

ПАВЛИЧЕНКО Василий Валерьевич

СТРЕСС-РЕАКЦИИ ПРЕСНОВОДНЫХ АМФИПОД В УСЛОВИЯХ ГИПЕРТЕРМИИ И ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКАМИ

03.02.08 - «Экология (биологические науки)»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

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: кандидат биологических наук

Березина Надежда Александровна

Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург

доктор биологических наук

Боровский Геннадий Борисович

Сибирский институт физиологии и биохимии

растений РАН, г. Иркутск

Ведущая организация: Институт биофизики Сибирского отделения

Российской Академии наук, Красноярск

Защита диссертации состоится «12» апреля 2012 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М.М. Кожова (ауд. 219).

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

Автореферат разослан «____» февраля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета кандидат биологических наук, доцент

А. А. Приставка

Актуальность проблемы. Загрязнение окружающей среды собой наиболее ксенобиотиками представляет распространенный вид антропогенного воздействия на пресноводные водоемы (Laws, 2000; Gladyshev et al., 2001; Chuiko, 2007). Глобальные климатические изменения являются еще одним источником опасности для водных экосистем (Kerr, 2005; Camargo et al., 2006). Накопление токсических веществ в среде обитания крайне негативно влияет на гидробионтов, а изменение температурного режима водоема может увеличивать растворимость и доступность для попадания в организм поступающих в водоем токсических компонентов. На фоне климатических изменений, последствия антропогенных загрязнений могут особенно сильно отразиться на существовании сообществ древних пресноводных озер, которые в основном представлены узкоадаптированными видами-эндемиками (Brooks et al., 2006; Forest et al., 2007). Примером такой уникальной древней экосистемы является озеро Байкал. Одной из ключевых фаунистических групп озера является группа байкальских амфипод, эволюционное развитие которой длительное время происходило в стабильных и изолированных условиях, что могло привести к развитию специфических механизмов стресс-резистентности (Тимофеев, 2010). Недостаточное понимание специфики развития стрессреакции байкальских гидробионтов затрудняет оценку и прогнозирование последствий антропогенного воздействия на экосистему озера. В связи с этим проблема изучения специфики резистентных особенностей байкальских эндемиков привлекает внимание как непосредственно исследователей озера (Тимофеев и др., 2004-2010; Бандолина и др., 2005; Werner et al., 2007), так и ученых изучающих байкальских амфипод, интродуцированных в европейские водоемы России (Вербицкий, Березина, 2009). В то же время, по мнению М.А. Тимофеева (2010), работ, направленных на изучение функциональной активности отдельных белков, ферментов и метаболитов, недостаточно для особенностей функционирования полного понимания стресс-систем байкальских эндемиков и их отличий от палеарктических видов. Для этого требуется проведение комплексных исследований, включающих в себя как элементы классической экологии и гидробиологии, так и физиологические и молекулярно-биологические подходы.

Цель исследования. Целью исследования являлось изучение особенностей активации неспецифических механизмов стресс-реакции (фермента биотрансформации глутатион S-трансферазы, белков теплового шока семейства БТШ70 и мембранного белка переносчика P-гликопротеина) у пресноводных амфипод в условиях гипертермии и при интоксикации ксенобиотиками.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Провести оценку влияния ксенобиотиков и гипертермии на изменение функциональной активности мембранного белка-переносчика Р-гликопротеина у пресноводных амфипод;
- 2. Провести оценку влияния ксенобиотиков и гипертермии на активность фермента глутатион S-трансферазы у пресноводных амфипод;
- 3. Провести оценку влияния ксенобиотиков и гипертермии на уровень синтеза стрессовых белков семейства БТШ70 у пресноводных амфипод;
- 4. Провести оценку влияния ксенобиотиков и гипертермии на активность экспрессии генов белков семейства БТШ70 и мембранного белка-переносчика Р-гликопротеина у пресноводных амфипод.

Научная новизна.

Впервые определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки Р-гликопротеин (P-gp), БТШ70 и актин у байкальских и палеарктических амфипод, получены данные об особенностях экспрессии генов бтш70 и Р-др у байкальских и палеарктических амфипод в условиях воздействия ксенобиотиков и гипертермии. Впервые была установлена генов бтш70 зависимость между уровнем активности токсикорезистентными возможностями изученных видов. Получены новые данные об изменении активности фермента глутатион S-трансфераза у палеарктического вида амфипод G. lacustris в условиях воздействия ксенобиотиков и гипертермии. Установлено, что экспонирование амфипод в условиях интоксикации ксенобиотиками ведет к снижению функциональной активности мембранных белков переносчиков. Впервые для водных организмов установлено, повышенная температура увеличивает активность мембранных белков-переносчиков.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты диссертационной работы расширяют уже имеющиеся представления о механизмах адаптации гидробионтов и вносят значительный вклад в развитие представлений о взаимоотношениях организма и среды. Полученные данные представляют особый интерес для понимания вопросов экологии и эволюции амфипод и байкальской фауны в целом.

Результаты работы могут найти применение при прогнозировании влияния глобальных климатических изменений и промышленных загрязнений на состояние водных экосистем, при разработке комплексной системы экологического мониторинга оз. Байкал и проведении мероприятий по охране и рациональному использованию природных ресурсов Байкальского региона, а так же при разработке экологически обоснованных норм воздействия хозяйственной деятельности человека на живую природу.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1. При экспонировании эндемичных байкальских и палеарктических амфипод в растворах ксенобиотиков (тяжелых металлов, гуминовых веществ) и в условиях гипертермии у рачков происходят изменения в функционировании механизма множественной резистентности к ксенобиотикам, что сопровождается изменениями активности фермента глутатион S-трансферазы и экспрессии гена мембранного белка-переносчика P-гликопротеина, а также нарушениями выводящей активности P-гликопротеина;
- 2. При экспонировании эндемичных байкальских и палеарктических амфипод в растворах ксенобиотиков и в условиях гипертермии у рачков происходит изменение экспрессии стрессовых белков семейства БТШ70, проявляющиеся как на этапе транскрипции, так и на трансляционном уровне;
- 3. Характер стресс-реакции в условиях воздействия ксенобиотиков и повышенной температуры у амфипод разных видов зависит от их токсико- и терморезистентных способностей и согласуется с сравнительными межвидовыми рядами устойчивости амфипод к исследуемым воздействиям.

