

На правах рукописи



Аксёнов-Грибанов Денис Викторович

Сравнительная оценка влияния изменения температуры среды на
байкальские и палеарктические организмы по показателям
энергетического метаболизма и неспецифического стресс-ответа

03.02.08– экология
(биологические науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2013

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет», г. Иркутск.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Тимофеев Максим Анатольевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Боровский Геннадий Борисович
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск

кандидат биологических наук
Ицкович Валерия Борисовна
Лимнологический институт СО РАН,
г. Иркутск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии
внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук

Защита диссертации состоится «24» декабря 2013 г. в 16:00 на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М.М. Кожова (ауд. 219), e-mail: dissovet07@gmail.com, Тел/факс: +7(3952) 24-18-55

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет».

Автореферат разослан «22» ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



А. А. Приставка

Актуальность проблемы. Температура является важнейшим экологическим фактором среды, от которого напрямую зависят обмен веществ и развитие гидробионтов (Константинов, 1986; Степановских, 2003). Большинство пойкилотермных водных организмов приспособлено к обитанию в определенном температурном диапазоне, в пределах которого их метаболические процессы функционируют с наибольшей эффективностью. Отклонение параметров среды от оптимальных значений ведет к развитию стрессовой реакции и активации ряда защитных механизмов (Stillman, Somero, 1996; Чуйко, 2004). У гидробионтов, способных к активному перемещению, выработались выраженные термопреферентные поведенческие реакции, позволяющие организмам выбирать ту или иную оптимальную температурную зону (Фокина и др., 2003; Немова, 2010). В случае невозможности избегания критических температур, у гидробионтов активируются комплексные метаболические процессы, направленные на адаптацию к последствиям изменения температуры среды (Pörtner, Farrell, 2008).

Экспериментальное определение зоны термопреферендума является одним из подходов, широко применяемых в экологии для оценки границ температурного оптимума видов и представляет собой оценку терморезистентных способностей. Распространенная практика определения терморезистентных показателей в условиях экспозиционных шоковых экспериментов достаточно информативна при межвидовом сопоставлении, однако она слабо отражает экологические характеристики видов. Поскольку большинство изменений параметров среды обитания происходит постепенно, довольно сложно определить как показатели терморезистентности или термопреференции отдельных видов связаны с характеристиками клеточного стресс-метаболизма и как именно изменения условий среды обитания отражаются на метаболических процессах особей. Один из подходов связан с оценкой комплекса биохимических показателей стресс-метаболизма. Для оценки особенностей взаимосвязи температурного оптимума видов и параметров клеточного метаболизма наиболее интересными являются организмы, которые эволюционировали в стабильных условиях среды и не сталкивались с ее критическими изменениями. Одним из таких мест, характеризующихся высокой стабильностью условий среды обитания, является озеро Байкал.

Среди байкальских организмов особенный интерес представляют доминантные бентосные группы: амфиподы (Amphipoda, Crustacea) и гастроподы (Gastropoda, Mollusca), суммарная биомасса которых является основой всего литорального сообщества (Беркин, 2009; Тимошкин, 2009; Байкаловедение..., 2012). Несмотря на то, что вопросами изучения влияния изменения параметров среды на функциональные свойства отдельных элементов клеточной резистентности (антиоксидантные ферменты, стрессовые белки и др.) занимается широкий круг исследователей как в России, так и за рубежом

(Sokolova, 2010; Pörtner, 2012; Чуйко и др, 2012), вопросы изучения взаимосвязи терморезистентности и термопреференции байкальских амфипод и гастропод с неспецифическими стресс-реакциями в условиях широкого температурного градиента являются практически не изученными.

Цель исследования. Провести сравнительную экспериментальную оценку отношения представителей байкальских и палеарктических видов амфипод и гастропод, различающихся по своим терморезистентным и термопреферентным характеристикам, к изменению температуры среды по неспецифическим показателям стресс-ответа.

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

1. Оценить резистентность нескольких видов байкальских и палеарктических амфипод, представителей различных мест обитания, к непрерывной градиентной гипо- и гипертермии;
2. Оценить влияние градиентного изменения температуры среды на эффективность энергетического обмена по изменению активности лактатдегидрогеназы, содержанию лактата и других энергетических метаболитов у байкальских и палеарктических видов амфипод и гастропод;
3. Провести оценку эффективности активации защитных механизмов неспецифической стресс-резистентности по изменению активности ферментов антиоксидантной системы - пероксидазы и каталазы у амфипод и гастропод в условиях градиентного изменения температуры среды;
4. Провести оценку изменения содержания стрессовых белков - белков теплового шока семейства БТШ70 (элементов защитных механизмов неспецифической стресс-резистентности) у байкальских и палеарктических видов амфипод и гастропод в условиях температурного градиента;
5. Определить характер взаимосвязи основных экологических аспектов терморезистентности байкальских и палеарктических видов амфипод и гастропод и выявить межвидовые различия.

Научная новизна. В исследовании впервые оценено влияние непрерывной градиентной гипо- и гипертермии на энергетический метаболизм и показатели неспецифического стресс-ответа байкальских и палеарктических амфипод и гастропод. Впервые показано, что у байкальских и палеарктических амфипод и гастропод за пределами определенного диапазона температур происходят изменения энергетического метаболизма и функционирования неспецифических механизмов терморезистентности. Критические отклонения температур среды от оптимальных значений вызывают накопление продуктов анаэробного обмена, изменение содержания стрессовых белков и ведут к

