацильные липиды, прежде всего WE и TG, рассматриваются как энергетический резерв кораллов, поэтому количество общих липидов широко используется в качестве индикатора расхода и накопления энергии колониями коралла [24, 38]. Ацильные липиды составили менее половины от экстракта общих липидов *S. siaesensis* (41.89%), поэтому, по нашему мнению, содержание индивидуальных классов липидов должно давать более точную картину энергетического баланса альционий, чем количество общих липидов (суммарного липидного экстракта).

*Неполярный липидом*

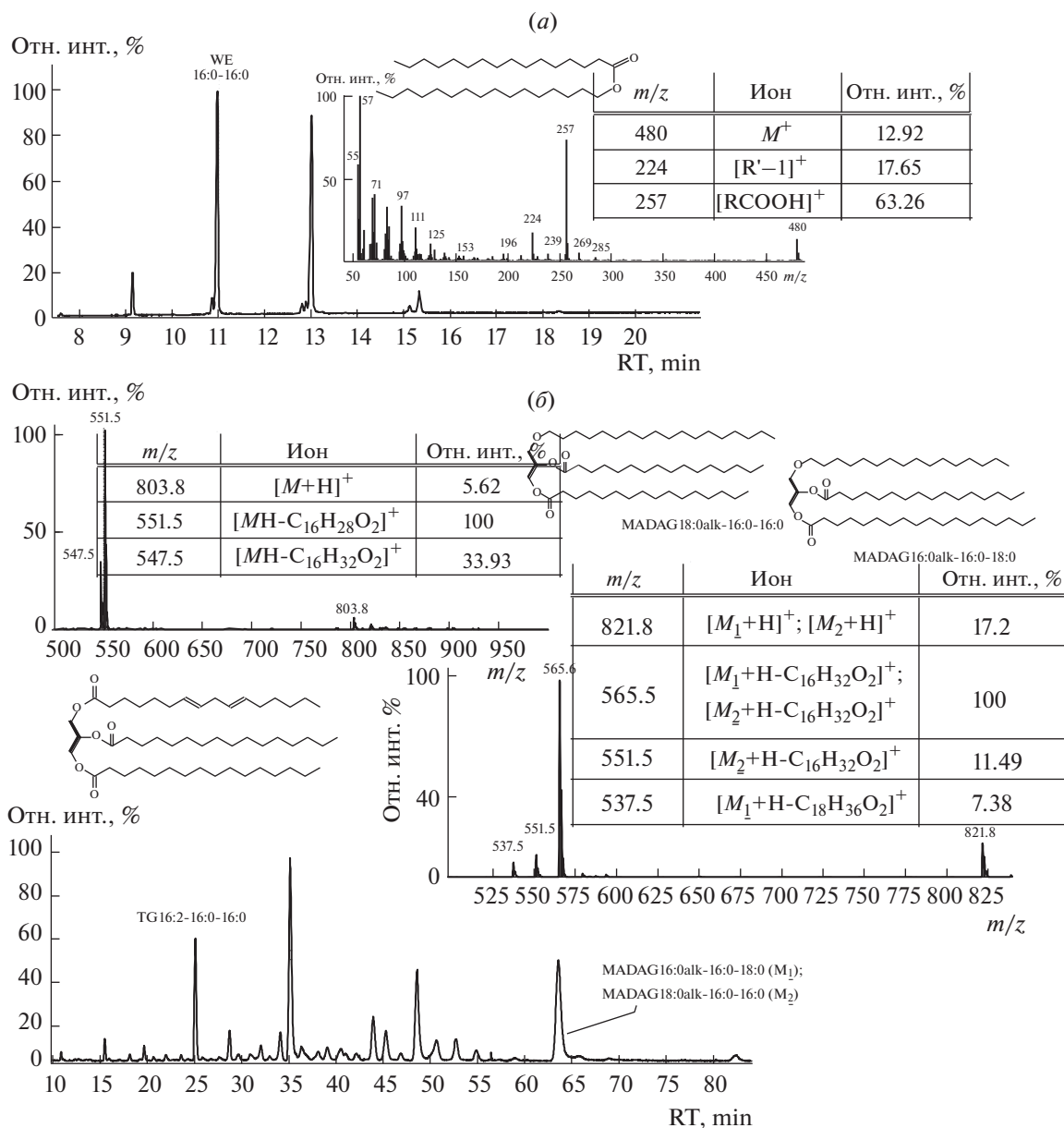
В неполярной части липидома альционии *S. siaesensis* присутствовали воски, TG и MGDG; эфиров стериннов не обнаружили. Анализ фракции восков проводили газовой хромато-масс-спектрометрией. Сумму TG и MADAG разделяли сверхкритической флюидной хроматографией (SFC) и анализировали методом масс-спектрометрии низкого разрешения. Две последовательно соединенные хроматографические колонки позволили достичь разделения практически всех молекулярных видов TG и MADAG за 85 мин анализа.

При ионизации методом электронного удара в масс-спектрах восков (общая формула R'OCOR, где R' и R – алкильные группы AA и FA, соответственно) присутствовали пики молекулярных ионов  $M^+$ . Интенсивность сигналов молекулярных ионов (относительно базового иона  $m/z$  57, 100%) была значительно выше в спектрах насыщенных восков (10–13%), чем в спектрах ненасыщенных восков (1–2%) (рис. 1a). Характеристическими ионами для насыщенных восков были  $[RCOOH]^+$  (50–70%) и  $[R'-H]^+$  (7–14%), а для ненасыщенных восков –  $[RCO]^+$  (30–40%),  $[RCOOH]^+$  (6–10%) и  $[R'-H]^+$  (3–10%). Масс-спектрометрические данные интерпретировали согласно работе [39]. Характеристические ионы позволили обнаружить присутствие изомеров, например, 16:1/16:0 и 16:0/16:1, 18:0/15:0 и 17:0/16:0, которые не разделялись в условиях хроматографического анализа.

В режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) молекулы TG 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 [40, 41], что приводит к появлению в масс-спектре наиболее интенсивных сигналов соответствующих фрагмент-ионов (рис. 1б). Спектр также содержит менее интенсивный сигнал иона  $[M-R'COOH]^+$ , образующийся в результате отрыва остатка FA в положении *sn*-2. В масс-спектре молекулярного вида TG с тремя одинаковыми остатками FA присутствует сигнал только одного иона  $[M-RCOOH]^+$ . Таким образом, метод позволяет определить брутто-формулу (количество атомов углерода и число двойных связей) всех трех ацильных групп в молекуле TG, а также заместитель в положении *sn*-2 остатка глицерина.

Масс-спектр каждого молекулярного вида MADAG также содержал сигнал иона  $[M + H]^+$ . Согласно работам [34, 42], в масс-спектре MADAG с тремя различными алифатическими цепями наиболее интенсивный сигнал дает ион  $[M-R'COO]^+$ , образованный при отрыве остатка FA в положении *sn*-2 (100%), отрыв остатка FA в положении *sn*-3 дает менее интенсивный сигнал иона  $[M-R''COO]^+$  (>50%), а наименьшую интенсивность имеет сигнал фрагмента  $[M-OR''']^+$  при отрыве остатка спирта (>10%) (рис. 1б). Использование этих закономерностей позволило установить брутто-формулы и положение всех заместителей в молекулах MADAG.