Апробация работы. Об основных результатах работы докладывалось на конференциях: Международная конференция следующих «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2» (Борок, 2007); I Международная школы-конференция «Актуальные вопросы изучения микро-, мейо-зообентоса и фауны зарослей пресноводных водоемов» (Борок, 2007 г.); III Всероссийская конференция по водной токсикологии, посвященная памяти Б.А. Флерова (Борок, 2008); 5-ая международная Верещагинская байкальская конференция (Иркутск, 2010); 4-ая Международная научная конференция, посвящённая памяти профессора Г.Г. Винберга (Санкт-2010); II Всероссийская научно-практическая Петербург, конференция «Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле» (Листвянка, 2011); Международная конференция «New frontiers in Monitoring European Biodiversity» (Палермо, Италия, 2011); 4-ый международный симпозиум «Environmental physiology of ectotherms and plants» (Ренн, Франция, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано **49** печатных работ. Из них: статей в журналах, рекомендованных ВАК - **10** (в зарубежных журналах системы Web of Science - **5**; в российских изданиях - **5**); в других изданиях - **11**; тезисов конференций - **28**.

Гранты.

Выполнение работы поддержано рядом грантовых проектов, выполненных под руководством Павличенко В.В., в том числе: ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», проект НК-366П/14 и ГК № 14.740.11.0502; АВЦП «РНП ВШ (2009-2010 гг.)», проекты 2.1.1/8106 и

2.2.2.3/15040; Грантом DAAD; Грантом поддержки НИР аспирантов и молодых сотрудников ИГУ, № темы 111-09-003/A7.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 164 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, содержащей цель и задач исследования, методической и экспериментальной частей, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа включает 39 рисунков и 7 таблиц. Список литературы состоит из 350 источников, из них 123 —на русском и - 227 на английском языке.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлены сведения о принципах адаптации гидробионтов к стрессовым факторам, влиянии ксенобиотиков и температуры на гидробионтов, приведен обзор ключевых механизмов клеточной стресс-резистентности, представлена информация о фауне озера Байкал и обоснование правомерности выбора объекта исследования.

2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы амфиподы из двух фаунистических групп: байкальские эндемичные виды: *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstfeld, 1858), *E. vittatus* (Dybowsky, 1874), *E. cyaneus* (Dybowsky, 1874) и палеарктический вид: *Gammarus lacustris* (Sars, 1863).

Известно, что для E. vittatus $LC_{50}/24$ часа при интоксикации хлоридом кадмия составляет $5,5\cdot10^{-5}$ моль/л, для E. verrucosus - $1,8\cdot10^{-5}$ моль/л, для E. cyaneus - $1,2\cdot10^{-5}$ моль/л, для палеарктического G. lacustris - $4,5\cdot10^{-5}$ моль/л (Тимофеев, 2010). Таким образом по степени токсикоустойчивости к хлориду кадмия виды располагаются в следующем порядке: E. $cyaneus \le E$. verrucosus < G. lacustris < E. vittatus. Показатели отношения к температуре исследуемых видов были ранее приведены в статье M. А. Тимофеева и K. А. Кириченко (2004), в которой был предложен сравнительный ряд повышения термоустойчивости видов: E. verrucosus < E. vittatus < E. vittatus < G. vittatus < G.

Материал был собран в 2006–2011 гг. Сбор амфипод проводили на глубинах 0,5-1 м с помощью гидробиологического сачка. Байкальских амфипод отлавливали в прибрежной зоне озера Байкал в пос. Большие Коты (Южный Байкал). *G. lacustris* отлавливали в озере в районе пос. Большие Коты на расстоянии 1 км от побережья оз. Байкал. Амфипод содержали раздельно по видам в аэрируемых аквариумах при температуре 6–8°С. В экспериментах использовали здоровых и активно плавающих рачков, предварительно акклимированных не менее 3 суток в байкальской воде. В качестве корма использовали коммерческий препарат "Tetra-Min". Амфипод контрольной группы для всех видов экспериментов содержали в условиях аналогичных

предварительной акклимации (6-8°C). Эксперименты проводили в аэрируемых аквариумах: в условиях гипертермии (25°C); в растворах хлорида кадмия с концентрацией 5 мг/л; в растворах низкомолекулярного синтетического гумсодержащего препарата HS1500 с концентрацией, соответствующей 10 мг/л общего растворенного углерода (РОУ). В работе применяли метод оценки выводящей активности мембранных белков транспортеров по уровню накопления/выведения препарата родамина С - модельного субстрата для изучения активности мембранного белка-переносчика Р-гликопротеина (Smital, Kurelec, 1998). В экспериментах по оценке интенсивности выведения родамина С преакклимированных рачков в течение 3-х часов экспонировали в среде с родамином С (1 µмоль/л), после чего у части рачков определяли уровень накопленного родамина С (принимаемого за 100%), а других рачков помещали в условиях эксперимента. Степень выведения родамина С, активность глутатион S-транферазы, содержание БТШ70 и активность генов *бтш70* и *P-gp* измеряли после 1, 6, 24 часов экспозиции. После экспериментов рачков фиксировали: в жидком азоте для определения активности фермента и содержания БТШ70; в препарате Trizol для молекулярно-генетических анализов; высушивали при 37°C для измерения содержания родамина С.