изменению активности ферментов антиоксидантной системы. Установлено, что у байкальских стенотермных видов активация защитных систем происходит раньше и при меньших отклонениях температур от оптимальных значений, чем у эвритермных палеарктических. Таким образом, выявлена связь ширины диапазона метаболической стабильности с экологическими характеристиками отдельных видов.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты настоящего исследования включены в отчеты лаборатории «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии ФГБОУ ВПО «ИГУ» по грантам Президента РФ, РФФИ, CRDF, ФЦП «Кадры... 2009-2013гг.» и др. Полученные материалы включены в учебные программы биолого-почвенного факультета Иркутского государственного университета. Представленные материалы могут быть использованы для разработки методических и природоохранных технологий рационального природопользования и сохранения биоразнообразия окружающей среды. Проведенные исследования лежат в области приоритетных направлений развития науки и техники РФ по направлению «Науки о жизни» и работ, включенных в перечень критических технологий РФ по направлению «Технологии мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, предотвращения и ликвидации ее загрязнения». Результаты диссертационной работы расширяют уже имеющиеся сведения о механизмах адаптации гидробионтов озера Байкал и водоемов Палеарктики и вносят вклад в развитие представлений о взаимоотношениях организма и среды.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У байкальских и палеарктических амфипод и гастропод, различающихся по своим терморезистентным и термопреферентным способностям, в зависимости от температуры среды происходят изменения в энергетическом метаболизме и функционировании неспецифических механизмов защиты. Критические отклонения температур среды от оптимальных значений вызывают увеличение содержания продуктов анаэробного метаболизма, изменение содержания стрессовых белков и ведут к изменению активности ферментов антиоксидантной системы.
2. Особенности изменений энергетического метаболизма, содержания стрессовых белков и активации антиоксидантной системы у байкальских и палеарктических амфипод и гастропод видоспецифично различаются и связаны с экологическими и физиологическими характеристиками видов.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на следующих конференциях: V международной Верещагинской байкальской конференции (Иркутск, 2010); IV Международной научной конференции, посвящённой памяти профессора Г.Г. Винберга (С. Петербург,

2010); II Всероссийской научно-практической конференции «Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле» (Листвянка, 2011); Международной конференции «New frontiers in Monitoring European Biodiversity» (Palermo, Italy, 2011); IV международном симпозиуме «Environmental physiology of ectotherms and plants» (Rene, France, 2011); Международной конференции «Региональный отклик окружающей среды на глобальные изменения в Северо-Восточной и Центральной Азии» (Иркутск, 2012); Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (Пушино, 2012); 17 международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2013); VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых – биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); Международном симпозиуме «Pollutant responses in marine organisms (PRIMO)» (Faro, Portugal, 2013); международном коллоквиуме «15th International Colloquium on Amphipoda» (Szczawnica, Poland, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано **15** основных работ. Из них: статей в журналах, включенных в список ВАК и приравненных к ним – **8** (в зарубежных журналах системы Web of Science – **4**; в российских изданиях – **4**); тезисов российских и международных конференций – **7**.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на **169** страницах машинописного текста, состоит из введения, включающего цель, задачи и положения, выносимые на защиту, обзора литературы, методической и экспериментальной частей, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа включает **11** таблиц, **15** комбинированных рисунков, на которых приведено более **55** отдельных диаграмм и графиков. Список литературы состоит из **307** источников, из которых **145** на русском и **162** на английском языках.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлены сведения о влиянии температуры среды на гидробионтов и принципах их адаптации, приведен обзор ключевых компонентов поддержания энергетического гомеостаза и механизмов неспецифического стресс-ответа. Представлена информация о фауне озера Байкал и обоснование выбора объектов исследования.

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта данного исследования были выбраны представители двух наиболее многочисленных и широко представленных групп организмов оз. Байкал: амфиподы (Amphipoda, Crustacea) и гастроподы (Gastropoda, Mollusca). Амфиподы и гастроподы являются типичными представителями бентофауны большинства пресноводных водоемов мира. В оз. Байкал данные группы организмов получили особое разнообразие, что проявляется в числе видов,

морфофизиологических особенностях и разнообразии характера адаптивных реакций.

В исследовании использовали байкальских термочувствительных амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) и *Ommatogammarus flavus* (Dyb., 1874), а также термочувствительных гастропод вида *Benedictia limnaeoides ongurensis* (Kozhov, 1936). В качестве представителей термоустойчивой палеарктической фауны были выбраны амфиподы вида *Gammarus lacustris* Sars (1863) и гастроподы вида *Lymnaea stagnalis* (Linne, 1758) - типичные обитатели мелководных водоемов Палеарктики.

Исходя из результатов экспериментальной оценки степени терморезистентности амфипод при остром температурном стрессе (25 °С), ранее был предложен следующий сравнительный межвидовой ряд отношения исследуемых видов к температуре: *O. flavus* < *E. verrucosus* < *G. lacustris*. (Тимофеев, 2000). Также из ранее опубликованных материалов по термопреферендуму амфипод известно, что в эксперименте в условиях температурного градиента взрослые особи амфипод вида *E. verrucosus* предпочитают температурную зону 5-6°С (Тимофеев, 2000). При этом в температурном диапазоне от 3-4 до 9-10°С в установках концентрировалось более 80% рачков данного вида. Пик концентрации *O. flavus* отмечен в зоне 3-4°С, а термопреферентное распределение носило слабовыраженный характер. У *G. lacustris* пик предпочитаемых температур лежит в зоне 15-16°С, при этом в температурном диапазоне от 11-12 до 17-18°С в установках концентрировалось более 65% рачков данного вида (Тимофеев, 2000).

Материал для представленного исследования был собран в ходе 2008 – 2013 гг. Сбор литоральных амфипод проводили на глубинах 0,5 - 1 м с использованием гидробиологического сачка. Сбор глубоководных амфипод осуществляли с применением глубоководных ловушек с глубины 50 - 100м. Байкальских амфипод отлавливали в районе пос. Листвянка (N 51°51.11', E 104° 52.22', Южный Байкал), а также в районе пос. Большие Коты (N 51°54.25', E 105°04.14'). Сбор байкальских гастропод был проведен в ходе летней полевой экспедиции (2011) в заливе Малое море (N 53°03.442', E 106°53.550') с глубины 30 - 40 м с использованием трала.

G. lacustris отлавливали в небольшом озере (N 51°90.67', E 105° 07.38') в районе пос. Большие Коты на расстоянии не более 1 км от побережья оз. Байкал. Гастропод *L. stagnalis* снимали с водных растений в черте г. Иркутска на озере о. Юность (N 52°26.79', E 104°28.08').