Впервые определен неполярный липидом мягкого коралла (табл. 1–3). Главными компонентами неполярного липидома альционии *S. siaesensis* были (в процентах от общих липидов): цетилпальмитат (16:0/16:0), цетилстеарат (16:0/18:0) и



**Рис. 1.** Хроматомасс-спектрометрический анализ молекулярных видов неполярного липида мягкого коралла *S. si-aesensis*: (а) хроматограмма восков (ГЖХ, пламенно-ионизационный детектор) и масс-спектр (EI) цетилпальмитата (16:0/16:0); (б) хроматограмма TG и MADAG (сверхкритическая флюидная хроматография, светорассеивающий детектор), масс-спектры (APCI) триглицерида 16:2/16:0/16:0 и смеси изомерных MADAG 16:0e/16:0/18:0 и 18:0e/16:0/16:0.

стеарилпальмитат (18:0/16:0) (в сумме 14.07%, табл. 1); гексадекадиеноилдипальмитоилглицерин (16:0/16:0/16:0) и трипальмитин (16:0/16:0/16:0) (в сумме 3.51%, табл. 2); 1-*O*-октадецил-2,3-дипальмитоил-*sn*-глицерин (18:0e/16:0/16:0), 1-*O*-гексадецил-2-пальмитоил-3-стеароил-*sn*-глицерин (16:0e/16:0/18:0) и 1-*O*-гексадецил-2,3-дипальмитоил-*sn*-глицерин (16:0e/16:0/16:0) (в сумме 3.87%, табл. 3).

Ранее в мягком коралле *Sinularia microclavate* был обнаружен стеарилпальмитат [43], насыщен-

ные WE 16:0/16:0 и 16:0/18:0 были указаны как главные компоненты восков в гидрокораллах рода *Millepora* [44] и твердых кораллах [15, 45, 46]. В исследованной нами альционии доминировали насыщенные молекулярные виды, а ненасыщенные составили не более 6.8% от суммы восков; аналогичное распределение ранее было найдено в двух других видах симбиотических альционий [47]. В отличие от восков альционий, воски симбиотических твердых кораллов содержали до 47% ненасыщенных молекулярных

видов [47]. Чен и др. [48, 49] исследовали динамику состава липидов во внутриклеточных липидных тельцах (lipid bodies) симбиотического твердого коралла *Euphyllia glabrescens*. Они обнаружили, что воски находятся в тканях организма-хозяина и отсутствуют в зооксантеллах, при этом ненасыщенные воски (пальмитилолеат) сосредоточены в липидных тельцах. Можно предположить, что в альционариях, также как в твердых кораллах, этот основной класс запасных липидов синтезируется в организме-хозяине [49, 50], а доминирование насыщенных молекулярных видов восков является видоспецифическим признаком тропических альционарий. Воски симбиотических видов кораллов не содержат маркерных PUFA зооксантелл, таких как 18:3n-6, 18:4n-3 и 18:5n-3 (табл. 1) [47, 49]. Мы полагаем, что зооксантеллы не синтезируют воски самостоятельно, но могут увеличивать долю насыщенных молекулярных видов восков за счет передачи организму-хозяину насыщенных FA и/или AA [50].

Поскольку ранее было показано, что большую часть ацильных групп TG и MADAG из тропической альционарии *Simularia* sp. составляют остатки насыщенных FA 16:0 и 18:0 [9], подавляющее доминирование насыщенных молекулярных видов среди TG и MADAG из *S. siaesensis* не было неожиданностью (табл. 2, 3). Однако наибольший интерес вызвали ненасыщенные молекулярные виды этих липидных классов. Остатки PUFA находились в молекулах TG и MADAG преимущественно в положениях *sn*-1 и *sn*-2, соответственно. Это может быть результатом разницы в путях биосинтеза ацильных (TG) и этерных (MADAG) глицеролипидов. Из фосфатидной кислоты образуется 1,2-диацилглицерид, ацилирование которого по положению *sn*-3 дает молекулу TG [51]. MADAG образуется путем последовательного введения двух остатков FA в положения *sn*-2 и *sn*-3 молекулы 1-*O*-алкилглицерина [52].

Метод маркерных FA неоднократно использовался для характеристики липидов симбионтов, организма-хозяина и передачи FA между членами симбиотического сообщества коралла [53]. Такие PUFA, как 20:4, 22:5 и 22:6, характерны для тканей животных, и присутствие молекулярных видов TG и MADAG, содержащих остатки этих PUFA, закономерно для книдарий (табл. 3). Октокораллы синтезируют редкие тетракозаполиеновые кислоты (TPA, 24:5n-6 и 24:6n-3) [10, 54], поэтому MADAG 18:0e/24:5/16:0 (табл. 3) однозначно является маркером тканей организма-хозяина. Маркерными PUFA зооксантелл являются 16:4, 18:3 и 18:4 [11, 55], следовательно, TG с остатками этих PUFA (табл. 3) могут синтезировать симбионты кораллов. В то же время известно, что зооксантеллы не синтезируют этерные липиды, поэтому обнаружение в липидах мягкого коралла ряда молекулярных видов MADAG с

**Таблица 1.** Состав восков мягкого коралла *S. siaesensis*

Воски	C*	C <sub>отн</sub> **	[M] <sup>+</sup>
16:0/14:0; 14:0/16:0***	1.019	5.58	452
16:1/16:0	0.068	0.37	478
16:1/16:0; 16:0/16:1	0.383	2.10	478
16:0/16:0	7.097	38.89	480
18:0/15:0; 17:0/16:0	0.036	0.20	494
16:0/18:1	0.311	1.70	506
18:0/16:1	0.275	1.51	506
16:0/18:0; 18:0/16:0	6.974	38.21	508
19:0/16:0; 17:0/18:0	0.128	0.70	522
18:0/18:1	0.274	1.50	534
18:0/18:0	0.888	4.88	534
16:0/22:0; 18:0/20:0; 20:0/18:0	0.111	0.61	564
Другие	0.686	3.76	
Сумма	18.251	100.00	

\* Содержание в общем экстракте, %.

\*\* Относительное содержание внутри класса, %.

\*\*\* Алкил/ацил.

**Таблица 2.** Состав триацилглицеридов мягкого коралла *S. siaesensis*\*

Триацилглицериды	C	C <sub>отн</sub>	[M + H] <sup>+</sup>
16:2/16:2/16:0**	0.059	1.01	799.8
16:4/16:0/16:0	0.020	0.34	799.8
18:4/16:0/16:0	0.049	0.84	827.8
16:2/16:0/16:0	1.046	17.94	803.8
16:0/18:3/16:0	0.026	0.45	829.8
20:4/16:0/16:0	0.056	0.96	855.7
16:1/16:0/16:0; 22:6/16:0/16:0; 20:4/16:0/16:0	0.313	5.37	805.8; 879.78; 855.7
16:0e/16:3/16:0; 20:4/16:0/16:0	0.094	1.61	787.8; 855.7
18:2/16:0/16:0	0.129	2.21	831.8
16:0/16:0/16:0	2.464	42.26	807.8
18:1/16:0/16:0	0.313	5.37	833.8
16:0/16:0/18:0	0.502	8.61	835.8
Другие	0.760	13.03	
Сумма	5.831	100.00	

\* См. примечание к табл. 1.