Молекулярно-биохимические методы анализа. Содержание родамина С определяли с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5000 при λ=590 нм. Активность глутатион S-трансферазы определяли согласно (Habig, 1974) с модификациями (Timofeyev et al., 2009), используя в качестве субстратов глутатион и 1-хлор-2,4-динитробензен (CDNB) при $\lambda = 340$ нм, T = 25°C и рH = 6,5. Концентрацию общего белка в пробах измеряли по методу Бредфорд (1976) или методу Лоури (1951). Оценку содержания БТШ70 проводили с помощью стандартного метода денатурирующего электрофореза (Laemmli, 1970) и последующего Вестерн-блоттинга (Bers, Garfin, 1985) с моноклональными антителами к БТШ70 и β-актину (Н9776 и A2668, Sigma). Реакцию ПЦР В ПЦР-амплификаторе Tgradient (Biometra, осуществляли использованием набора для ПЦР GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA) согласно протоколу фирмы-производителя. Секвенирование осуществляли на приборе 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) согласно инструкции фирмы-производителя. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью Sequencher 4.8 и on-line сервисов BLAST и ExPASy. Реакцию кПЦР осуществляли в амплификаторе MyiQ (BIORAD, Germany) с использованием набора для кПЦР с флуоресцентным красителем EvaGreen (Jena Bioscience, Germany) согласно протоколу производителя с авторскими дополнениями.

<u>Расчет и статистическая обработка данных</u>. Все эксперименты проведены не менее чем в 5-ти повторностях в 3-х параллельных группах в

каждом эксперименте. Биохимические измерения проводили не менее чем в 3-х повторностях из каждой пробы. Нормализацию относительной экспрессии БТШ70 проводили относительно экспресиии В-актина с использованием специализированной программы GelExplorer. Расчет относительной экспрессии генов 6mm70 и P-gp рассчитывали при помощи стандартного метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Для статистической обработки данных пользовались общепринятыми методами: рассчитывали средние арифметические величины и доверительный интервал. Проверку нормальности распределения осуществляли при помощи критерия Шапиро-Уилка. Оценку достоверности производили с использованием двухвыборочного t-теста Стьюдента. Для проверки статистических гипотез при использовании множественных сравнений также использовали критерий Бонферрони. Статистический анализ проводили с использованием программ Biostat 3.03 и Statistica 5.0. На диаграммах указаны доверительные интервалы. * - обозначены случаи достоверного отличия значений от контрольного при доверительной вероятности – 0,95.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение выводящей активности Р-гликопротеина у амфипод, экспонированных при температуре 25°C

Экспозиция амфипод E. verrucosus и E. cyaneus при температуре 25°C приводила к достоверному увеличению интенсивности выведения родамина C относительно контроля (Рисунок 1).

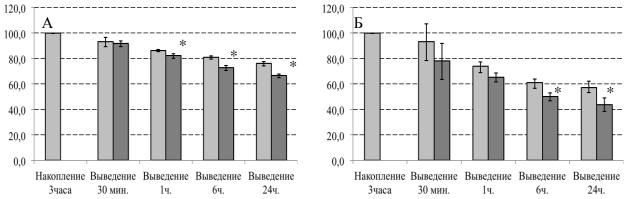
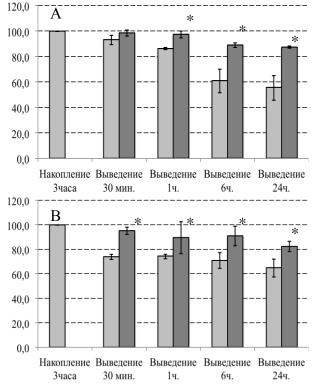


Рисунок 1 - Интенсивность выведения родамина С из тканей *E. verrucosus* (A) и *E. cyaneus* (Б) при 25°С (в % от первоначального уровня), светлые колонки - контроль, темные колонки - экспозиция * - статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

У палеарктического *G. lacustris* достоверных изменений в выводящей активности Р-гликопротеина в условиях гипертермии отмечено не было.

Изменение выводящей активности Р-гликопротеина у амфипод, экспонированных в растворах CdCl₂

У всех исследованных видов амфипод, экспонированных в растворах хлорида кадмия, интенсивность выведения родамина С была существенно ниже контрольного уровня (Рисунок 2).



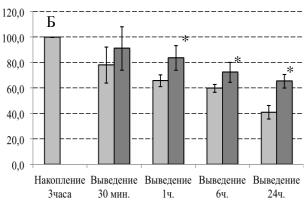
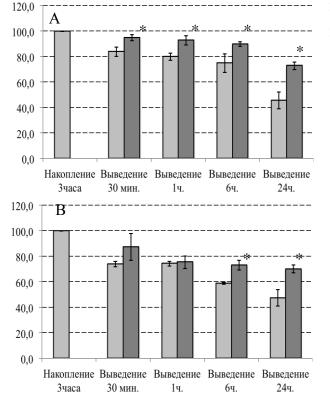


Рисунок 2 - Интенсивность выведения родамина С из тканей E. verrucosus (A), E. cyaneus (Б) и G. lacustris (В) в растворе $CdCl_2$ (5 мг/л) (в % от первоначального уровня), светлые колонки - контроль, темные колонки - экспозиция

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

Изменение выводящей активности Р-гликопротеина у амфипод, экспонированных в растворах HS1500

Результаты исследования показали, что экспозиция рачков в растворе HS1500 вела к снижению интенсивности выведения родамина С у всех исследованных видов амфипод (Рисунок 3).



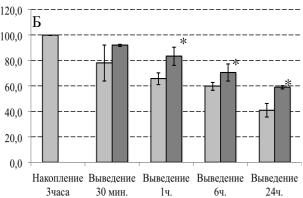


Рисунок 3 - Интенсивность выведения родамина С из тканей E. verrucosus (A), E. cyaneus (Б) и G. lacustris (В) в растворе HS1500 (10 мг/л POY) (в % от первоначального уровня), светлые колонки - контроль, темные колонки - экспозиция

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

Изменение активности глутатион S-трансферазы у амфипод вида G. *lacustris* в условиях воздействия стрессовых факторов

У *G. lacustris*, экспонированных в растворах хлорида кадмия, было отмечено достоверное увеличение активности глутатион S-трансферазы уже через 1 час эксперимента (Рисунок 4), максимум которого отмечали к концу 24 часового эксперимента. Экспозиция *G. lacustris* в растворах HS1500 также как и при температуре 25°C не вызвала статистически достоверных изменений активности глутатион S-трансферазы.