До проведения экспериментов амфипод и гастропод содержали отдельно по видам в аэрируемых аквариумах при температуре 6 ±0,5 °С в течение 3 суток для литоральных видов и в течение 6 суток (при температуре 4 ±0,5 °С) для глубоководных. В качестве корма использовали специализированный препарат "Tetra-Min" (Германия).

Экспозицию организмов в широком градиенте температур проводили в соответствии с методикой экспериментальной акклиматизации, рекомендованной Pörtner, Kunst (Science, 2008). В ходе исследования проводили 2 типа экспериментов: первый – экспозиция амфипод и гастропод в условиях градиентного (постепенного, непрерывного) повышения температуры среды от 6 (4)°С (принимаемой за контрольный показатель) до температуры, при которой отмечали гибель 50% особей; второй – экспозиция в условиях градиентного понижения температуры среды от контрольного уровня (6 (4)°С) до минимальных положительных температур (0,5°С). Скорость изменения температуры в эксперименте составила 1°С^хч⁻¹. Фиксацию материалов проводили в жидком азоте. Контрольные образцы фиксировали непосредственно в начале эксперимента при температуре 6°С для литоральных видов и при 4°С для глубоководных. Для оценки влияния изменения температуры среды на показатели клеточного метаболизма (в том числе стресс-маркеров) определяли изменения маркеров энергетического обмена (содержание лактата, ряда других энергетических метаболитов и активности лактатдегидрогеназы), содержания белков теплового шока БТШ70 и активности антиоксидантных ферментов (пероксидазы и каталазы).

Биохимические методы анализа. Оценку изменения содержания энергетических метаболитов проводили энзиматическими спектрофотометрическими методами с применением стандарт-наборов «Лактат-витал» и «ЛДГ-витал» и согласно методикам Grieshaber et al. (1987), Bergeymer (1985) с модификациями Ivanina et al. (2010), Sokolova et al. (2012). Изменение содержания БТШ70 определяли с использованием стандартного метода денатурирующего электрофореза с ДДС-Na в 10 % полиакриламидном геле с последующим Вестерн-блоттингом (Willmer et al., 2000) и инкубацией мембран в антителах к БТШ70 и антителах к актину. Последний применяли в качестве референтного белка. Оценку изменения активности ферментов антиоксидантной системы – пероксидазы и каталазы – проводили согласно модифицированным (Тимофеев, 2010) спектрофотометрическим методикам Drotar (1985) и Aebi (1984) соответственно.

Расчет и статистическая обработка данных. В ходе работы проведено более 180 экспериментов с амфиподами и более 100 экспериментов с гастроподами. Все эксперименты поставлены в 7 и более повторностях. Измерения проводили не менее чем в 3-х аналитических репликах из каждой пробы. Обсчет иммуноблоттов проводили с использованием пакета программ GelExplorer (v.3.0.9., Gel Analytic) и ImageJ (v.1.41., Wayne Rasband, NIH).

Для статистической обработки количественных данных пользовались общепринятыми методами: рассчитывали средние арифметические величины, и доверительный интервал. Проверку нормальности распределения осуществляли

при помощи критерия Шапиро-Уилка. Результаты теста показали, что анализируемые данные удовлетворительно соответствуют нормальному распределению. При неоднородности дисперсий вводили поправку по методу Уэлча.

Оценку достоверности различий между контрольными и экспериментальными выборками производили при помощи U критерия Манна – Уитни. Для проверки статистических гипотез при использовании множественных сравнений также использовали критерий Бонферрони.

Статистический и корреляционный анализы проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0 и программной среды R, с применением пакетов multcomp и sandwich. На диаграммах указаны доверительные интервалы. * - звездочкой обозначены случаи достоверного отличия значений от контроля при доверительной вероятности - 0,95.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели энергетического обмена у амфипод и гастропод при экспозиции в градиенте температур

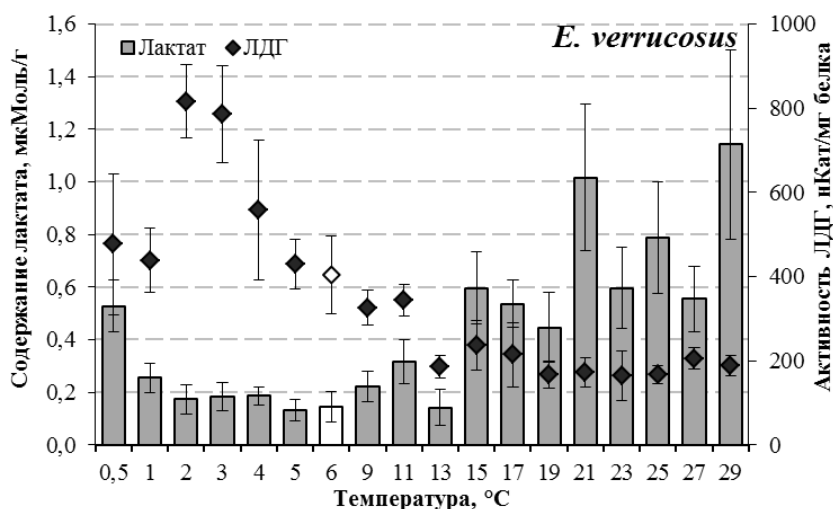
Изменение содержания лактата и активности лактатдегидрогеназы у амфипод

Экспозиция исследуемых видов в градиенте температур не приводила к отклонению содержания лактата от контрольных значений в диапазоне изменения температур с 2°C до 9°C у *E. verrucosus* (рис.1); с 2°C до 8°C у *O. flavus*; и с 3°C до 15°C у *G. lacustris*. Активность лактатдегидрогеназы при этом была стабильной и не отклонялась от контрольных показателей в диапазоне изменения температуры среды с 4°C до 11°C у *E. verrucosus* (рис.1), с 4°C до 8°C у *O. flavus* и с 0,5°C до 15°C у *G. lacustris*. При повышении температуры у литоральных видов *E. verrucosus* и *G. lacustris* отмечали снижение активности лактатдегидрогеназы, тогда как у глубоководного *O. flavus*, напротив, отмечали кратковременное повышение активности фермента. Понижение температуры у обоих байкальских видов вызывало кратковременное повышение активности лактатдегидрогеназы, тогда как у палеарктического *G. lacustris* изменения активности фермента в ответ на понижение температуры среды не обнаружены.