\*\* Ацильные остатки.

остатками маркеров зооксантелл (18:0e/18:3/16:0, 18:0e/18:4/16:0 и 16:0e/18:3/16:0) (табл. 2) следует рассматривать, как хорошее подтверждение существования передачи PUFA от симбионтов к хозя-

**Таблица 3.** Состав моноалкилдиацилглицеридов мягкого коралла *S. siaesensis*\*

MADAG	C	C <sub>отн</sub>	[M + H] <sup>+</sup>
18:0e/16:0/16:0; 16:0e/16:0/18:0**	0.047	0.55	821.8
18:0e/20:4/18:0	0.040	0.47	897.8
18:0e/16:2/16:0	0.058	0.68	813.8
16:0e/16:2/16:0	0.361	4.22	789.7
18:0e/18:0/16:0; 16:0e/18:3/16:0	0.140	1.64	849.8; 815.8
16:0e/16:1/16:0	0.192	2.25	791.8
16:0e/20:4/16:0	0.216	2.53	841.8
18:0e/18:4/16:0	0.086	1.01	841.8
16:0e/18:2/16:0	0.124	1.45	817.8
18:0e/16:2/16:0	0.645	7.54	817.8
18:0e/18:3/16:0	0.117	1.37	843.8
16:0e/16:0/16:0	1.653	19.33	793.8
18:0e/16:1/16:0	0.554	6.48	819.8
18:0e/20:4/16:0	0.403	4.71	869.8
18:0e/18:2/16:0	0.195	2.28	845.8
18:0e/18:2/16:0	0.026	0.30	845.7
18:0e/16:2/18:0	0.012	0.14	817.8
18:0e/22:5/16:0; 18:0/18:0/16:0	0.075	0.88	895.8; 863.8
18:0e/16:0/16:0; 16:0e/16:0/18:0	2.420	28.30	821.8; 821.8
18:0e/18:1/16:0	0.174	2.04	847.8
18:0e/20:4/18:0	0.058	0.68	897.8
18:0e/24:5/16:0	0.024	0.28	923.8
18:0e/18:2/18:0	0.016	0.19	873.8
18:0e/16:0/18:0	0.154	1.80	849.8
Другие	0.760	8.89	
Сумма	7.789	100.00	

\* См. примечание к табл. 1.

\*\* Алкил (*sn*-1)/ацил(*sn*-2)/ацил(*sn*-3).

ину. Предполагается, что зооксантеллы мягких кораллов также участвуют в синтезе кислоты 16:2n-7 [55], остатки которой входят в состав нескольких основных молекулярных видов неполярного липида мягкого коралла *S. siaesensis* (табл. 2, 3).

#### Полярный липидом

В полярной части липида альционарии *S. siaesensis* присутствовали фосфолипид CAEP,

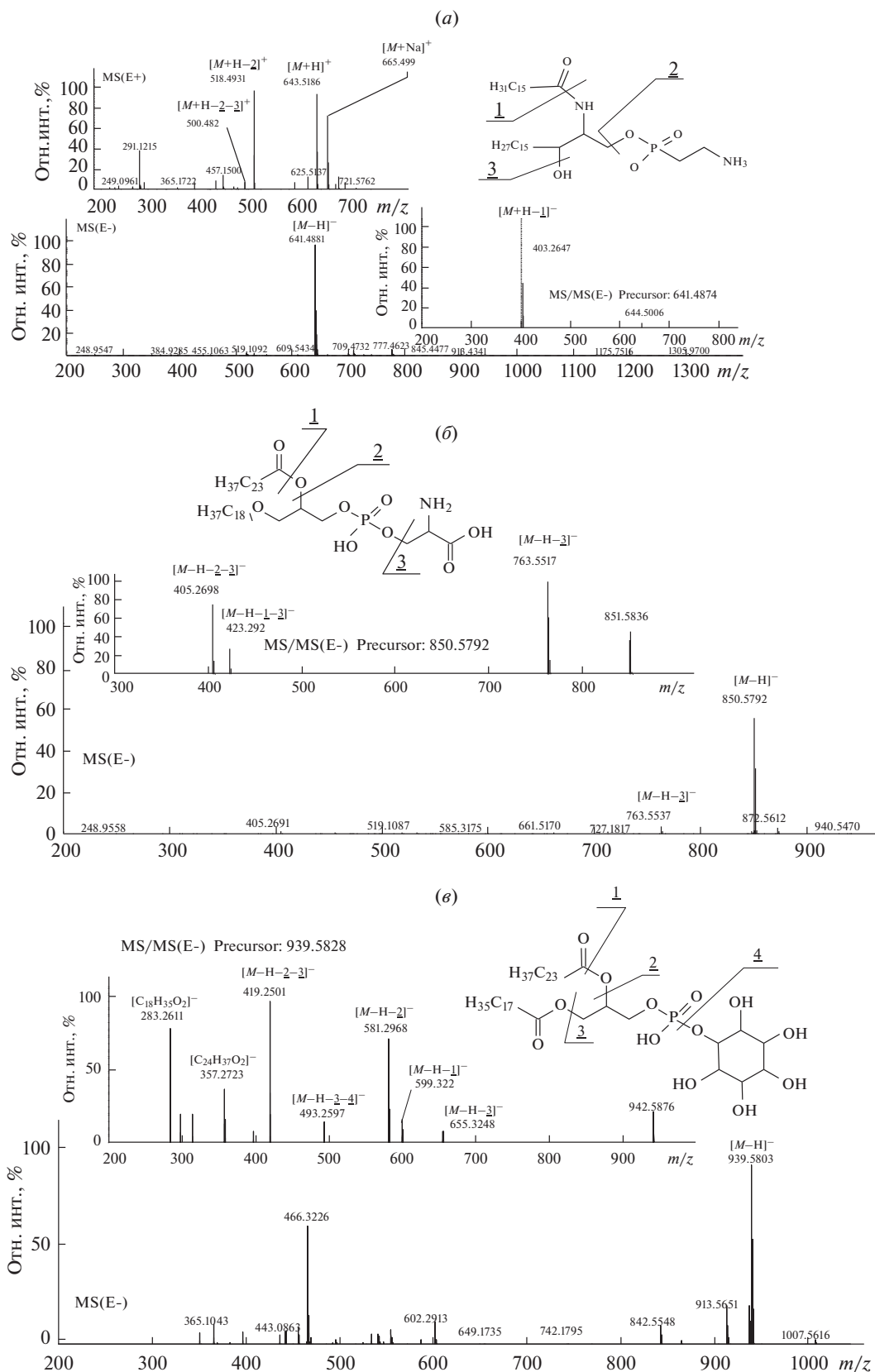
глицерофосфолипиды PE, PC, PS и PI, 1-*O*-алкилглицерофосфохолин (лизо-PC), а также гликолипиды MGDG, DGDG и SQDG. Липиды по классам разделяли HPLC на полярной фазе, время удерживания молекулярных видов PE, PC, CAEP, PS и PI находилось в интервале 3–5, 5–8, 7–11, 10–12 и 12–17 минут, соответственно. Структуру молекулярных видов определяли методом тандемной масс-спектрометрии (MS/MS) высокого разрешения в режиме ионизации распылением в электрическом поле (ESI). На рис. 2 и 3 для каждого класса липидов показаны масс-спектры и схемы фрагментации ионов на примере одного из молекулярных видов этого класса.

