

Аннотированный отчет
о выполнении Государственного контракта
№ П1046 от 31 мая 2010 г.,

выполняемого в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.2.2 «Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук»

Тема проекта: «Стрессовые системы у байкальских эндемичных гидробионтов: эволюция, разнообразие и перспективы использования в биомониторинге».

Целью работы являлось изучение основных стрессовых систем байкальских эндемичных организмов. Оценить возможность их применения в качестве биомаркеров стрессовых воздействий. Объектом исследования была выбрана группа пресноводных амфипод (Amphipoda, Crustacea) и гастропод (Gastropoda, Mollusca). Было проведено сопоставлении белковых спектров доминантных видов. Отмечено, что для изученных представителей байкальской фауны характерно наличие белков с молекулярной массой близкой к 80-90 кДа. Данные белки слабо выражены у европейских видов. Разновозрастные группы некоторых видов также отличаются полиморфизмом белковых спектров, кроме разновозрастных групп вида *O. flavus*. Предположено, что это связано с тем, что и взрослые особи и молодь данного вида обитают преимущественно на глубинах от 200 м и более, где не отмечаются резкие изменения условий существования.

Проведен анализ проб, с целью выявления групп белков, участвующих в механизмах токсикорезистентности. Отмечена видоспецифичность синтеза стрессовых белков в результате воздействия различных (растворы хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л, растворы гуминового вещества ShS с концентрацией 60 мг/л), которые наблюдаются, главным образом, в зоне низкомолекулярных белков. Так же показано, что гипоксия оказывает влияние на характер белкового метаболизма у байкальских амфипод *E. cyaneus*, *E. vittatus*, *E. verrucosus*, и палеарктического *G. lacustris*. При этом происходит снижение содержания одних белков и увеличение содержание других. Было исследовано влияние температурного стресса 25°C у байкальских *E. verrucosus*, *G. fasciatus*, и палеарктического *G. lacustris*, а так же влияние гуминсодержащего препарата HS1500 на содержание БТШ70. Было показано, что воздействие всех исследованных стрессовых факторов вызывает увеличение содержания белков теплового шока семейства БТШ70, при этом были отмечены видовые различия изменения содержания БТШ70, которые связаны со степенью устойчивости того или иного вида к исследуемому фактору. Кроме того, наблюдаемые изменения содержания БТШ70 отличались в зависимости от типа воздействия. Проведено клонирование и секвенирование гена стрессовых белков семейства *bmi70* у байкальского *E. cyaneus* и палеарктического *G. lacustris*, благодаря чему установлена нуклеотидная последовательность кДНК для РНК генов *bmi70* данных видов. Так же проведено клонирование и секвенирование генов *актина* у данных видов, который является “house-keeper”. Так же проводили определение активности белков АВС-транспортеров у байкальских эндемичных амфипод *E. verrucosus* и *E. cyaneus* в норме и при изменениях, индуцированных стрессовыми воздействиями. Было изучено воздействие следующих стрессовых факторов: 1) токсическое воздействие – хлористый кадмий с концентрацией 0,22 мМ/л. 2) окислительное воздействие – гуминовое вещество с концентрацией 0,6 мМ/л. Показано, что экспозиция рачков в растворах хлорида кадмия и гуминового вещества ведет к снижению активности белков АВС-транспортеров. Так же было проведено клонирование и секвенирование генов белков АВС-транспортеров у байкальских эндемичных видов. В результате были установлены нуклеотидные последовательности данного гена у байкальских эндемичных *E. verrucosus*, *E. cyaneus*, *E.*