Изменение содержания лактата и активности лактатдегидрогеназы у гастропод

Экспозиция *L. stagnalis* не приводила к отклонению содержания лактата от контрольных значений в диапазоне изменения температур с 3°C до 10°C. (рис. 2). Последующее изменение содержание лактата сопровождалось повышением активности лактатдегидрогеназы (при 20°C) и снижением ее активности при температурах ниже 3°C.

При экспозиции гастропод *B. ongurensis* в условиях повышения температуры до 10-15°C отмечали накопление лактата (рис. 2). Однако при повышении температуры до 20°C содержание лактата снижалось до контрольных значений. Повышение же температуры до 25°C вызывало снижение содержания лактата относительно контрольных значений у *B.*



ongurensis. Изменение содержания лактата у *B. ongurensis* сопровождалось увеличением активности лактатдегидрогеназы при температурах экспозиции 20°C и 25°C.

Рисунок 1 - Изменение содержания лактата (в мкМоль/г. сыр. веса) и активность лактатдегидрогеназы (в нКат/мг белка) у байкальских амфипод вида *E. verrucosus*, экспонированных в условиях изменения температуры среды. Статистически достоверные отклонения не указаны.

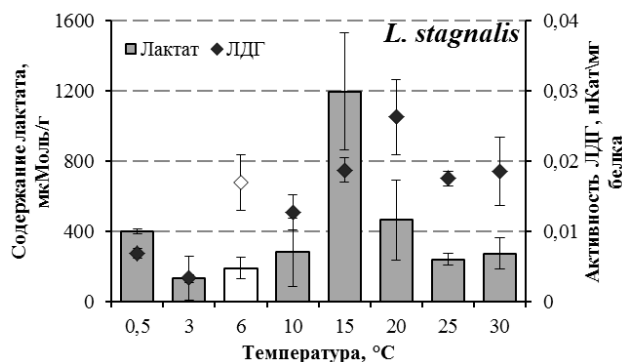


Рисунок 2 - Изменение содержания лактата (в мкМоль/г. сыр. веса) и активность лактатдегидрогеназы (в нКат/мг белка) у палеарктических гастропод *L. stagnalis*, экспонированных в условиях изменения температуры среды. Статистически достоверные отклонения не указаны.

Согласно данным корреляционного анализа между содержанием лактата и активностью лактатдегидрогеназы установлено, что в условиях градиентной гипертермии у всех представленных видов амфипод отмечаются отрицательные корреляции ($r = -0,74 - -0,85$). При экспозиции амфипод в условиях градиентной гипотермии корреляции не выражены. У гастропод корреляция между содержанием лактата и активностью лактатдегидрогеназы установлена только у термочувствительного байкальского вида *B. ongurensis* и носила отрицательный характер ($r = -0,78$), тогда как, у палеарктического *L. stagnalis* корреляции не выявлены.

Активность ферментов антиоксидантной системы у амфипод и гастропод при экспозиции в градиенте температур

Изменение активности пероксидазы и каталазы у амфипод

Как следует из материалов по оценке изменения активности пероксидазы и каталазы у амфипод, при экспозиции в условиях изменения температуры, активность пероксидазы была стабильной и не отклонялась от контрольных значений в диапазоне температуры с 4°C до 11°C у *E. verrucosus*, с 0,5°C до 8°C у *O. flavus* (рис. 3) и с 5°C до 17°C у *G. lacustris*. При этом у байкальских амфипод происходило повышение активности фермента при выходе за пределы данных температурных диапазонов, тогда как у палеарктического *G. lacustris*, напротив, отмечали снижение активности пероксидазы.

Активность каталазы была стабильной и не отклонялась от контрольных показателей в диапазоне температур среды с 0,5°C до 9°C у *E. verrucosus*, с 0,5°C до 18°C у *O. flavus* и с 0,5°C до 31°C у *G. lacustris*. Повышение температуры среды приводило к повышению активности каталазы у байкальских видов, тогда как при понижении температуры активность каталазы не изменялась.

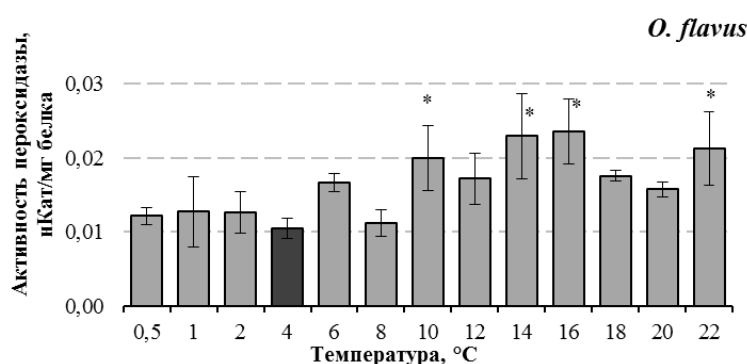


Рисунок 3 - Изменение удельной активности пероксидазы у байкальских амфипод вида *O. flavus*, экспонированных в условиях изменения температуры среды (в нКат/мг белка) * - статистически достоверное отклонение от контроля при $p < 0,05$.

Изменение активности пероксидазы и каталазы у гастропод

Экспозиция гастропод *B. ongurensis* в условиях градиентной гипертермии приводила к статистически значимому повышению активности пероксидазы уже при температурах выше 10°C (рис. 4). Повышенная активность фермента сохранялась до конца эксперимента (25°C). Кроме того, при температуре 10°C у *B. ongurensis* отмечали кратковременное увеличение активности каталазы относительно контрольных значений.