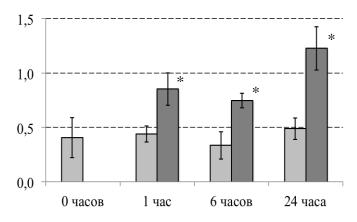


Рисунок 4 - Изменение активности фермента глутатион S-трансфераза у G. lacustris в растворе $CdCl_2$ (5 мг/л) (нКат/мг белка), светлые колонки – контроль, темные колонки - экспозиция

Изменение содержания белков теплового шока семейства БТШ70 у амфипод, экспонированных при температуре 25°C

У термочувствительных *E. verrucosus* и *E. vittatus* уже через 1 час экспозиции при температуре 25°C отмечали повышение содержания БТШ70 с достижением максимального уровня к концу эксперимента (24 часа) (Рисунок 5). У *E. cyaneus* уровень БТШ70 достоверно увеличивался после 6 часов экспозиции при температуре 25°C и к концу эксперимента превышал контрольное значение почти в 3 раза (Рисунок 6).

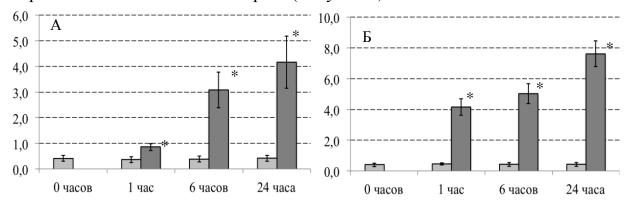


Рисунок 5 - Результаты полуколичественного анализа содержания БТШ70 у *E. verrucosus* (A) и *E. vittatus* (Б) при 25°C (в условных единицах), светлые колонки – контроль, темные колонки - экспозиция

^{* -} статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

^{* -} статистически достоверное отклонение от контроля при р<0,05.

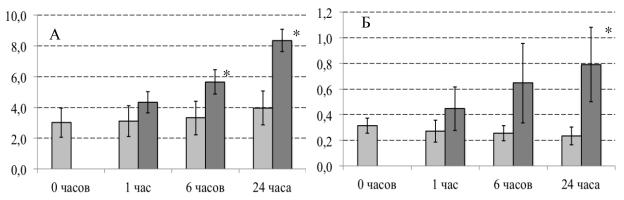


Рисунок 6 - Результаты полуколичественного анализа содержания БТШ70 у *E. cyaneus* (A) и *G. lacustris* (Б) при 25°C (в условных единицах), светлые колонки – контроль, темные колонки - экспозиция;

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

У палеарктического вида *G. lacustris* температура 25°C вызывала достоверное увеличение уровня БТШ70 только к концу эксперимента (24 часа) (Рисунок 6).

Изменение содержания белков теплового шока семейства БТШ70 у амфипод, экспонированных в растворах CdCl₂

Из представленных данных видно, что экспозиция рачков *E. verrucosus* в растворе хлорида кадмия вела к росту содержания БТШ70 лишь к концу эксперимента (24 часа) (Рисунок 7).

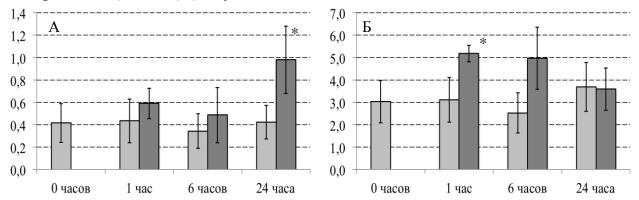


Рисунок 7 - Результаты полуколичественного анализа БТШ70 у $E.\ verrucosus\ (A)\ u\ E.\ cyaneus\ (B)\ в растворе CdCl_2\ (5\ мг/л)\ (в условных единицах),$ светлые колонки — контроль, темные колонки — экспозиция<math>* - статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

У байкальского *E. cyaneus* выявлен другой характер реакции на воздействие токсиканта. В данном случае увеличение уровня содержания БТШ70 происходило уже после 1 часа эксперимента (Рисунок 7). Дальнейшая экспозиция приводила к постепенному снижению уровня БТШ70 до контрольного уровня в плоть до конца эксперимента.

У палеарктического G. lacustris, также как и у байкальского E. vittatus не наблюдали достоверных изменений в уровне БТШ70 при экспозиции в растворе хлорида кадмия.

Изменение содержания белков теплового шока семейства БТШ70 у амфипод, экспонированных в растворах HS1500

Результаты исследования показали, что экспозиция рачков в растворе HS1500 не вызвала достоверных изменений в содержании БТШ70 у всех байкальских амфипод на протяжении всего эксперимента и, напротив, вела к увеличению содержания БТШ70 у палеарктического *G. lacustris* (Рисунок 8).

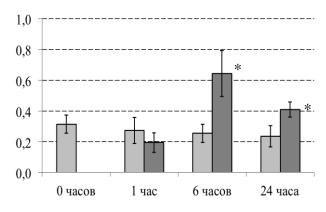


Рисунок 8 - Результаты полуколичественного анализа БТШ70 у *G. lacustris* в растворе HS1500 (10 мг/л POV) (в условных единицах), светлые колонки - контроль, темные колонки - экспозиция

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

Изменение экспрессии генов *бтил* у амфипод, экспонированных при температуре 25°C

Результаты показали, что у амфипод E. verrucosus и E. vittatus после 1 часа экспозиции происходило достоверное увеличение экспрессии генов 6mu70. У E. verrucosus уровень экспрессии возвращался к контрольному значению только после суток эксперимента, а у E. vittatus уровень экспрессии продолжал постепенно увеличиваться до конца эксперимента (24 часа) (Рисунок 9).

