

**Аннотированный отчет
о выполнении Государственного контракта
№ 14.740.11.0926 от 29 апреля 2011 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: «Методы ранней диагностики стрессовых состояний гидробионтов и перспективы их использования в мониторинговой оценке эндемичных сообществ оз. Байкал в условиях глобальных климатических изменений».

Целью работы являлась разработка методов ранней диагностики стрессовых состояний гидробионтов и их адаптация к использованию в мониторинговой оценке эндемичных сообществ оз. Байкал в условиях глобальных климатических изменений. В ходе выполнения работ была произведена оценка степени оксидативного повреждения тканей байкальских и палеарктических видов. Показано, что в условиях интоксикации у более токсикорезистентного *E. verrucosus* не происходит увеличения содержания диеновых конъюгатов, что является показателем стабильности процессов перекисного окисления липидов. У более токсикочувствительного *E. cyaneus*, наоборот, отмечено накопление диеновых конъюгатов в условиях интоксикации, что, в свою очередь, указывает на интенсификацию процессов перекисного окисления липидов. У токсикорезистентных видов при токсическом воздействии происходило снижение содержания малонового диальдегида, вторичного продукта перекисного окисления липидов. При воздействии повышенной температуры (20 и 25°C) не отмечали увеличения диеновых конъюгатов у терморезистентного *G. fasciatus*, в то время как у менее терморезистентного *E. cyaneus* происходило увеличение их содержания. Содержание малонового диальдегида так же не изменялось у палеарктического *G. lacustris*, наиболее терморезистентного из исследуемых видов. У байкальских же устойчивых к повышению температуры среды в *G. fasciatus*, отмечали изменение содержания малонового диальдегида при экспозиции при повышенных температурах. Показано, что при экспозиции амфипод *E. cyaneus*, *G. lacustris* при повышении температуры на 1°C в час происходит увеличение содержания БТШ70, при этом отмечен видоспецифичный характер увеличения данного белка. При экспозиции гастропод *S. amauronius* при аналогичных условиях отмечали как периоды снижения содержания БТШ70, так и периоды увеличения его содержания. Воздействие низких положительных температур (понижение на 1°C в час) так же оказывало влияние на содержание БТШ70 как у амфипод *G. lacustris*, так и у гастропод *B. turiformis*, *B. baikalensis*. Так, у исследованных амфипод происходило снижение содержания БТШ70. У гастропод характер изменения содержания БТШ70 при воздействии понижения температуры среды носил видоспецифичный характер. Экспозиция в растворах синтетического гуминового вещества HS1500, не вызывало изменения содержания БТШ70 у исследованных байкальских амфипод *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, но вызывало его увеличение у палеарктического *G. lacustris*. При экспозиции байкальских эндемичных *E. maackii* и *E. maritiji* в растворах синтетического гуминового вещества HS1500 наблюдали общую для обоих видов тенденцию к снижению содержания нмБТШ. При экспозиции амфипод в условиях градиентного повышения температуры наблюдали изменения активности антиоксидантных ферментов. Происходило снижение активности каталазы и пероксидазы

у термочувствительного *E. verrucosus*, в то время как у термоустойчивых *E. suaneus* и *G. lacustris* активность этих ферментов не изменялась. Активность глутатион S-трансферазы снижалась в той или иной степени у всех исследованных видов. Показано, что в условиях пониженного содержания кислорода у всех исследованных амфипод (*E. suaneus*, *E. verrucosus*, *G. lacustris*) происходит активация анаэробного метаболизма. Байкальские и палеарктические амфиподы обладают способностью к утилизации продуктов анаэробного метаболизма. Показано, что изменение температуры среды на 1 °С в час также оказывает влияние на активацию анаэробного метаболизма у исследованных видов (амфиподы *E. suaneus*, гастроподы *B. fragilis*).