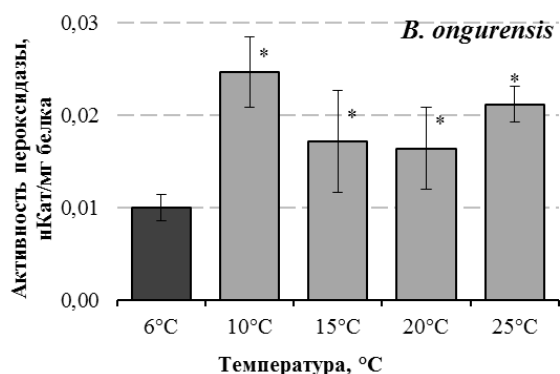


Рисунок 4 - Изменение удельной активности пероксидазы у байкальских амфипод вида *O. flavus*, экспонированных в условиях изменения температуры среды (в нКат/мг белка) * - статистически достоверное отклонение от контроля при $p < 0,05$.

Активность пероксидазы у *L. stagnalis* была стабильной и не отклонялась от контрольных показателей в диапазоне изменения температуры среды с 3°C до 25°C. Экспозиция гастропод *L. stagnalis* в условиях градиентной гипертермии приводила к увеличению активности пероксидазы относительно контрольных значений при повышении температуры среды до 30°C. Понижение температуры до 0,5°C приводило к снижению активности фермента. Кроме того, в условиях градиентной гипертермии отмечали снижение активности каталазы при температурах 10°C, 25°C и 30°C, а при экспозиции гастропод в условиях градиентной гипотермии отмечали кратковременное повышение активности каталазы при температуре 3°C.

Согласно данным корреляционного анализа между изменением активности ферментов АОС и содержанием энергетических метаболитов и активностью лактатдегидрогеназы установлено, что в условиях градиентной гипертермии у байкальских видов амфипод отмечаются общие положительные корреляции – между активностью пероксидазы и содержанием лактата ($r = 0,65–0,69$) и температурой ($r = 0,72–0,74$). У вида *E. verrucosus* активность пероксидазы и каталазы коррелировала с изменением содержания АДФ ($r = -0,93$ и $r = 0,78$ соответственно). В условиях экспозиции при градиентной гипотермии у амфипод отмечаются как общие, так и различные видоспецифические корреляции. При этом, у каталазы и пероксидазы отмечены высокие корреляции между их активностью, и изменением содержания лактата и активности лактатдегидрогеназы

Содержание БТШ70 у амфипод и гастропод при экспозиции в градиенте температур

Экспозиция амфипод в диапазоне изменения температур с 0,5°C до 9°C у *E. verrucosus* (рис. 5); с 0,5°C до 18°C у *O. flavus*; и с 0,5°C до 29°C у *G. lacustris* не приводила к отклонению содержания БТШ70 от контрольных значений. При повышении температуры общей реакцией всех исследуемых видов являлось кратковременное накопление БТШ70. Понижение температуры не вызывало изменения содержания БТШ70.

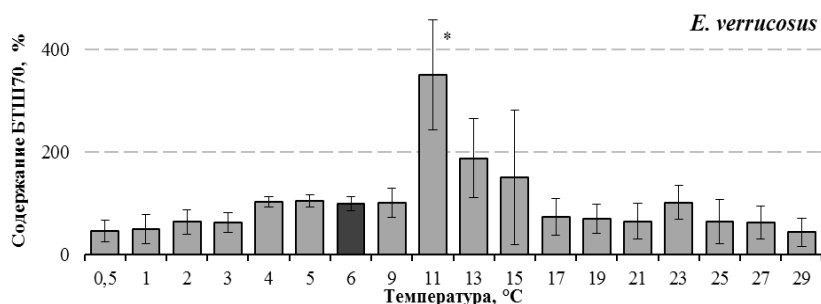


Рисунок 5 - Изменение содержания БТШ70 у байкальских амфипод *E. verrucosus*, экспонированных в условиях изменения температуры среды (в процентах, относительно контрольных значений).

* - статистически достоверное отклонение от контроля при $p < 0,05$.

У гастропод повышение температуры среды также приводило к кратковременному увеличению содержания БТШ70 у обоих исследованных видов. У *B. ongurensis* увеличение содержания БТШ70 относительно контрольных значений отмечали уже при температуре экспозиции 10°C (рис. 6).

Экспозиция гастропод *L. stagnalis* в диапазоне изменения температур с 6°C до 15°C не приводила к отклонению содержания БТШ70 от контрольных значений. Отклонение температур экспозиции от указанного диапазона *B. ongurensis* приводило к накоплению БТШ70.

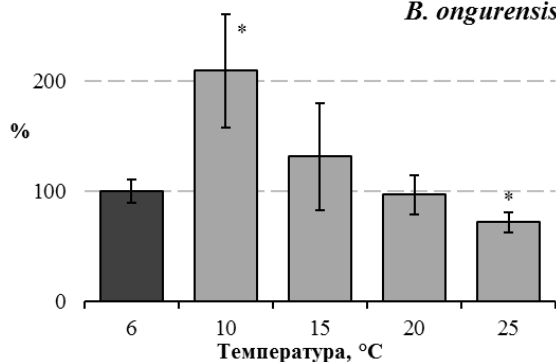


Рисунок 6 - Изменение содержания БТШ70 у байкальских гастропод *B. ongurensis*, экспонированных в условиях изменения температуры среды (в процентах, относительно контрольных значений). * - статистически достоверное отклонение от контроля при $p < 0,05$.

Общее обсуждение

Результаты проведенного исследования указывают на то, что экспозиция байкальских и палеарктических амфипод и гастропод в широком градиенте температур вызывает перестройки в энергетическом метаболизме и влияет на характер показателей неспецифического стресс-ответа. Описанные особенности исследуемых стресс-маркеров связаны с экологическими характеристиками исследованных видов, и, в частности, с их различными терморезистентными и термопреферентными характеристиками.

При оценке показателей энергетического обмена у байкальских и палеарктических амфипод и гастропод показано, что экспозиция организмов в условиях температуры среды, выходящей за пределы диапазона оптимальных значений, приводила к накоплению лактата. При этом у амфипод и гастропод различалась направленность изменений активности лактатдегидрогеназы. Так, у всех представленных в работе амфипод в ответ на повышение температуры активность лактатдегидрогеназы снижалась, а у обоих видов гастропод, напротив, увеличивалась. Понижение температуры среды вызывало рост активности лактатдегидрогеназы у термочувствительных видов амфипод *E. verrucosus* и *O. flavus* и ее снижение у палеарктических гастропод *L. stagnalis*. Данные особенности, по-видимому, связаны с увеличением энергодефицита в клетках при экспозиции в условиях не оптимальных температур.