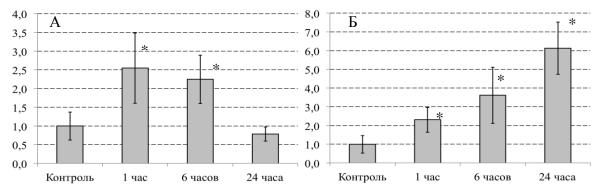


Рисунок 9 - Относительная экспрессия генов *бтш70* у *E. verrucosus* (A) и *E. vittatus* (Б), экспонированных при температуре 25°C (в условных единицах экспрессии) * - статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

У амфипод *E. cyaneus* в отличие от двух предыдущих байкальских видов достоверное увеличение экспрессии генов *бтш70* происходило только после 6 часов экспозиции, достигая максимального уровня к концу эксперимента (24 часа) (Рисунок 10). Достоверное увеличение экспрессии генов *бтш70* у *G. lacustris* наблюдали только к концу эксперимента (24 часа) (Рисунок 10).

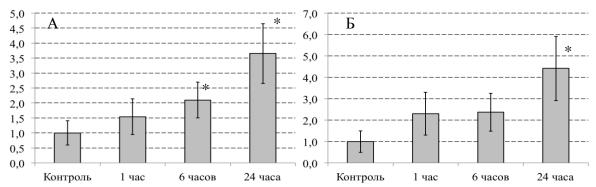


Рисунок 10 - Относительная экспрессия генов *бтш70* у *E. cyaneus* (A) и *G. lacustris* (Б), экспонированных при температуре 25°C (в условных единицах экспрессии) * - статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

Изменение экспрессии генов *бтш70* у амфипод, экспонированных в растворах CdCl₂

Экспозиция амфипод вида E. verrucosus в растворах $CdCl_2$ вела к резкому 4-х кратному повышению уровня экспрессии генов $\delta mu70$ к 24 часам эксперимента (Рисунок 11). У байкальского E. vittatus также отмечали повышение уровня экспрессии генов $\delta mu70$ к 24 часам эксперимента, однако уровень экспрессии возрастал лишь в 2 раза от контроля (Рисунок 11). У амфипод E. cyaneus достоверное увеличение уровня экспрессии генов $\delta mu70$ наблюдали уже после 1 часа экспозиции в растворах хлорида кадмия (Рисунок 12). К 24 часам эксперимента уровень экспрессии генов $\delta mu70$ у E. cyaneus уже десятикратно превышал контрольное значение.

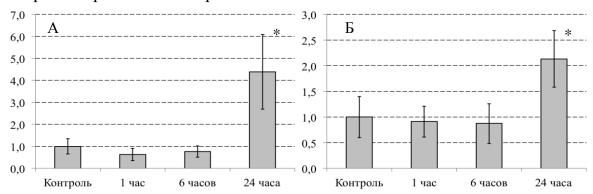


Рисунок 11 - Относительная экспрессия генов *бтш70* у *E. verrucosus* (A) и *E. vittatus* (Б), экспонированных в растворах $CdCl_2$ (5 мг/л) (в условных единицах экспрессии).

• - статистически достоверное отклонение от контроля при р<0,05.

У палеарктического *G. lacustris* достоверное увеличение уровня экспрессии гена *бтш70* отмечали к 6 часам экспозиции в растворе хлорида кадмия (Рисунок 12). Уровень экспрессии оставался выше контрольного значения до конца эксперимента.

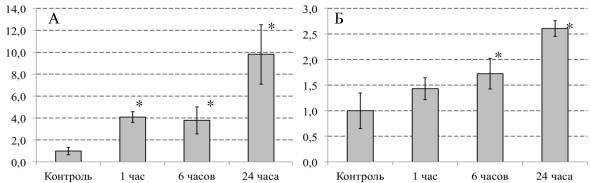


Рисунок 12 - Относительная экспрессия генов *бтш70* у *E. cyaneus* (A) и *G. lacustris* (Б), экспонированных в растворах $CdCl_2$ (5 мг/л) (в условных единицах экспрессии). * - статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

Изменение экспрессии генов *бтш70* у амфипод, экспонированных в растворах HS1500

Как видно из представленных материалов, уже к первому часу экспозиции уровень экспрессии генов *бтии70* у *E. verrucosus* достоверно снижался вдвое и оставался на данном уровне до конца эксперимента (Рисунок 13). Экспозиция байкальского *E. vittatus* в растворах HS1500 приводила к статистически достоверному снижению активности генов *бтии70* относительно контроля после 24 часов экспозиции (Рисунок 13).

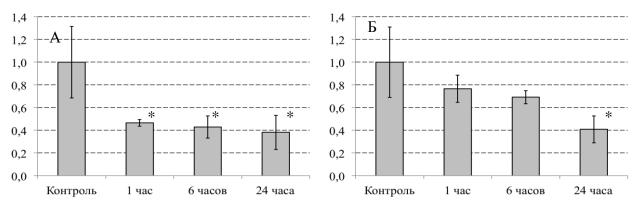


Рисунок 13 - Относительная экспрессия генов *бтш70* у *E. verrucosus* (A) и *E. vittatus* (Б), экспонированных в растворах HS1500 (10 мг/л РОУ) (в условных единицах экспрессии) * - статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

Статистически достоверное снижение уровня экспрессии генов *бтш70* у *E. cyaneus* детектировали к 6 часам эксперимента с последующим снижением к концу эксперимента (Рисунок 14).

В отличие от байкальских амфипод, экспозиция G. lacustris в растворах HS1500 вызывала достоверное увеличение уровня экспрессии гена 6mm70 к 24 часам экспозиции (Рисунок 14).

