

Аннотированный отчет
о выполнении Государственного контракта
№ 02.740.11.5136 от 9 марта 2010 г.,

выполняемого в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.5 «Проведение научных исследований коллективами под руководством приглашенных исследователей»

Тема проекта: «Молекулярно-биологические маркеры стрессовых состояний гидробионтов. Специфические аспекты применения при мониторинговой оценке оз. Байкал».

Целью работы являлось проведение исследований по изучению возможности использования и адаптации современных методик оценки стрессового ответа на байкальских эндемиках, путем сравнительного исследования элементов стресс-адаптации у эндемичных байкальских организмов и широко распространенных (палеарктических) организмов. В ходе исследования, на примере байкальских эндемичных амфипод, была показана возможность использования метода оптической спектроскопии для мониторинга стрессового состояния водных организмов. Были исследованы байкальские амфипод *E. verrucosus* при нормальных и стрессовых условиях (гипертермия, гипоксия) *in vivo* и *in vitro*. Показано, что спектры поглощения *E. verrucosus in vivo* хорошо согласуются с измерениями жирорастворимой фракции *E. verrucosus in vitro*, и могут быть использованы для определения стрессовых состояний организмов. В рамках проекта были оценены разнообразные механизмы стресс-адаптации, в том числе показатели активности синтеза белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ. Показано, что у байкальских амфипод *E. vittatus*, *E. cyaneus*, *O. flavus* при экспозиции в растворах солей тяжелых металлов происходит индукция синтеза как БТШ70, так и нмБТШ. Экспонирование амфипод при повышенных температурах ведет к увеличению содержания БТШ70 и нмБТШ у исследованных амфипод *O. flavus* и *E. verrucosus*, а так же у палеарктического *G. lacustris*. Показано, что для всех исследованных амфипод (байкальские *G. fasciatus*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus* и палеарктический *G. pulex*) характерно увеличение количества БТШ обоих семейств при окислительном воздействии вызванном экспозицией в растворах препарата Schwarzer See с концентрацией 60 мг/л, который направлен на предотвращение, защиту и (или) компенсацию структурных нарушений, вызванных усиливающимися процессами свободно-радикального окисления в клетках. Так же оценивали влияние стрессовых факторов на активность ферментов антиоксидантной системы. Показано, что гипертермия ведет к изменению активности пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы у исследованных литоральных видов амфипод (байкальские *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *G. fasciatus*, палеарктический *G. lacustris*). Глубоководный *O. albinus* характеризуется отсутствием однозначно выраженной реакции антиоксидантных ферментов на повышение температуры. Показатели активности исследуемых ферментов АОС при этом разнонаправлено варьируют в широком диапазоне. По результатам проведенных исследований выявлены заметные различия у видов, отличающихся по своей устойчивости к гипоксии. Так, у оксичувствительного *E. verrucosus* было отмечено снижение активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы уже через 30 минут экспонирования. У более устойчивого *E. cyaneus* активность пероксидазы снижалась

немного позже, а снижение активности глутатион S-трансферазы происходило только после 12 часов экспонирования. У наиболее устойчивого к гипоксии палеарктического *G. lacustris* в ходе экспозиции не только не происходило снижение активности ферментов, а, напротив, была обнаружена кратковременная активация глутатион S-трансферазы. Единственный вид, не проявивший никакой направленности в изменениях активности антиоксидантных ферментов, *O. flavus*. В условиях гипоксии у *O. flavus* наблюдали большой разброс индивидуальных значений активности ферментов, однако достоверного отличия от контроля в ту или иную сторону они не имели. Экспозиция амфипод (байкальские *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, палеарктические *G. tigrinus*, *G. lacustris*) в растворах гуминсодержащих препаратов Sanctuary pond с концентрацией 50 мг/л приводила к развитию окислительного стресса и активации ферментов АОС, при этом у большинства исследованных амфипод сопровождалось двумя этапами активации ферментов. Показано, что гипертермия вызывает изменение содержания перекиси водорода у исследованных видов амфипод: байкальских *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *E. maritiji*, и палеарктического *G. lacustris*. Токсическое воздействие также ведет к изменению содержания перекиси водорода. Показано увеличение уровня перекисного окисления липидов при воздействии на амфипод (байкальские *E. vittatus*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, палеарктический *G. lacustris*) окислительного стресса, индуцированного экспозицией в растворах гуминовых веществ Sanctuary pond с концентрацией 50 мг/л, и Schwarzer See с концентрациями 30 и 60 мг/л. В условиях интоксикации (хлорид кадмия с концентрацией 0,05 мг/л) у более токсикорезистентных видов не происходит увеличения уровня ПОЛ. У более токсикочувствительных видов, наоборот, отмечено увеличение уровня ПОЛ в условиях интоксикации. Было установлено, что при воздействии токсического (хлористый кадмий с концентрацией 5 мг/л) стресса происходит активация гена *bmi70* как у байкальского *E. cyaneus* и палеарктического *G. lacustris*. При воздействии же окислительного стресса (гуминсодержащий препарат HS1500) отмечали разнонаправленные реакции изменения активности гена. Была проведена оценка изменения содержания антиоксидантных ферментов, таких как глутатионпероксидаза (изоформа GPx3, которая является внеклеточным ферментом и встречается в основном в плазме) и глутатион S-трансфераза. Были исследованы представители 3-х популяций *G. pulex*, обитающих в водоемах, которые характеризуются различной минерализацией. Подготовлено заключение о возможности использования отдельных стресс маркеров применительно к байкальским видам, а так же рекомендации по использованию адаптированных подходов при мониторинговых исследованиях экосистем озера Байкал и Байкальского региона.