На рис. 2а представлены масс-спектры CAEP 18:2b/16:0. В спектре положительных ионов наблюдали сигналы ионов  $[M + Na]^+$  ( $m/z$  665.4990),  $[M + H]^+$  ( $m/z$  643.5186),  $[M + H - 2]^+$  ( $m/z$  518.4931, отрыв полярной части) и  $[M + H - 2 - 3]^+$  ( $m/z$  500.4820, отрыв полярной части и воды). В спектре отрицательных ионов присутствовал сигнал  $[M - H]^-$  ( $m/z$  641.4881), который в MS/MS-спектре после отрыва кетена давал ион  $[M - H - 1]^-$  с  $m/z$  403.2647.

На рис. 2б представлены масс-спектры алкилацилглицерофосфосерина PS 18:0e/24:5. Депротонированный молекулярный ион  $[M - H]^-$  ( $m/z$  850.6792) в MS/MS-спектре дает фрагменты, образованные при отрыве остатка серина  $[M - H - 3]^-$  ( $m/z$  763.5517), серина и кетена  $[M - H - 1 - 3]^-$  ( $m/z$  423.2920), а также серина и FA  $[M - H - 2 - 3]^-$  ( $m/z$  405.2698).

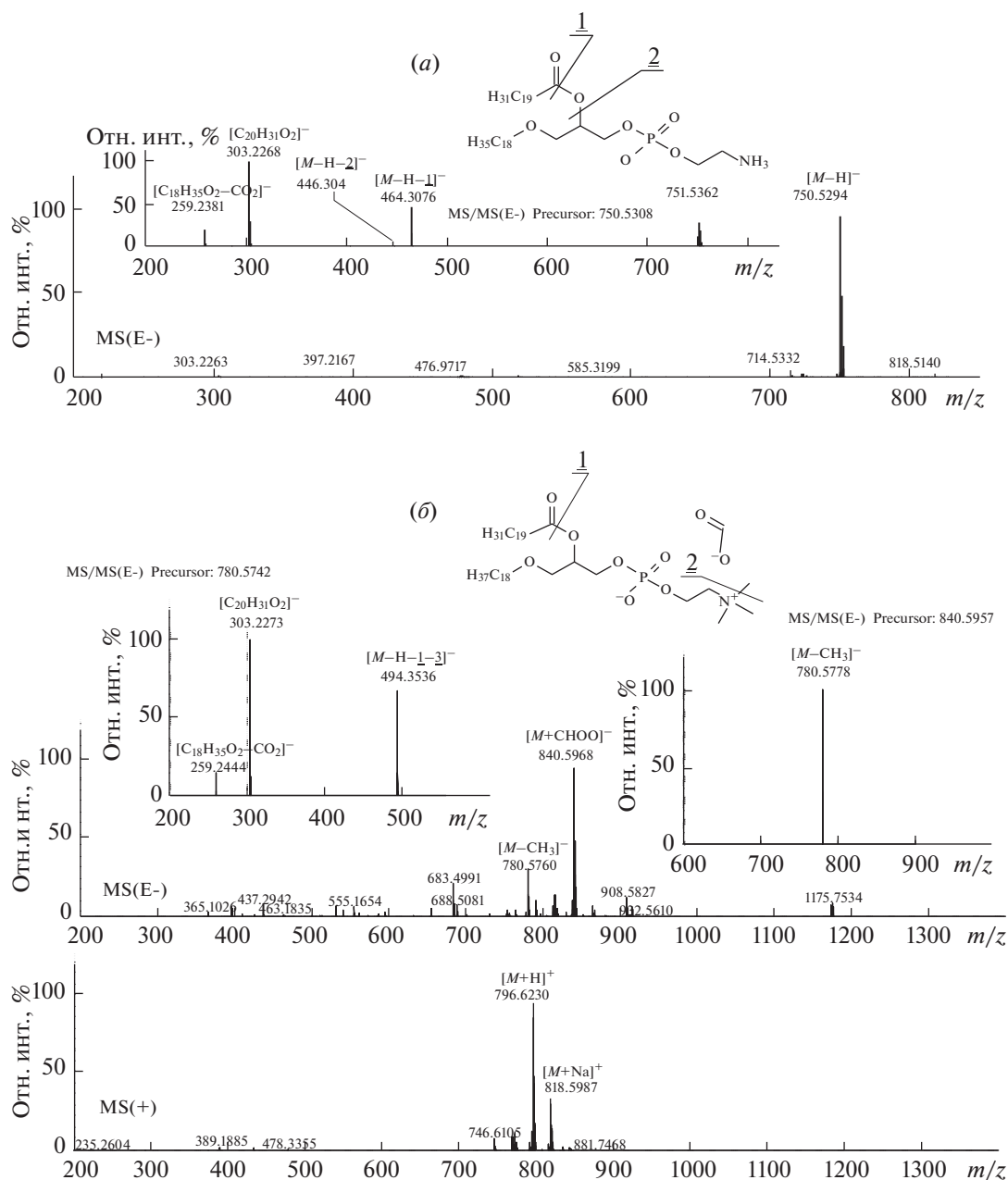
На рис. 2в представлены масс-спектры диацилглицерофосфоинозита PI 18:0/24:5. Ион  $[M - H]^-$  ( $m/z$  939.5803) в MS/MS-спектре дает серию интенсивных сигналов, соответствующий фрагментам, образованных при потере различных комбинаций инозита, кетена и FA. Также наблюдаются сигналы ионов двух кислот  $[C_{18}H_{35}O_2]^-$  ( $m/z$  283.2611) и  $[C_{24}H_{37}O_2]^-$  ( $m/z$  357.2723).

На рис. 3а представлены масс-спектры алкилацилглицерофосфоэтаноламина PE 18:0e/20:4. Спектр MS/MS показывает, что ион  $[M - H]^-$  ( $m/z$  750.5294) теряет кетен и FA, образуя фрагменты  $[M - H - 1]^-$  и  $[M - H - 2]^-$  соответственно. Этот спектр также содержит сигналы ионов  $[C_{20}H_{31}O_2]^-$  ( $m/z$  303.2268) и  $[C_{18}H_{35}O_2 - CO_2]^-$  ( $m/z$  259.2381). На рис. 3б представлены масс-спектры алкилацилглицерофосфохолина PC 18:0alk/20:4. Масс-спектр положительных ионов содержит сигналы с  $m/z$  796.6230 ( $[M + H]^+$ ) и  $m/z$  818.5987 ( $[M + Na]^+$ ). В масс-спектре отрицательных ионов есть интенсивные сигналы аддукта  $[M + HCOO]^-$  ( $m/z$  840.5968) и фрагмента  $[M - CH_3]^-$  ( $m/z$  780.5760), который, в свою очередь, в MS/MS-спектре дает фрагмент  $[M - H - 1 - 2]^-$



**Рис. 2.** Масс-спектры и схемы фрагментации полярных липидов мягкого коралла *S. siaesensis*: (a) церамидаэтил-фосфонат САЕР 18:2b/16:0; (б) алкилацилглицерофосерин PS 18:0e/24:5; (e) диацилглицерофосфоинозит PI 18:0/24:5. MS(E+) – масс-спектр в режиме регистрации положительных ионов, MS(E-) и MS/MS(E-) – масс-спектр и MS<sup>2</sup> спектр в режиме регистрации отрицательных ионов.