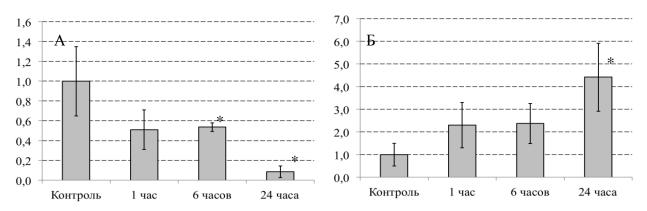


Рисунок 14 - Относительная экспрессия генов *бтш70* у *E. cyaneus* (A) и *G. lacustris* (Б), экспонированных в растворах HS1500 (10 мг/л РОУ) (в условных единицах экспрессии) * - статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

Изменение экспрессии гена *P-gp* у палеарктического *G. lacustris* в условиях воздействия стрессовых факторов

У *G. lacustris* экспонированных при температуре 25°C и в растворах хлорида кадмия с концентрацией 5 мг/л наблюдали статистически достоверный трехкратный рост уровня экспрессии гена P-gp, кодирующего белок P-гликопротеин, уже через 1 час эксперимента (Рисунок 15).

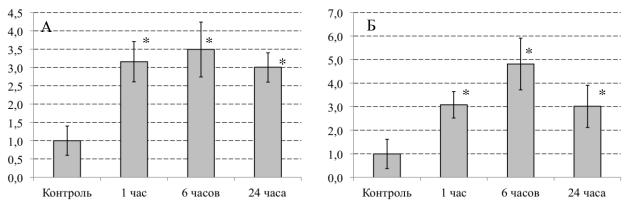


Рисунок 15 - Относительная экспрессия гена *P-gp* у *G. lacustris*, экспонированных: (A) - при температуре 25°C; (Б) - в растворах $CdCl_2$ (5 мг/л) (в условных единицах экспрессии) * - статистически достоверное отклонение от контроля при p<0,05.

В случае с температурой 25°С достигнутое значение уровня экспрессии гена P-gp сохранялось до конца эксперимента. Экспозиция G. lacustris в растворе хлорида кадмия также вызывала повышение уровня экспрессии гена P-gp. Максимальное значение уровня экспрессии, в пять раз превышающее контрольное, фиксировали к 6 часам экспозиции. Экспозиция амфипод вида G. lacustris в растворах гуминовых веществ HS1500 не вызывала достоверных изменений в уровне экспрессии гена P-gp на протяжении всего эксперимента.

Общее обсуждение

Проведенные исследования показали, что различия в стресс-реакциях пресноводных амфипод в условиях интоксикации и при гипертермии зависят от их токсико- и терморезистентных способностей и согласуются с сравнительными межвидовыми рядами устойчивости видов. Установлена общая для всех видов реакция на повышенную температуру, как на уровне

синтеза БТШ70, так и на уровне экспрессии кодирующих их генов. Выявлена зависимость между степенью терморезистентности видов и временем начала увеличения уровня БТШ70. Так, наиболее термоустойчивый палеарктический вид G. lacustris показал самое позднее время увеличения как уровня экспрессии генов бтш70, так и уровня белков БТШ70 по сравнению с байкальскими видами амфипод. У двух из изученных байкальских видов (E. cyaneus и E. verrucosus) обнаружено увеличение содержания БТШ70 при интоксикации хлоридом кадмия. На уровне же транскрипции у всех исследованных видов достоверное увеличение экспрессии бтш70. происходило токсикочувствительного *E. cyaneus* увеличение содержания белка и экспрессии гена *бтш70* отмечали уже в самом начале токсического воздействия. У *Е*. verrucosus индуцированное накопление БТШ70 и увеличение уровня мРНК бтии 70 отмечали к концу эксперимента. У наиболее токсикорезистентных видов G. lacustris и E. vittatus экспозиция в растворах хлорида кадмия не вызывала увеличения уровня БТШ70, но вела к увеличению уровня мРНК бтш70. Таким образом, скорость и характер стресс-реакции на воздействие хлорида кадмия у амфипод как на уровне транскрипции, так и трансляции БТШ70 хорошо согласуются c ранее опубликованными рядами токсикорезистентности видов.

результате проведенного исследования было установлено, гуминсодержащий препарат HS1500 может индуцировать стресс-реакцию у пресноводных амфипод на молекулярно-генетическом уровне. Экспозиция G. HS1500 вызывала ответ lacustris растворах на трансляционном транскрипционном уровнях, выраженный в увеличении содержания как мРНК бтии 70, так и самих БТШ 70. У байкальских видов в ответ на воздействие растворов препарата была отмечена реакция лишь на транскрипционном уровне, выраженная в снижении содержания мРНК бтш70. При этом изменений в содержании БТШ70 у всех изученных байкальских амфипод отмечено не было. Изменения уровней содержания БТШ70 в клетках служат общим индикатором стрессового воздействия на организм. Один из возможных путей, это непосредственное воздействие компонентов препарата на структуры клетки, связанные с окислительными процессами и увеличением продукции активных форм кислорода, способных повреждать мембраны и клеточные белки. Прооксидантное действие ряда гуминсодержащих препаратов было ранее неоднократно показано в публикациях, в том числе и у амфипод (Timofeyev et al., 2004-2006; Steinberg et al., 2006-2009). Отдельно следует рассмотреть полученные данные по механизмам стресс-реакции на уровне транскрипции РНК. Экспозиция G. lacustris в растворах HS1500 приводила к 4х кратному возрастанию содержания мРНК бтило, что соотносится с