Определены нуклеотидные последовательности кодирующих областей генов таких стрессовых белков как БТШ70 и Р-гликопротеин, а так же референтного белка, у амфипод и гастропод. В результате исследования были получены данные об особенностях активации механизма БТШ70-стресс ответа у байкальских и палеарктических амфипод при воздействии ключевых абиотических стрессовых факторов – гипер- и гипотермии, солей тяжелых металлов и растворенного органического вещества. Показано, что степень неспецифической активности этого механизма зависит от экологического статуса вида. Наибольшей степенью неспецифической активности механизма БТШ70-стресс ответа обладают палеарктические виды. Были получены и проанализированы нуклеотидные последовательности, соответствующие кодирующей части *bmi70* байкальских амфипод *Eulimnogammarus vittatus*, *E. maritiji*, *E. maackii*, *E. cruentus*, *Gmelinoides fasciatus*, *Brandtia latissima* и палеарктического *G.pulex*. Анализ полученных последовательностей при помощи алгоритма BLAST показал высокую степень гомологии с БТШ70 амфипод и других ракообразных. Длина полученных последовательностей составила 276 пар оснований, которые соответствуют 92 аминокислотам. Анализ филогенетического дерева показал наличие двух групп последовательностей *bmi70*, которые, исходя из степени гомологии, принадлежат двум генам-ортологам мультигенного семейства *bmi70*. На основании полученных данных были разработаны специфические праймеры для каждого вида, позволяющие оценить суммарную активность обоих выявленных ортологов *bmi70*. Показано, что экспозиция амфипод *E. vittatus* при температуре 25°C и в раствора хлористого кадмия с концентрацией 5 мг/л вызывала достоверное повышение активности генов *bmi70*. При экспозиции в растворах гуминового препарата HS1500 у данного вида происходило снижение активности *bmi70*.

На основании анализа данных, полученных при выполнении работ по государственному контракту, сформулировано заключение о возможности использования исследованных механизмов неспецифической резистентности в качестве маркеров при ранней диагностике стрессовых состояний применительно к байкальским видам, а так же рекомендации по использованию изученных механизмов неспецифической резистентности в качестве биомаркеров стрессового воздействия у байкальских амфипод. Полученные результаты будут включены в образовательный процесс.

Приглашенным руководителем В.В. Кальченко были проведены семинары, позволившие узнать о новых методиках исследования стрессовых состояний организмов. Темы семинаров: "Прижизненная оптическая визуализация в биологии", "Современная интравитальная микроскопия". На семинарах были представлены современные методы исследования, которые могут быть использованы для ранней диагностики стрессовых состояний организмов. Программы семинаров основаны на базе успешно зарекомендовавших себя программ коротких курсов, разработанных В.В. Кальченко.

По материалам исследования опубликовано 13 печатных работ, среди которых 2 статьи в рецензируемых научных журналах. Отдельные материалы проекта также были включены в диссертационную работу одного из исполнителей проекта.

Перечень опубликованных научных работ:

1. Павличенко В.В. Стресс-реакции пресноводных амфипод в условиях гипотермии и при интоксикации ксенобиотиками/ В.В. Павличенко. - Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Иркутск, 2012. – 21 с.
2. Gurkov A.N., Axenov-Gribanov D.V., Pavlichenko V.V., Shakhtanova N.S., Bedulina D.S., Timofeyev M.A., Kalchenko V., Meglinski I. Eco-Photonics: Application of optical diagnostic modalities for non-invasive monitoring and evaluation of stress conditions of aquatic organisms. Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIII, Edited by V.V. Tuchin, E.A. Genina, I. Meglinski. - Proc. SPIE. – 2012. - V.8337. – P. 83370K.
3. Axenov-Gribanov D. V. et al. The evaluation of the antioxidant enzyme's activity and activity of anaerobic glycolysis' enzymes under gradual temperature increase in Baikal amphipod species *Eulimnogammarus marituji*, *E. maackii* and *Gmelinoidea fasciatus*/ D. V. Axenov-Gribanov, J. A. Lubyaga // Journal of stress physiology and biochemistry. – 2012. – 4. – pp.322-329.
4. Верещагина К.П. Влияние постепенного изменения температуры среды на показатели перекисного окисления липидов у организмов, отличающихся по своим терморезистентным способностям на примере пресноводных амфипод и гастропод /К.П.Верещагина, Д. В. Аксенов – Грибанов, Н.С.Шахтанова, В.В.Павличенко, Ж.М.Шатилина, М.А.Тимофеев // Вестник Иркутского университета/ФГБОУ ВПО «ИГУ» [редкол.: О.А. Эдельштейн, Г.В. Логунов]. – Иркутск: изд-во ИГУ, 2012. – Вып.15. – С.25-26.
5. Шахтанова Н.С. Влияние постепенного изменения температуры среды на процесс анаэробного гликолиза у байкальских и палеарктических амфипод /Н. С. Шахтанова, Д. В. Аксенов – Грибанов, М. А. Тимофеев, М. В. Протопопова, // Вестник Иркутского университета/ФГБОУ ВПО «ИГУ» [редкол.: О.А. Эдельштейн, Г.В. Логунов]. – Иркутск: изд-во ИГУ, 2012. – Вып. 15. – С. 51-52.
6. Аксенов – Грибанов Д. В. и др. 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. Шахтанова, 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. Учебная полевая практика по зоологии беспозвоночных: учеб.-метод. пособие/ [сост. В.Г. Шиленков, И.В. Аров, В.В. Тахтеев, Н.И. Козлова, Л.Н. Дубешко, Д.И. Стом, М.А. Тимофеев]. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2012. – 154 с.
8. Аксёнов - Грибанов Д.В., Верещагина К.П., Шахтанова Н.С., Гурков А.Н., Тимофеев М.А. Влияние температурных условий среды на анаэробные процессы у

байкальских и палеарктических амфипод// Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. – Пущино, 2012. – С. 346 – 347.

9. Гурков А.Н., Бедулина Д.С., Шатилина Ж.М., Аксёнов-Грибанов Д.В., Тимофеев М.А. Неспецифические механизмы стресс-реакции амфипод *Gammarus lacustris* и *G. pulex* из популяций, населяющих местообитания с различной солёностью// Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. – Пущино, 2012. – С. 357.

10. Аксенов – Грибанов Д. В. Температурно-индуцированные изменения содержания низкомолекулярных энергетических метаболитов у байкальского эндемичного вида гастропод *Benedictia fragilis* / Д. В. Аксенов – Грибанов, К. П. Верещагина, Н. С. Шахтанова, Д. С. Бедулина, Ж. М. Шатилина, М. А. Тимофеев // Всероссийская молодежная конференция «Актуальные проблемы химии и биологии». (Пущино, 30 июля - 3 августа 2012 года). Сборник тезисов. – Пущино, 2012. – с. 119.

11. Шахтанова Н. С. Температурно-индуцированные изменения активности ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза у эндемичных байкальских амфипод, различающихся терморезистентным способностям / Н. С. Шахтанова, Д. В. Аксенов – Грибанов, Ю. А. Лубяга, Д. С. Бедулина, Ж. М. Шатилина, М. А. Тимофеев// Всероссийская молодежная конференция «Актуальные проблемы химии и биологии». (Пущино, 30 июля - 3 августа 2012 года). Сборник тезисов. – Пущино, 2012. – с. 130.

12. Шахтанова Н. С. Температурно-индуцированные изменения активности ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза у эндемичных байкальских амфипод, различающихся терморезистентным способностям / Н. С. Шахтанова, Д. В. Аксенов – Грибанов, Ю. А. Лубяга, Д. С. Бедулина, Ж. М. Шатилина, М. А. Тимофеев// Всероссийская молодежная конференция «Актуальные проблемы химии и биологии». (Пущино, 30 июля - 3 августа 2012 года). Сборник тезисов. – Пущино, 2012. – с. 130.

13. Pavlichenko V.V. Identification of genetic sequence of P-glycoprotein and quantification of stress effects on its expression in endemic Baikalian and an ubiquitous paleartic amphipod species/ Pavlichenko V.V. , M.V. Protopopova, D.V. Axenov-Gribanov D.V. , Luckenbach T. // “Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten des “Michail Lomonosov”-Programms 2011/12, Moskau, 28-29. April 2011», Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD).-2012 . – P. 119-122