Как показано в работе L. Jakob et al. (2013) на первых этапах отклонения температуры среды от оптимальных значений отмечается усиление потребления кислорода у байкальских и палеарктических амфипод, что свидетельствует о

физиологических перестройках и интенсификации метаболизма. Однако, при критических отклонениях температур среды у исследованных видов происходит снижение потребления кислорода и, согласно нашим материалам накопление продуктов анаэробного обмена – лактата, снижение содержания продуктов аэробного обмена - АТФ и энергии аденилатов (показано на примере амфипод видов *E. verrucosus*, *E. cyaneus*), изменение активности лактатдегидрогеназы, что может указывать на увеличении доли анаэробного метаболизма, необходимого для поддержания энергетического гомеостаза в условиях стрессового воздействия (Grieshaber et al., 1994; Chown et al., 2006; Pörtner, 2012).

На примере байкальских гастропод *B. ongurensis* показано, что при повышении температуры происходит ряд метаболических перестроек, вследствие чего энергии свободных фосфагенов становится, по-видимому, недостаточно, и байкальские гастроподы используют запасы депонированных фосфагенов, таких как аргининфосфат. Высвобождение энергии из депонированных фосфагенов может приводить не только к синтезу новых БТШ70, что было показано выше, и обеспечению их успешного функционирования, но и к обеспечению энергией ряда других метаболических путей (Grieshaber et al., 1994; Smolders et al., 2004). Снижение содержания глюкозы и гликогена при этом (в настоящем исследовании показано на примере гастропод) указывает на повышение интенсивности метаболизма и возрастающее расходование энергии в условиях температурного стресса (Portner et al., 2010). На угнетение физиологического и энергетического состояния у байкальских гастропод может указывать и увеличение содержания аланина, снижение содержания БТШ70 и лактата (на поздних сроках экспозиции), что, по-видимому, также обусловлено происходящими изменениями в метаболизме.

Одной из возможных причин накопления продуктов анаэробноа, помимо температурного стресса, может быть нарастание окислительных процессов в клетках и развитие оксидативного стресса, сопровождающегося накоплением активных форм кислорода - АФК (Fridovich, 1998; Меньщикова и др., 2006; Осипов, 1990; Kelly, 1998; Кулинский, 1999; Рогожин, 2004), на что указывают представленные выше изменения активности антиоксидантных ферментов – пероксидазы и каталазы у всех исследованных в работе видов, увеличение потребления кислорода амфиподами в условиях градиентной гипертермии (Jakob et al., 2013) и изменение содержания продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов и оснований Шиффа (Аксенов –Грибанов и др., 2012; Axenov-Gribanov et al., 2013). Экспозиция амфипод и гастропод в широком градиенте температур ведет к изменению активности ферментов АОС, что вероятно указывает на нарушение системы контроля за эндогенно-образованными АФК. Так, повышение активности пероксидазы у всех исследованных байкальских видов амфипод и гастропод, а также каталазы (у байкальских и палеарктических видов) свидетельствует в пользу активации АОС

для борьбы с процессами свободно-радикального окисления. Описанные межвидовые различия активности антиоксидантных ферментов тесно связаны с экологическими характеристиками исследованных видов, в частности, с их различными терморезистентными и термопреферентными особенностями.

В ходе оценки изменения содержания стрессовых белков у байкальских и палеарктических амфипод и гастропод показано, что экспозиция видов в широком градиенте температур ведет к увеличению содержания стрессовых белков семейства БТШ70. БТШ70 являются одними из наиболее изученных маркеров стрессовых состояний. Будучи молекулярными шаперонами, они восстанавливают нативную конформацию и функциональную активность белков (Farnsworth, Sign, 2000; Ito et al., 2003; Sokolova, 2004). Таким образом, синтез БТШ70 направлен на противодействие и (или) компенсацию негативных последствий процессов, связанных с изменением температуры среды. Накопление БТШ70 у исследованных видов при отклонении температуры среды от оптимальной направлено на защиту от стрессового воздействия. Снижение же содержания БТШ70, наблюдаемое при высоких температурах экспозиции у термочувствительного *B. ongurensis* может указывать на угнетение метаболизма, деградацию БТШ70 и возрастающий энергодефицит клеток (Geret et al., 2002; Larade et al., 2002; Sokolova, 2004).

Оценивая связь полученных данных с экологическими характеристиками видов, следует сопоставить их с ранее опубликованными материалами оценки температурного преферендума. Из приведенных в работе данных хорошо видно, что наиболее выраженные изменения показателей клеточного метаболизма у амфипод *E. verrucosus* наступают при превышении температурного порога в $9,5 \pm 0,8^\circ\text{C}$ и при снижении температуры ниже $2,6 \pm 1,3^\circ\text{C}$; у *O. flavus* - при превышении температурного порога в $8,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$ и при снижении температуры ниже $1,8 \pm 1,3^\circ\text{C}$; а у палеарктического *G. lacustris* – при температуре выше $19 \pm 5,2^\circ\text{C}$ и ниже $2,3 \pm 1,7^\circ\text{C}$. Таким образом, видно, что установленные температурные диапазоны отражают зону стабильности показателей клеточного метаболизма у видов. Следует особо отметить то, что эти зоны совпадают с ранее опубликованными данными о диапазонах предпочитаемых видами температур в условиях температурного градиента, выявленным в поведенческих экспериментах (Тимофеев, 2000; Тимофеев, Кириченко, 2004).

Близкая картина наблюдается и у гастропод. Так, у вида *B. ongurensis* наиболее выраженные изменения показателей клеточного метаболизма наступают при превышении температурного порога в 10°C , что позволяет предположить, что пик термопреферендума данного вида смещен в сторону низких положительных температур и вероятным температурным оптимумом вида является температура $3 - 11,1 \pm 1,2^\circ\text{C}$. У *L. stagnalis* выраженные изменения показателей клеточного метаболизма наступают при превышении температуры среды в $14,5 \pm 2,2^\circ\text{C}$ и при снижении температуры ниже $5,3 \pm 1,2^\circ\text{C}$.