двукратным увеличением содержания непосредственно белка (БТШ70), с той лишь разницей, что реакция на уровне белка начиналась раньше (6 часов экспозиции), чем на уровне мРНК (24 часа экспозиции). Напротив, у байкальских амфипод отмечена иная картина, у всех исследованных байкальских видов отмечали снижение содержания мРНК бтш70 под воздействием растворов HS1500. Таким образом, в данном исследовании свидетельства разнонаправленности реакций гуминсодержащего препарата HS1500, у амфипод - представителей разных фаунистических групп. Это наблюдение представляет особый интерес в свете данных о разнонаправленных стратегиях стресс-реакции байкальских и палеарктических амфипод на уровне активности ферментных антиоксидантных систем, опубликованных ранее (Timofeyev et al., 2006; Timofeyev, Steinberg, 2006; Тимофеев, 2010). Полученные в данном исследовании материалы не только предоставляют дополнительные свидетельства в пользу различий организмов, стресс-реакции байкальских И палеарктических демонстрируют, что эти различия лежат как на функциональном белковом уровне, так и на уровне молекулярных механизмов транскрипции. Различия в реакциях на транскрипционном и трансляционном уровнях у байкальских амфипод и более быстрая реакция на белковом уровне, чем на уровне мРНК у палеарктического вида могут быть объяснены пост-транскрипционной регуляцией синтеза БТШ70 (Sun et al., 2011; Tranter et al., 2011). Различия в реакции на уровне мРНК и белка у байкальских амфипод также могут быть связаны с различной степенью стабильности структуры мРНК бтш70 и непосредственно белка БТШ70. Несмотря на снижение содержания мРНК бтии 70 у байкальских видов под воздействием HS1500, уровень БТШ70 достигал контрольных значений, ЧТО необходимо для поддержания нормального гомеостаза клетки.

Показано, что повышенная температура приводила к увеличению интенсивности выводящей активности мембранного белка переносчика Ргликопротеина у байкальских видов и не вызывала изменений у наиболее lacustris. терморезистентного палеарктического G. термочувствительного E. verrucosus увеличение выводящей активности Pболее ранних гликопротеина происходило на этапах, чем более терморезистентного *E*. cyaneus. Показано, что активация механизма множественной резистентности к ксенобиотикам напрямую зависит от резистентных способностей вида. Интоксикация рачков хлоридом кадмия ведет к снижению активности процесса выведения родамина С, при этом у более токсикочувствительных видов ингибирование происходит в большей степени, чем у токсикорезистентных. Ингибирование выводящей активности Р- гликопротеина может быть связано как с деструктивным воздействием солей кадмия на белок, так и с повышением общей нагрузки на выводящую систему.

Результаты исследования показали, что токсическое и температурное стрессовые воздействия ведут к увеличению уровня экспрессии гена *P-gp* у *G. lacustris*. Следует особо отметить, что в данной работе впервые установлено влияние температуры на активность экспрессии гена *P-gp* у водных организмов. Рассматривая экологическое значение установленных фактов, следует отметить, что повышенная температура среды может не только вызывать активацию протоксинов растворенных в воде, но и усиливать их проникновение в организм. Наличие же у *G. lacustris* активно работающей системы детоксикации ксенобиотиков в условиях гипертермии позволяет ему благополучно переживать токсическое воздействие, что среди прочего может обуславливать высокие резистентные способности этого вида, позволяющие ему обитать в водоемах с выраженными колебаниями температурного режима.

ВЫВОДЫ

- 1. Экспонирование амфипод в растворах хлорида кадмия (5 мг/л) и в растворах низкомолекулярного гуминсодержащего препарата HS1500 (10 мг/л РОУ) ведет к ингибированию функциональной активности мембранного белка переносчика Р-гликопротеина у всех исследованных видов. В условиях гипертермии (25°С) происходит усиление активности Р-гликопротеина у байкальских видов, в то время как у палеарктического *G. lacustris* данная активность не изменяется.
- 2. Экспонирование палеарктического *G. lacustris* в растворах хлорида кадмия (5 мг/л) приводит к увеличению активности фермента глутатион S-трансферазы, напротив, экспонирование амфипод в растворах низкомолекулярного гуминсодержащего препарата HS1500 (10 мг/л POУ) и в условиях гипертермии (25°C) на активность фермента не влияет.
- 3. Экспонирование токсикочувствительных видов амфипод в растворах хлорида кадмия (5 мг/л) ведет к увеличению содержания БТШ70, в то время как у токсикорезистентных видов уровень данного белка не увеличивается. Экспозиция амфипод в растворах низкомолекулярного гуминсодержащего препарата HS1500 (10 мг/л РОУ) не ведет к изменениям содержания БТШ70 у байкальских видов, однако вызывает увеличение содержания БТШ70 у палеарктического *G. lacustris*.
- 4. У всех видов амфипод, экспонированных в растворах хлорида кадмия (5 мг/л), происходит увеличение уровня экспрессии генов 6mm70, кодирующего белок БТШ70. При экспонировании амфипод в растворах низкомолекулярного гуминсодержащего препарата HS1500 (10 мг/л РОУ) наблюдается снижение уровня экспрессии генов 6mm70 у байкальских амфипод и увеличение уровня экспрессии у палеарктического G. lacustris.

- 5. В условиях гипертермии (25°С) происходит увеличение содержания БТШ70, а также рост уровня экспрессии генов *бтш70* у всех исследованных видов, при этом у термочувствительных амфипод реакция происходит раньше, чем у терморезистентных.
- 6. В условиях гипертермии (25°C) и при экспонировании в растворах хлорида кадмия (5 мг/л) происходит рост уровня экспрессии гена P-gp, кодирующего белок P-гликопротеин, у всех видов амфипод. Экспонирование в растворах низкомолекулярного гуминсодержащего препарата HS1500 (10 мг/л POY) не оказывает влияния на уровень экспрессии гена P-gp амфипод.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации, Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