**Рис. 3.** Масс-спектры и схемы фрагментации полярных липидов мягкого коралла *S. siaesensis*: (а) алкилацилглицерофосфоэтаноламин PE 18:0e/20:4; (б) алкилацилглицерофосфохолин PC 18:0alk/20:4. MS(E<sup>+</sup>) – масс-спектр в режиме регистрации положительных ионов, MS(E<sup>-</sup>) и MS/MS(E<sup>-</sup>) – масс-спектр и MS<sup>2</sup>-спектр в режиме регистрации отрицательных ионов.

( $m/z$  494.3536), а также ионы  $[C_{20}H_{31}O_2]^-$  ( $m/z$  303.2268) и  $[C_{18}H_{35}O_2-CO_2]^-$  ( $m/z$  259.2381).

Гликолипиды анализировали в тех же условиях, что и фосфорсодержащие классы, при этом времена удерживания MGDG, DGDG и SQDG находились в интервалах 2.5–3.5, 11–14 и 13–15.5 мин соответственно. Молекулярные виды всех классов гликолипидов образовывали ионы  $[M-H]^-$ , однако ионы MGDG не давали фрагментов в

MS/MS-спектре, поэтому для MGDG определили только брутто-формулы молекулярных видов. MS/MS-спектры DGDG и SQDG содержали интенсивные сигналы фрагмент-ионов, образованных при потере остатков FA. При расшифровке масс-спектров гликолипидов использовали установленные ранее закономерности [22].

Главными компонентами полярного липидома альционарии *S. siaesensis* были (в процентах от общих липидов): PS 18:0e/24:5 (1.202%), лизо-PC



**Таблица 4.** Состав этаноламин- и холинглицерофосфолипидов (PE и PC) мягкого коралла *S. siaesensis*\*

PE	C	C <sub>отн</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	PC	C	C <sub>отн</sub>	[M + H] <sup>+</sup>
18:1e/17:1**	0.039	1.82	714.5440	16:0e/16:2	0.184	7.27	716.5673
16:1e/20:4	0.054	2.53	722.5060	16:0e/18:4	0.201	7.95	740.5619
16:0e/20:4	0.030	1.42	724.5253	16:0e/16:3	0.148	5.84	742.5789
18:1e/18:2	0.044	2.07	726.5460	16:0e/18:2	0.164	6.47	744.6037
19:1e/17:1	0.096	4.49	728.5550	18:1e/16:0	0.075	2.95	746.6166
16:2/20:4***	0.090	4.21	734.5432	16:1e/20:6	0.042	1.66	762.5413
17:1e/20:4	0.012	0.58	736.5248	16:1e/20:5	0.049	1.94	764.5582
18:1e/20:4	0.909	42.54	750.5400	16:1e/20:4	0.043	1.69	766.5760
18:0e/20:4	0.105	4.89	752.5513	16:0e/20:4	0.397	15.68	768.5943
19:1e/20:4	0.098	4.61	764.5540	18:0e/18:3	0.102	4.04	770.6094
19:1/20:4	0.047	2.19	778.5256	18:0e/18:2	0.066	2.60	772.6352
20:3e/20:0-ОН	0.150	7.01	782.5904	18:0e/18:1	0.043	1.69	774.6458
20:1/20:4	0.051	2.40	792.5466	16:0e/22:6	0.065	2.58	792.5844
20:3e/21:0-ОН	0.093	4.37	796.6249	18:1e/20:4	0.062	2.45	794.6007
18:1e/20:0	0.018	0.83	802.5707	18:0e/20:4	0.510	20.17	796.6250
18:1e/24:5	0.066	3.10	804.5850	18:0e/20:3	0.042	1.65	798.6338
18:0e/24:5	0.061	2.86	806.6000	18:1e/22:6	0.073	2.89	818.5999
20:3e/22:0-ОН	0.173	8.11	810.6315	18:1e/22:5	0.062	2.44	820.6134
Сумма	2.138	100.0		16:0e/24:5	0.031	1.22	822.6340
				18:0e/24:5	0.016	0.64	850.6726
				Другие	0.157	6.21	
				Сумма	2.531	100.0	

\* См. примечание к табл. 1.

\*\* Алкил (*sn*-1)/ацил(*sn*-2).

\*\*\* Ацил/ацил.

18:0e (1.055%), PE 18:1e/20:4 (0.909%), PC 18:0e/20:4 (0.510%), CAEP 18:2b/16:0 (0.433%), SQDG 14:0/16:0 (0.410%), PI 18:0/24:5 (0.196%) (табл. 4–6).

В исследованном виде альционии остатки ТРА, хемотаксономических маркеров всех октокораллов [10, 54], были сосредоточены в молекулярных видах PS и, частично, PI (табл. 5). Аналогичная диспропорция в распределении остатков ТРА между классам фосфолипидов была отмечена в полярном липидоме других видов тропических и холодноводной альционий [13, 14, 36], а также в медузе *Rhopilemaes culentum* [56]. Примечательно, что молекулярный вид PS 18:0e/24:5, содержащий остаток ТРА, является одним из ключевых компонентов липидома альционии *S. siaesensis*. Сравнение полярных липидомов *S. siaesensis* и других тропических альционий подтверждает, что подавляющее большинство молекулярных видов PE, PC и PS этих животных находятся в алкилацильной форме, в то время как для молекулярных видов PI характерна диацильная форма (табл. 4–6). Поскольку MGDG, DGDG и

SQDG являются главными классами липидов тилакоидных мембран растений, присутствие этих классов липидов закономерно для полного липидома мягкого коралла (табл. 6), содержащего зооксантеллы. SQDG 14:0/16:0 является одним из ключевых компонентов липидома *S. siaesensis*, что еще раз указывает на важность зооксантелл в формировании липидного профиля симбиотических мягких кораллов.