Таблица 1 – Направление изменения активности/содержания некоторых исследуемых стресс-маркеров у амфипод и гастропод при экспозиции в широком градиенте температур

Стресс-маркер	Температура, °С																		
	0,5	1	2	3	4	5	6	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Лактат																			
<i>O. flavus</i>	▲	▲	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. verrucosus</i>	▲	▲	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>G. lacustris</i>	▼	▼	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Активность лактатдегидрогеназы																			
<i>O. flavus</i>	—	▲	▲	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. verrucosus</i>	—	—	▲	▲	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>G. lacustris</i>	▼	▼	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
БТШ 70																			
<i>O. flavus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. verrucosus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>G. lacustris</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

	Температура, °С							
	0,5	3	6	10	15	20	25	30
Лактат								
<i>B. ongurensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>L. stagnalis</i>	▲	—	—	—	—	—	—	—
Активность лактатдегидрогеназы								
<i>B. ongurensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>L. stagnalis</i>	▼	—	—	—	—	—	—	—
БТШ 70								
<i>B. ongurensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>L. stagnalis</i>	▲	▲	—	—	—	—	—	—

- К Контрольный уровень, начало эксперимента
- ▲ Повышение содержания/активности показателя
- ▼ Снижение содержания/активности показателя
- Отсутствие реакции
- Реакция неизвестна
- Гибель организмов
- Известная зона термопреференции (для амфипод)
- Предполагаемая зона термопреференции (для гастропод)

Как следует из представленных выше данных, у палеарктических видов *G. lacustris* и *L. stagnalis* активация стрессового ответа и накопление продуктов анаэробного метаболизма происходят при больших отклонениях температуры среды от оптимальных значений, чем у байкальских видов. Различия в экологии байкальских и палеарктических организмов обусловлены терморезистентными особенностями видов, их термопреферентными предпочтениями и другими экологическими и физиологическими характеристиками (Тимофеев, 2010).

ВЫВОДЫ

- У исследованных байкальских и палеарктических амфипод и гастропод, различающихся по своим терморезистентным и термопреферентным характеристикам, в пределах определенного температурного диапазона остаются стабильными уровни содержания лактата, БТШ70, энергетических метаболитов, активности ферментов пероксидазы, каталазы, лактатдегидрогеназы. Указанные температурные диапазоны видоспецифичны: у *E. verrucosus* с $2,6 \pm 1,3^\circ\text{C}$ до $9,5 \pm 0,8^\circ\text{C}$, у *O. flavus* с $1,8 \pm 1,3^\circ\text{C}$ до $8,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$, у *G. lacustris* с $2,3 \pm 1,7^\circ\text{C}$ до $19 \pm 5,2^\circ\text{C}$, у *B. ongurensis* с 3°C до $11,1 \pm 1,2^\circ\text{C}$ и у *L. stagnalis* с $5,3 \pm 1,2^\circ\text{C}$ до $14,5 \pm 2,2^\circ\text{C}$. Температурные границы зоны метаболической стабильности связаны с термопреферентными предпочтениями видов и отражают их экологические характеристики.

2. Экспозиция исследованных байкальских и палеарктических амфипод и гастропод в условиях градиентной гипертермии вела к накоплению продуктов анаэробного обмена у всех видов. На примере байкальских амфипод установлено, что накопление продуктов анаэробноза сопровождалось снижением продуктов аэробного обмена (в том числе АТФ). Накопление лактата сопровождалось видоспецифичным изменением активности лактатдегидрогеназы – ее снижением у амфипод и, напротив, увеличением у гастропод. Установлено, что активность лактатдегидрогеназы отрицательно коррелировала с динамикой изменения содержания лактата у амфипод в условиях градиентной гипертермии и положительно коррелировала с увеличением клеточного энергодифицита.
3. Отклонения температуры среды от оптимальных значений ведут к видоспецифичным изменениям активности ферментов АОС у всех видов. Исключение составляет палеарктический *G. lacustris*, показатели активности каталазы которого остаются стабильными в пределах всего оцениваемого температурного диапазона. Определены множественные видоспецифичные корреляции ферментов АОС с показателями энергетического обмена.
4. Отклонение температуры среды от оптимальных значений ведет к видоспецифичному накоплению стрессовых белков БТШ70 у всех исследуемых видов байкальских и палеарктических амфипод и гастропод. Показано, что увеличение содержания БТШ70 у термочувствительных байкальских видов происходит раньше и при меньших отклонениях температуры среды от оптимальных значений, чем у термоустойчивых палеарктических видов.
5. У термоустойчивых палеарктических организмов активация стрессового ответа и изменения в энергетическом метаболизме происходят при больших отклонениях температуры среды от оптимальных значений, чем у байкальских термочувствительных видов. Различия в экологии байкальских и палеарктических организмов обусловлены терморезистентными особенностями видов, их термопреферентными предпочтениями и другими экологическими и физиологическими характеристиками.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Axenov–Gribanov D.V.** A cellular and metabolic assessment of the thermal stress responses in the endemic gastropod *Benedictia limnaeoides ongurensis* from Lake Baikal /**D.V. Axenov–Gribanov**, D.S. Bedulina, Z.M. Shatilina, Y.A. Lubyaga, K.P. Vereshchagina, M. A. Timofeyev // The comparative biochemistry and physiology Part B. – 2013. DOI 10.1016/j.cbpb.2013.09.006.
2. Bedulina D.S. Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal /Bedulina D. S, Evgen'ev M. B., Timofeyev M. A, Protopopova M. V., Garbuz D. D., Pavlichenko V. V., Luckenbach T., Shatilina Zh. M., **Axenov–Gribanov D. V.**, Gurkov A. N., Sokolova I. M., Zatsepina O. G.// Molecular ecology, 2013. – Vol. 22. –p.1416–1430.
3. Верещагина К.П. Активность ферментов антиоксидантной защиты и анаэробного гликолиза в условиях температурного градиента у палеарктического *Lymnaea stagnalis* / К.П. Верещагина, Ю.А. Лубяга, А.Н. Гурков, Е.П. Щапова, Е.В. Мадьярова, Е.М. Кондратьева, А.П. Голубев, М.А. Тимофеев, **Д.В. Аксенов – Грибанов** // Журнал стресс–физиологии и биохимии. – 2013. – № 4. – С. 339 – 344.
4. **Аксенов – Грибанов Д.В.** Определение температурного оптимума эндемичного байкальского вида амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) по изменениям показателей клеточного метаболизма / **Д.В. Аксенов – Грибанов**, Ю.А. Лубяга, Н.С. Шаханова, А.Н.Гурков, Д.С. Бедулина, Ж.М. Шатилина, Е.М. Кондратьева, К.П. Верещагина, М.А. Тимофеев // Журнал стресс физиологии и биохимии. – 2012. – 4. –pp. 289–301.
5. **Аксенов – Грибанов Д.В.** Влияние повышенной температуры окружающей среды на активность ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза у эндемичных байкальских видов амфипод *Eulimnogammarus marituji*, *E. taackii* и *Gmelinoides fasciatus* / **Д.В. Аксенов – Грибанов**, Ю.А. Лубяга // Журнал стресс физиологии и биохимии. – 2012. – №. 8. – №4. –с.322–329.
6. **Аксенов – Грибанов Д.В.** Температурно – зависимые изменения показателей перекисного окисления липидов у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод и гастропод / **Д.В. Аксенов – Грибанов**, Ж.М. Шатилина, Ю.А. Лубяга, К.П. Верещагина, Д.С. Бедулина, Н.С. Шаханова, А.Н. Гурков, М.В. Протопопова, В.В. Павличенко, М.А. Тимофеев // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. –2012. – Т.5. –№ 4. – с.10–17.