- 1. Timofeyev M.A., Shatilina Z.M., Bedulina D.S., Protopopova M.V., **Pavlichenko V.**, Grabelnich O.I., Kolesnichenko A.V. Evaluation of biochemical responses in Palearctic and Lake Baikal endemic amphipod species exposed to CdCl₂ // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2008. V. 70, No. 1. P. 99–105.
- 2. Тимофеев М.А., Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., **Павличенко В.В.**, Колесниченко А.В. Сравнительное исследование клеточных механизмов терморезистентности у байкальского и палеарктического видов эврибионтных амфипод // Сибирский экологический журнал. 2008. Т. 15, № 1. С. 23–29.
- 3. Timofeyev M., Protopopova M., **Pavlichenko V.**, Steinberg C. Can acclimation of amphipods change their antioxidative response? // Aquatic Ecology. 2009. V. 43. P. 1041–1045.
- 4. Timofeyev M., Shatilina Zh., Protopopova M., Bedulina D., **Pavlichenko V.,** Kolesnichenko A., Steinberg C.E.W. Thermal stress defense in freshwater amphipods from contrasting habitats with emphasis on small heat shock proteins (sHSPs)// Journal of Thermal Biology. 2009. V. 34. P. 281–285.
- 5. Шатилина Ж.М., Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., **Павличенко В.В.**, Тимофеев М.А. Белки теплового шока в механизмах стресс-адаптации у байкальских амфипод и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars: І. Семейство БТШ70 // Сибирский экологический журнал. -2010. № 1. С. 57–67.
- 6. Тимофеев М. А., Шатилина Ж.М., **Павличенко В.В.**, Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Аксенов-Грибанов Д.В., Сапожникова Е.А. Оценка активности механизма множественной резистентности пресноводных амфипод к ксенобиотикам по интенсивности выведения родамина С// Известия ИГУ, Серия «Биология. Экология». 2010. Т. 3, № 2. С. 14–19.

- 7. Шатилина Ж.М., Губанов М.В., Задереев Е.С., **Павличенко В.В.**, Аксёнов-Грибанов Д.В., Сапожникова Е.А., Протопопова М.В., Бедулина Д.С., Тимофеев М.А. Сравнительное исследование клеточных механизмов термоустойчивости у представителей популяции *Gammarus lacustris* Sars, населяющих соленое озеро Шира (респ. Хакассия) и пресный водоем Прибайкалья // Доклады Академии наук. − 2010. − Т. 434, № 6. − С. 846-849.
- 8. Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., **Павличенко В.В.**, Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Тимофеев М.А. Белки теплового шока в механизмах стресс-адаптации у байкальских амфипод и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars: II. Семейство низкомолекулярные (малые) БТШ // Сибирский экологический журнал. 2010. \mathbb{N} 4. C. 623 632.
- 9. Shatilina Z.M., Riss H.W., Protopopova M.V., Trippe M., Meyer E.I., **Pavlichenko V.V.**, Bedulina D.S., Axenov-Gribanov D.V., Timofeyev M.A. The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) in the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats// Journal of thermal biology. 2011. V. 36, I. 2. P. 142 149.
- 10. Protopopova M.V., Takhteev V.V., Shatilina Zh.M., **Pavlichenko V.V.**, Axenov-Gribanov D.V., Bedulina D.S., Timofeyev M.A. Small HSPs molecular weights as new indication to the hypothesis of segregated status of thermophilic relict *Gmelinoides fasciatus* among Baikal and Palearctic amphipods // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2011. V.7, No 2. P. 175-182.

Прочие издания

- 11. **Павличенко В.В.**, Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Сапожникова Е.А., Аксёнов-Грибанов Д.В., Бадуев Б.К., Тимофеев М.А. Накопление лактата и белков теплового шока (БТШ) при остром температурном стрессе у байкальских термочувствительных *Eulimnogammarus vittatus* и *Eulimnogammarus marituji* (Crustacea, Amphipoda) // Амурский зоологический журнал. 2009. Т. І, № 3. С. 190-196.
- 12. **PavlichenkoV.V.,** Axenov-Gribanov D.V. Identification of P-glycoprotein gene sequence from Eeuropean (Palearctic) and Baikalian endemic amphipods // "Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten der Programme "Michail LomonosovII" und "Immanuel Kant II" 2009/2010, Moskau, 16-17 April 2010». 2010. P. 143-146.
- 13. **Pavlichenko V.V**., Luckenbach T., Axenov-Gribanov D.V., Protopopova M.V., Timofeyev M.A. Identification of P-glicoprotein gene sequence of Palearctic amphipod species *Gammarus lacustris* Sars // The fifths Vereshagin Baikal conference 4-9 October, 2010. Irkutsk, 2010. P. 81-82
- Павличенко В.В., Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Аксёнов-Грибанов Д.В., Сапожникова Е.А., Тимофеев М.А. Анаэробные процессы при

- остром температурном стрессе у байкальских термочувствительных амфипод // Сборник тезисов 14 международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». 2010 Т. 2, стр. 265-266.
- 14. **Pavlichenko V.V.**, Luckenbach T., Protopopova M.V., Axenov-Gribanov D.V., Timofeyev M.A. Increased environmental temperature induces *P-glycoprotein* expression in common freshwater amphipod *Gammarus lacustris* Sars // New frontiers in Monitoring European Biodiversity (MEB). The role and importance of amphipod crustaceans. ABSTRACT VOLUME (Orto Botanico, Palermo, Italy, 27-29 September). 2011. P. 49-50.
- 15. **Павличенко В.В.**, Протопопова М.В., Аксенов-Грибанов Д.В., Гурков А.Н., Люкенбах Т., Тимофеев М.А. Идентификация белка Р-гликопротеина и оценка его экспрессии в условиях воздействия токсического и температурного стрессовых факторов у палеарктического вида амфипод *Gammarus lacustris* Sars// Материалы II Всероссийской научно-практической конференции «Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле» (Иркутская область, пос. Листвянка, 23 27 августа 2011 г.). Иркутск: Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2011. С. 157 163.
- 16. **Pavlichenko V.V.**, Luckenbach T., Timofeyev M.A. Increased environmental temperature induced *P-glycoprotein* gene expression in common freshwater amphipod, *Gammarus lacustris* Sars//4th International symposium on the environmental physiology of ectotherms and plants (Rennes, July 18 22, 2011). 2011. P. 110.