Наличие в липидоме исследованного мягкого коралла молекулярных видов с ацильными остатками ТРА является следствием фундаментальных особенностей биосинтеза липидов в октокораллах, а доминирование насыщенных восков в запасных липидах, заметная доля MGDG, DGDG и SQDG, а также использование уникальных FA зооксантелл в синтезе липидов организма-хозяина, указывает на важность зооксантелл в формировании липидного профиля симбиотических мягких кораллов. Таким образом, полный липидом мягких кораллов зависит не только от особенностей биосинтеза липидов этих животных, но и отражает влияние симбиотических и ассоци-

**Таблица 5.** Состав серин- и инозитглицерофосфолипидов (PS и PI), лизо-РС, а также церамидаминоэтилфосфонатов (САЕР) мягкого коралла *S. siaesensis*\*

PS	C	C <sub>отн</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	PI	C	C <sub>отн</sub>	[M – H] <sup>–</sup>
18:0e/22:5	0.012	0.80	822.5532	18:0e/22:4	0.003	1.10	899.5925
18:0e/24:6	0.182	12.17	848.5727	18:0/22:6	0.008	2.59	909.5472
18:0e/24:5	1.202	80.35	850.587	18:0/22:5	0.019	6.13	911.5601
C <sub>50</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>9</sub> P	0.029	1.94	870.5535	18:0/22:4	0.039	12.17	913.5792
C <sub>50</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>9</sub> P	0.072	4.81	872.5683	18:0/24:6	0.049	15.51	937.5754
Сумма	1.496	100.0		18:0/24:5	0.196	62.06	939.584
				Другие	0.014	4.42	
				Сумма	0.316	100.0	
САЕР	C	C <sub>отн</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	лизо-РС	C	C <sub>отн</sub>	[M + H] <sup>+</sup>
18:2b/16:0	0.433	60.99	641.4952	18:0e	1.055	78.10	494.3540
18:1b/16:0	0.124	17.47	643.5085	16:0e	0.296	21.90	466.3230
18:0b/16:0	0.073	10.28	645.5263	Сумма	1.351	100.0	
18:2b/16:0-OH	0.044	6.20	657.4889				
C <sub>38</sub> H <sub>73</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	0.004	0.56	683.5016				
C <sub>43</sub> H <sub>77</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P	0.032	4.51	763.5543				
Сумма	0.710	100.0					

\* См. примечание к табл. 1 и 4.

**Таблица 6.** Состав моногалактозил-, дигалактозил- и сульфохиновозилдиацилглицеролов (MGDG, DGDG и SQDG) мягкого коралла *S. siaesensis*\*

MGDG	C	C <sub>отн</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	SQDG	C	C <sub>отн</sub>	[M – H] <sup>–</sup>
32:2**	0.010	3.51	725.513	14:0/14:0	0.015	1.83	737.4474
34:7	0.010	3.64	743.474	14:2/16:0	0.038	4.63	761.4457
36:9	0.024	8.50	767.474	14:1/16:0	0.125	15.24	763.461
36:8	0.044	15.59	769.4896	14:0/16:0	0.410	50.00	765.4772
36:7	0.057	20.00	771.5163	16:0/16:3	0.020	2.44	787.4592
38:10	0.009	3.09	793.4896	16:0/16:2	0.040	4.88	789.475
38:9	0.010	3.68	795.5053	16:0/16:0	0.142	17.32	793.508
Другие	0.120	8.07		Другие	0.030	3.66	
Сумма	0.285	100.0		Сумма	0.82	100.0	
DGDG	C	C <sub>отн</sub>	[M – H] <sup>–</sup>				
34:7	0.021	11.73	905.5227				
36:9	0.029	16.20	929.5233				
18:4/18:4	0.076	42.46	931.5387				
18:4/20:5	0.053	29.61	957.5539				
Сумма	0.179	100.0					

\* См. примечание к табл. 1 и 4.

\*\* Число атомов углерода/число двойных связей в ацильных группах.

ированных организмов, источников пищи и условий среды обитания.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для экстракции липидов и ТСХ использовали гексан, бензол, хлороформ, метанол квалификации ч. д. а.; для ВЭЖХ — гексан, 2-пропанол, НСООН, аммиак, триэтиламин квалификации LC-MS grade (Sigma-Aldrich, США). ТСХ проводили на готовых пластинках Сорбфил ПТСХ-АФ-В, 10 см × 10 см (Россия). Стандарты триглицеридов, глико- и фосфолипидов получены от фирмы “Avanti Polar Lipids Inc.” (США). Тридецилпальмитат (х. ч.) получен от КНПО Ди-агностикум (Россия).

**Объект исследования.** Колонии мягкого коралла *S. siaesensis* van Oefwegen, 2008 собирали водозлазным способом на глубинах 4–6 м в заливе Нячанг (NhaTrang) (Южно-Китайское море). Кораллы помещали в танк со свежей морской водой, транспортировали в лабораторию в течение 2 ч, тщательно очищали и немедленно использовали для экстракции липидов. Для анализа липидов использовали четыре разные колонии, в таблицах представлены средние значения от четырех измерений, отклонения не превышали 10% от средней величины.

**Экстракция липидов.** Липиды получали по модифицированному методу Фолча и др. [37]. Примерно 10 г влажной ткани измельчали на кусочки размером 1–3 мм и интенсивно гомогенизировали в 30 мл смеси хлороформ–метанол, 1 : 2, фильтровали, остаток дважды экстрагировали 30 мл смеси хлороформ–метанол, 2 : 1, оставляя для экстракции в течение 4 ч при 4°C. Экстракты объединяли, смешивали с 30 мл хлороформа и 35 мл воды и оставляли расслаиваться на ночь при 4°C. Затем нижний слой отделяли, упаривали, общие липиды растворяли в небольшом количестве хлороформа и хранили при –80°C.

**Анализ восков.** К аликвоте общих липидов добавляли внутренний стандарт (13:0/16:0, 480 мкг/мл), воски выделяли препаративной ТСХ в системе гексан–бензол, 70 : 30, растворяли в хлороформе и хранили при –18°C. Количественный анализ молекулярных видов восков осуществляли методом газо-жидкостной хроматографии на приборе Shimadzu GC-2010 (Япония) с пламенно-ионизационным детектором (температура 340°C) и капиллярной кварцевой колонкой Equity-5 (0.25 мм × 30 м, толщина фазы 0.25 мкм, Supelco, США) в токе гелия (28.4 см/с), рабочее давление 1.2 атм., делитель пробы 1 : 30. Анализ проводили при температуре испарителя 320°C, в градиенте температуры колонки от 240 до 300°C со скоростью 20°C/мин и от 300 до 340°C со скоростью 4°C/мин. Структуру молекулярных видов восков

определяли методом хроматомасс-спектрометрии на приборе Shimadzu GCMS QP5050A (Япония), используя капиллярную кварцевую колонку SPB-5ms (0.25 мм × 30 м, толщина фазы 0.25 мкм, Supelco, США) при температурных условиях, указанных выше. Температура интерфейса 240°C, ионизация электронным ударом (70 эВ). Масс-спектрометрические данные интерпретировали согласно работе [39].

**Анализ TG и MADAG.** Сумму TG и MADAG выделяли препаративной ТСХ, элюент–бензол, перерастворяли в хлороформе и хранили при –18°C. Количество TG и MADAG в общих липидах определяли денситометрией изображения аналитических ТСХ пластинок (Сорбфил Видеоденситометр, Россия) с построением калибровочной кривой по внешнему стандарту [14]. Молекулярные виды TG и MADAG разделяли сверхкритической флюидной хроматографией на приборе Shimadzu Nexera UC (Япония) на двух последовательно соединенных колонках Shim-pack XR-ODSII (2.0 × 150 мм) (Япония) при изократическом элюировании (0.6 мл/мин) сверхкритическим CO<sub>2</sub> с добавкой 35% метанола, максимальное давление колонки 50 МПа и температура колонки 17°C. Для определения количества молекулярных видов TG и МАДАГ использовали детектор по светорассеиванию Shimadzu ELSD LT II (Япония) (температура испарительной трубки 40°C, давление газа распылителя (N<sub>2</sub>) 0.4 МПа). Для определения структуры этих веществ использовали жидкостной тройной квадрупольный масс-спектрометр Shimadzu LCMS-8060 (Япония), при этом к потоку элюента из хроматографической колонки с помощью насоса через постколоночный микросмеситель добавляли НСООН (0.1% в MeOH) со скоростью 0.2 мл/мин. Анализ проводили в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) и регистрации сигналов положительных ионов. Сканирование осуществляли в диапазоне  $m/z$  300–1200. Температура интерфейса 350°C, температура линии десольватации 200°C. Скорости подачи испаряющего (N<sub>2</sub>), нагревающего (воздух) и осушающего газов (N<sub>2</sub>) (nebulizing, heating, and dry gases) составили 3, 10 и 10 л/мин соответственно. Интерпретацию масс-спектров проводили в соответствии со схемами фрагментации, опубликованными ранее [40, 41].