7. **Axenov–Gribanov D.V.** Optical diagnostic test of stress conditions of aquatic organisms / **D.V.Axenov–Gribanov**, A.N.Gurkov, N.S.Shakhtanova, D.S.Bedulina, M.A.Timofeev, I.Meglinski // Journal of Biophotonics (Wiley–VCH Verlag). –2011. – №9. – p.619–626.
8. Shatilina Zh. M. The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) in the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats. / Zh.M. Shatilina, W.H. Riss, M.V. Protopopova, T. Mareike, E.I. Meyer, V.V. Pavlichenko, D.S. Bedulina, **D.V. Axenov–Gribanov**, M.A. Timofeyev //Journal of Thermal Biology. – 2011. – Vol.36. – p. 142–149.

Прочие издания

9. **Axenov–Gribanov D.V.** Determination of Lake Baikal endemic amphipods thermal optima limits by changes in their metabolic markers /**D.V. Axenov–Gribanov**, M.A. Timofeyev//Book of Abstracts of the 15th International Colloquium on Amphipoda, 2–7 September 2013, Szczawnica, Poland. –p.12.
10. **Аксенов – Грибанов Д.В.** Сравнительное исследование влияния повышения температуры среды на активность механизмов терморезистентности и состояние энергетического метаболизма у байкальских и палеарктических гастропод / **Д.В. Аксенов – Грибанов**, Н.С. Шаханова, К.П. Верещагина, Е.П. Щапова, Ю.А. Лубяга // Материалы VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых–биологов. Иркутск, 19–28 августа 2013. –с.129–131.
11. **Axenov–Gribanov D. V.** The bioenergetic and physiologic stress–adaptation mechanisms in Lake Baikal endemic gastropods *B. ongurensis* in focus of global environmental changes// “Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten des “Michail Lomonosov”–Programms 2012/13, Moskau, 26–27. April 2013», Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD).– 2013 . P. 135–142
12. Jakob L. Lake Baikal’s endemic amphipods fauna threatened by Climate Change, Pollutants and Invaders? /L. Jakob, **D. Axenov–Gribanov**, T. Luckenbach, M. Protopopova, A. Gurkov, D. Bedulina, V. Pavlichenko, N. Shahtanova, M. Timofeyev, M. Lucassen, H.O. Pörtner, F.J. Sartoris// The international symposium 17th Pollutant responses in marine organisms (PRIMO) – Faro, Portugal –5–8 May, 2013. – p.12–15
13. Бедулина Д.С. Молекулярные механизмы экспрессии и синтеза БТШ70 у двух видов байкальских амфипод, отличающихся по уровню термотолерантности /Д.С. Бедулина, О.Г. Зацепина, М.В. Протопопова, В.В. Павличенко, Д.Г. Гарбуз, Ж.М. Шатилина, **Д.В. Аксенов – Грибанов**, А.Н. Гурков, К.П. Верещагина, Е.М. Кондратьева, М.А. Тимофеев, М.Б. Евгеньев // Материалы Всероссийской конференции «Физиологические, биохимические и молекулярно–генетические

- механизмы адаптаций гидробионтов», Институт биологии внутренних вод имени Папанина РАН (г.Борок, 22–27 сентября 2012г). 2012. – с. 39–43.
14. Timofeyev M.A. Evolution of thermal resistance mechanisms in Lake Baikal endemic amphipods along the gradient of environmental change/ M.A. Timofeyev, V.V. Pavlichenko, M.V. Protopopova, **D.V. Axenov–Gribanov**, D.S. Bedulina, A.N. Gurkov, Z.M. Shatilina // 4th International symposium on the environmental physiology of ectotherms and plants (Rennes, July 18 – 22, 2011). – 2011. – P. 73.
 15. Gurkov A.N. Eco–Photonics: Application of optical diagnostic modalities for non–invasive monitoring and evaluation of stress conditions of aquatic organisms / A.N. Gurkov, **D.V. Axenov–Gribanov**, V.V. Pavlichenko, N.S. Shakhtanova, D.S. Bedulina, M.A. Timofeyev, V. Kalchenko, I. Meglinski//: Saratov Fall Meeting 2011: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIII, Edited by V.V. Tuchin, E.A. Genina, I. Meglinski, Proc. SPIE, Vol.8337, 83370K (2012)