За время проведения работ по проекту было проведено 2 семинара: "Био-фотоника: современное состояние методов оптической диагностики в биомедицинских и экологических исследованиях", "Оптические методы количественного анализа в экологических и клинических испытаниях".

По материалам исследования опубликовано 9 печатных работ, среди которых 1 статья в рецензируемом международном научном журнале "Journal of Biophotonics" (импакт-фактор 4.2) Следует особо отметить, что решением редакции журнала статья вынесена на титульный лист выпуска "cover page".

Отдельные материалы проекта также были использованы исполнителями проекта при написании 2-х в диссертационных работ на соискание степени кандидата биологических наук и доктора биологических наук.

Перечень опубликованных научных работ:

1. Протопопова М.В. Механизмы неспецифической резистентности у байкальских и палеарктических амфипод в условиях интоксикации хлоридом кадмия/ М.В. Протопопова. - Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Красноярск, 2011. – 20 с.
2. Тимофеев М.А. «Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод». Автореферат диссертации на соискание степени доктора биологических наук, 2010, Томск, 44 с.
3. Axenov-Gribanov D.V., Gurkov A.N., Shakhtanova N.S., Bedulina D.S., Timofeyev M.A., Meglinski I. Optical diagnostic test of stress conditions of aquatic organisms /Journal of Biophotonics. – 2011. – V. 4, I. 9. – P. 619 – 626.
4. Меглинский И.В., Тимофеев М.А. Молекулярно-биологические маркеры стрессовых состояний гидробионтов. Специфические аспекты применения при мониторинговой оценке оз. Байкал// Материалы конференции «Опыт и результаты исследований, проводимых под руководством приглашенных ученых-соотечественников» мероприятие 1.5 Проведение научных исследований коллективами под руководством приглашенных исследователей Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы. 14-15 марта 2011 г., Москва. – С. 139.
5. Гурков А.Н., Шаханова Н.С., Аксёнов-Грибанов Д.В., Тимофеев М.А., Протопопова М.В. Увеличение доли анаэробного метаболизма и развитие процессов перекисного окисления липидов при токсическом стрессе у байкальских и палеарктических амфипод / // Вестник Иркутского университета/ФГБОУ ВПО «ИГУ» [редкол.: О.А. Эдельштейн, Г.В. Логунов]. – Иркутск: изд-во ИГУ, 2011. – Вып. 14. – С. 44 – 45.
6. Timofeyev M.A., Pavlichenko V.V., Protopopova M.V., Axenov-Gribanov D.V., Bedulina D.S., Gurkov A., Shatilina Z.M. Evolution of stress resistance mechanisms in Lake Baikal endemic amphipod along the gradient of environmental change // 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. 48 - 49.
7. 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.
8. Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Зацепина О.Г., Павличенко В.В., Гарбуз Д.Г., Шатилина Ж.М., Аксенов-Грибанов Д.В., Тимофеев М.А., Евгеньев М.Б. Белки теплового шока HSP70 у байкальских амфипод *Eulimnogammarus cyaneus* и *Eulimnogammarus verrucosus*: структура и регуляция экспрессии кодирующих их генов в условиях гипертермии// 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. 12 – 19.
9. 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.