**Анализ фосфорсодержащих липидов и гликолипидов.** Общее количество фосфо- и фосфолипидов и отдельных классов этих липидов определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) по содержанию неорганического фосфора после сжигания с HClO<sub>4</sub>, как опубликовано ранее [57]. Количество гликолипидов определяли методом ТСХ в системе хлороформ–метанол–аммиак–бензол, 65 : 30 : 5 : 10 с последующей ден-

ситометрией [14] и калибровкой по внешнему стандарту гликолипидов.

Молекулярные виды фосфорсодержащих липидов и гликолипидов, входящие в состав общих липидов, разделяли на колонке Shim-Pack diol ( $4.6 \times 50$  мм, размер частиц 5 мкм) (Shimadzu, Япония) с использованием жидкостного хроматографа Shimadzu Nexera-e. В качестве элюента использовали систему А (2-пропанол-гексан- $\text{H}_2\text{O}-\text{HCOOH}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}-\text{Et}_3\text{N}$ , 28 : 72 : 1.5 : 0.1 : 0.05 : 0.02, по объему) и систему Б (2-пропанол- $\text{H}_2\text{O}-\text{HCOOH}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}-\text{Et}_3\text{N}$ , 100 : 1.5 : 0.1 : 0.05 : 0.02, по объему). Содержание системы Б программировали: от 0 до 20% (7 мин), от 20 до 100% (5 мин), 100% (5 мин), от 100 до 0% (0.1 мин) и 0% (10 мин). Скорость элюирования составила 0.2 мл/мин. Для детектирования липидов использовали жидкостной тандемный масс-спектрометр высокого разрешения Shimadzu LCMS-IT-TOF (ионная ловушка + времяпролетный масс-анализатор) (Япония). Анализ проводили в режиме ESI при одновременной регистрации сигналов положительных и отрицательных ионов. Сканирование осуществляли в диапазоне  $m/z$  100–1200. Потенциал в источнике составлял –3.5 кВ при образовании отрицательных ионов и 4.5 кВ – при образовании положительных ионов. Температура ионного источника 250°C, давление газа-осушителя ( $\text{N}_2$ ) – 200 кПа, поток газа-распылителя ( $\text{N}_2$ ) – 1.5 л/мин. В соударительной ячейке масс-спектрометра использовали аргон (0.003 Па). Процентное содержание индивидуальных молекулярных видов для каждого класса гликолипидов и фосфорсодержащих липидов рассчитывали по площади пиков отрицательных ионов  $[M - \text{H}]^-$ , кроме холинглицерофосфолипидов, содержание которых определяли по площади пиков положительных ионов  $[M - \text{CH}_3]^+$ . Идентификацию молекулярных видов проводили, как описано ранее [14].

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность П.В. Веланскому и Е.В. Ермоленко (ННЦМБ ДВО РАН) за помощь в получении и интерпретации масс-спектров.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spalding M.D., Grenfell A.M. // *Coral Reefs*. 1997. V. 16. P. 225–230.
2. Davy S.K., Allemand D., Weis V.M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. P. 229–261.
3. Sorokin Y.I. *Coral Reef Ecology. Ecological Studies*. Berlin: Springer, 1995. V. 102.
4. Muscatine L., McCloskey L.R., Marian R.E. // *Limnol. Oceanogr.* 1981. V. 26. P. 601–611.
5. Hoegh-Guldberg O. // *Mar. Freshw. Res.* 1999. V. 50. P. 839–866.
6. Yamashiro H., Oku H., Higa H., Chinen I., Sakai K. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1999. V. 122B. P. 397–407.
7. Имбс А.Б. // *Биол. моря*. 2013. Т. 39. С. 159–172.
8. Hamoutene D., Puestow T., Miller-Banoub J., Wareham V. // *Coral Reefs*. 2008. V. 27. P. 237–246.
9. Imbs A.B., Luu H.V., Long P.Q. // *Chem. Nat. Comp.* 2007. V. 43. P. 610–611.
10. Imbs A.B., Latyshev N.A., Dautova T.N., Latypov Y.Y. // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 2010. V. 409. P. 65–75.
11. Treignier C., Grover R., Ferrier-Pages C., Tolosa I. // *Limnol. Oceanogr.* 2008. V. 53. P. 2702–2710.
12. Латышев Н.А., Светашев В.И., Хунг Н.К., Нга Д.Т. // *Биол. моря*. 1986. № 3. С. 52–56.
13. Imbs A.B., Dang L.P.T., Rybin V.G., Nguyen N.T., Pham L.Q. // *Biochem. Anal. Biochem.* 2015. V. 4. P. 205.
14. Imbs A.B., Dang L.P.T., Rybin V.G., Svetashev V.I. // *Lipids*. 2015. V. 50. P. 575–589.
15. Joseph J.D. // *Progr. Lipid Res.* 1979. V. 18. P. 1–30.
16. Imbs A.B., Yakovleva I.M., Pham L.Q. // *Fish. Sci.* 2010. V. 76. P. 375–380.
17. Moschidis M.C. // *Prog. Lipid Res.* 1985. V. 23. P. 223–246.
18. Mukhamedova K.S., Glushenkova A.I. // *Chem. Nat. Comp.* 2000. V. 36. P. 329–341.
19. Awai K., Matsuoka R., Shioi Y. // *Proceedings of the 12th Int. Coral Reef Symp. Cairns, Australia*. 2012.
20. Bishop D.G., Kenrick J.R. // *Lipids*. 1980. V. 15. P. 799–804.
21. Tchernov D., Gorbunov M.Y., de Vargas C., Narayan Yadav S., Milligan A.J., Häggblom M., Falkowski P.G. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 13531–13535.
22. Имбс А.Б., Рыбин В.Г., Харламенко В.И., Данг Л.Т.Ф., Нгуен Н.Т., Фам К.М., Фам Л.К. // *Биол. моря*. 2015. Т. 41. С. 430–436.
23. Hashimoto N., Fujiwara S., Watanabe K., Iguchi K., Tsuzuki M. // *Lipids*. 2003. V. 38. P. 991–997.
24. Seemann J., Sawall Y., Auel H., Richter C. // *Lipids*. 2013. V. 48. P. 275–286.
25. Mueller C.E., Larsson A.I., Veuger B., Middelburg J.J., van Oevelen D. // *Biogeosci.* 2014. V. 11. P. 123–133.
26. Teece M.A., Estes B., Gelsleichter E., Lirman D. // *Limnol. Oceanogr.* 2011. V. 56. P. 1285–1296.
27. Papina M., Meziane T., van Woessik R. // *Comp. Biochem. Physiol.* 2003. V. 135B. P. 533–537.
28. Imbs A.B., Yakovleva I.M. // *Coral Reefs*. 2012. V. 31. P. 41–53.
29. Rodrigues L.J., Grottoli A.G., Pease T.K. // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2008. V. 358. P. 136–143.
30. Meyers P.A. // *Proceedings of Third Int. Coral Reef Symp.* 1977. V. 1. P. 529–536.
31. Imbs A.B. // *Polar Biol.* 2016. V. 39. P. 1511–1514.
32. Spener F., Lagarde M., Geloan A., Record M. // *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 2003. V. 105. P. 481–482.
33. Vítová M., Goecke F., Sigler K., Řezanka T. // *Algal Res.* 2016. V. 13. P. 218–226.
34. Rybin V.G., Imbs A.B., Demidkova D.A., Ermolenko E.V. // *Chem. Phys. Lipids*. 2017. V. 202. P. 55–61.
35. Garrett T.A., Schmeitzel J.L., Klein J.A., Hwang J.J., Schwarz J.A. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e57975.
36. Имбс А.Б. // *Биол. моря*. 2017. Т. 43. С. 210–214.
37. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. P. 497–509.