vittatus, *G. fasciatus*. Показано, что при градиентном повышении температуры среды у исследованных литоральных видов (байкальских *G. fasciatus*, *E. verrucosus*, и палеарктического *G. lacustris*) происходит увеличение уровня лактата. В свою очередь, увеличение уровня лактата у *G. lacustris* отмечается позднее и при более высоких температурах, чем у байкальских амфипод. У глубоководного байкальского *O. flavus* не отмечено изменений содержания лактата при повышении температуры среды, что, вероятно, связано с экологическими характеристиками данного вида. Установлено, что экспозиция в условиях постепенной гипертермии влияет на активность ферментов антиоксидантной системы как у исследованных амфипод *G. fasciatus* и *E. marituji*, так и у гастропод *B. fragilis*, при этом в большей степени эти изменения отмечены у термочувствительных видов. Понижение температуры среды, так же как и ее повышение, оказывает влияние на активность ферментов антиоксидантной системы. Показано, что экспозиция в растворах хлорида кадмия с концентрацией 5 мг/л вызывала достоверное повышение активности гена *bmu70* у исследованных видов амфипод - байкальского *E. cyaneus* и палеарктического *G. lacustris*. Показано, что у *G. lacustris* происходит индукция экспрессии гена белка семейства ABC-транспортёров при воздействии температурного стресса 25°C. На основании анализа данных, полученных во время проведения исследовательских работ, сделано заключение о возможности использования исследованных механизмы неспецифической резистентности в качестве стресс-маркеров применительно к эндемичным видам оз. Байкал и видам Байкальского региона.

Предложены рекомендации по использованию исследованных параметров в качестве стресс-маркеров, а так же рекомендации для учебного процесса.

По материалам исследования опубликовано 13 печатных работ, среди которых 3 статьи в рецензируемых научных журналах. Отдельные материалы проекта также были использованы исполнителями проекта при написании 2-х в диссертационных работ на соискание степени кандидата биологических наук и руководителем проекта при написании диссертационной работы на соискание степени доктора биологических наук.

Перечень опубликованных научных работ:

1. 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.
2. 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.
3. Павличенко В.В. Стресс-реакции пресноводных амфипод в условиях гипотермии и при интоксикации ксенобиотиками/ В.В. Павличенко. - Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Иркутск, 2012. – 21 с.
4. Bedulina D.S., Zimmer M., Timofeyev M.A. Sub-littoral and supra-littoral amphipods respond differently to acute thermal stress// Comparative biochemistry and physiology, Part B. – 2010. – V. 155, I. 4. - P. 413 – 418.
5. Bedulina D., Timofeyev M., Zimmer M., Zwirrmann E., Menzel R., Steinberg C.E.W. Different natural organic matter isolates cause similar stress response patterns in the freshwater amphipod, *Gammarus pulex*, with particular reference to heat shock proteins // Environmental science and pollution research. – 2010. – V. 17, No 2. – P. 261 – 269.
6. 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, N 2. – P. 175-182.

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. Шатилина Ж.М., Задереев Е.С., Губанов М.В., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Аксёнов-Грибанов Д.В., Павличенко В.В., Сапожникова Е.А., Тимофеев М.А. Сравнительное исследование механизмов терморезистентности у представителей различных популяций *Gammarus lacustris* Sars (Amphipoda) населяющих водоемы с различной соленостью // Сборник тезисов 14 международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – 2010. – Т. 2. – С. 95.
9. Timofeyev M.A., Pavlichenko V.V., Protopopova M.V., Axenov-Gribanov D.V., Bedulina D.S., Gurkov A., Shatilina Z.M. Evolution of thermal resistance mechanisms in Lake Baikal endemic amphipods along the gradient of environmental change// 4th International symposium on the environmental physiology of ectotherms and plants (Rennes, July 18 – 22, 2011). – 2011. – P. 73.
10. 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.
11. Бедулина Д.С., Аксёнов-Грибанов Д.В., Кондратьева Е.М., Лубяга Ю.А., Протопопова М.В., Шаханова Н.С., Гурков А.Н., Тимофеев М.А. Динамика изменения содержания БТШ 70 у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод в условиях постепенного повышения температуры/ Разнообразие почв и биоты северной и центральной Азии: мат-лы II Международной научной конференции Улан-Удэ (Россия), 20 — 25 июня 2011 г. В 3 т., т. 2. – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2011. – С. 129 – 130.
12. Тимофеев М.А., Протопопова М.В., Бедулина Д.С., Павличенко В.В., Аксёнов-Грибанов Д.В., Гурков А.Н., Шаханова Н.С., Кондратьева Е.М., Шатилина Ж.М. Некоторые аспекты эволюции терморезистентных способностей байкальских эндемичных амфипод по вертикальному градиенту условий среды обитания// 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. 233 – 239.
13. Кондратьева Е.М., Гурков А.Н., Шаханова Н.С., Аксёнов-Грибанов Д.В. Влияние постепенного повышения температуры на накопление белков теплового шока 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. 47 – 48.