38. Viladrich N., Bramanti L., Tsounis G., Chocarro B., Martínez-Quitana A., Ambroso S., Madurell T., Rossi S. // *Coral Reefs*. 2016. V. 35. P. 1033–1045.
39. Urbanová K., Vrkošlav V., Valterová I., Háková M., Cvacka J. // *J. Lipid Res.* 2011. V. 53. P. 204–213.
40. Byrdwell W.C. // *Lipids*. 2005. V. 40. P. 383–417.
41. Holčápek M., Byrdwell W.C. *Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques*. New York: Academic Press, 2017.
42. Hartvigsen K., Ravandi A., Bukhave K., Holmer G., Kuksis A. // *J. Mass Spectrom.* 2001. V. 36. P. 1116–1124.
43. Zhujin L., Jianxiong L., Houming W. // *Chinese J. Org. Chem.* 1990. V. 10. P. 277–281.
44. Al Lihaihi S.S., Al Sofyani A., Niaz G.R., Ahmad V.U., Noorwala M., Mohammad F.V. // *Scientia Marina*. 2002. V. 66. P. 95–101.
45. Chierieszko L.S., Karns T.K.B. // *Biology and Geology of Coral Reefs, Vol. II* / Ed. Jones O.A. New York: Acad. Press, 1973. P. 183–203.
46. Benson A.A., Muscatine L. // *Limnol. Oceanogr.* 1974. V. 19. P. 810–814.
47. Бош Т.В., Лонг Ф.К. // *Биол. моря*. 2017. Т. 43. С. 436–443.
48. Chen H.-K., Song S.-N., Wang L.-H., Mayfield A.B., Chen Y.-J., Chen W.-N.U., Chen C.-S. // *PLoS One*. 2015. V. 10. P. e0132519.
49. Chen H.-K., Wang L.-H., Chen W.-N.U., Mayfield A.B., Levy O., Lin C.-S., Chen C.-S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. e3244.
50. Patton J.S., Abraham S., Benson A.A. // *Mar. Biol.* 1977. V. 44. P. 235–247.
51. Athenstaedt K., Daum G. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 266. P. 1–16.
52. Magnusson C.D., Haraldsson G.G. // *Chem. Phys. Lipids*. 2011. V. 164. P. 315–340.
53. Imbs A.B., Yakovleva I.M., Dautova T.N., Bui L.H., Jones P. // *Phytochem.* 2014. V. 101. P. 76–82.
54. Vysotskii M.V., Svetashev V.I. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. V. 1083. P. 161–165.
55. Имбс А.Б., Яковлева И.М., Латышев Н.А., Фам Л.К. // *Биол. моря*. 2010. Т. 36. С. 445–450.
56. Zhu S., Ye M., Xu J., Guo C., Zheng H., Hu J., Chen J., Wang Y., Xu S., Yan X. // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. P. 8283–8291.
57. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. // *J. Chromatogr.* 1974. V. 114. P. 129–141.

## Study of Total Lipidome of the Soft Coral *Sinularia siaesensis*

T. V. Sikorskaya\*<sup>\*, #</sup> and A. B. Imbs\*

<sup>#</sup>Phone: +7(423)2310905, fax: +7(423)2310905, e-mail: miss.tatyanna@yandex.ru

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

The rapid development of lipidomics of human and higher animals stimulated the study of the lipidome of certain groups of marine organisms. Soft corals are an integral part of the tropical and cold-water ecosystems of the World Ocean, but there is practically no data on the lipidome of these animals. The total lipidome of the tropical soft coral *Sinularia siaesensis* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia: Alcionacea) containing intracellular symbiotic microalgae (zooxanthellae) was studied by gas and liquid chromatography-mass spectrometry. The structure and content of 144 molecular species of the main classes of acyl lipids of this alcyonaria were determined, including waxes, triglycerides (TG), monoalkyldiacylglycerides (MADAG), ethanolamine, choline, serine and inositol glycerophospholipids (PE, PC, PS, and PI), ceramideaminoethylphosphonate (CAEP), sulfoquinovosyldiacylglyceride (SQDG), mono- and digalactosyldiacylglycerides (MGDG and DGDG). The main components of *S. siaesensis* lipids were: waxes 16:0/16:0, 16:0/18:0 and 18:0/16:0; TG 16:0/16:0/16:0 and 16:2/16:0/16:0; MADAG 18:0e/16:0/16:0, 16:0e/16:0/18:0 and 16:0e/16:0/16:0; PS 18:0e/24:5, lyso-PC 18:0e, PE 18:1e/20:4, PC 18:0e/20:4, CAEP 18:2b/16:0, SQDG 14:0/16:0 and PI 18:0/24:5. The dominance of saturated waxes in reserve lipids is a species-specific feature of tropical alcyonarians. Waxes are synthesized in the host organism, and zooxanthellae can increase the proportion of saturated waxes by transferring saturated fatty acids (FA). The residues of polyunsaturated FA (PUFA) are found in the molecules of TG and MADAG, mainly in the positions *sn*-1 and *sn*-2, respectively. The detection of MADAG with residues of marker FA of zooxanthellae (18:0e/18:3/16:0, 18:0e/18:4/16:0 and 16:0e/18:3/16:0) confirms the transfer of PUFA from symbionts to the host. Tetracosapolyenoic FA, chemotaxonomic markers of octocorals, are concentrated in molecular species of PS and PI. Most molecular species of PE, PC and PS are in alkylacyl form, while for PI molecules, a diacyl form is characteristic. A significant proportion of MGDG, DGDG and SQDG points to the importance of zooxanthellae in the formation of the lipid profile of symbiotic soft corals. Determination of the profile of lipid molecular species requires the development of a lipidomic approach in the study of the biochemistry and ecology of corals and other cnidarians.

*Keywords:* lipidomics, lipid molecular species, lipid markers, soft corals, symbionts, tandem mass-spectrometry