

**Аннотированный отчет  
о выполнении Государственного контракта  
№ П1352 от 11 июня 2010 г.,**

выполняемого в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.3.1 «Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук»

**Тема проекта:** «Белки теплового шока в системе стресс-адаптации эндемичных Байкальских организмов, экологическое и эволюционное значение, возможность использования в качестве универсальных стресс-маркеров».

Цель работы - изучение особенностей функционирования белков теплового шока в системе стресс-адаптации эндемичных байкальских организмов, определение их экологического и эволюционного значения, а так же возможности использования их в качестве универсальных стресс-маркеров.

В результате выполнения 1 этапа исследования были получены данные о межвидовом различии в содержании БТШ70 и нмБТШ у байкальских амфипод *E. cyaneus*, *E. vittatus*, *O. flavus*, и палеарктических *G. lacustris*. Уровень БТШ70 зависел от терморезистентного статуса вида, тогда как содержание нмБТШ с терморезистентным статусом вида связано в меньшей степени. Обнаружено, что у глубоководного *O. flavus* содержание обеих групп БТШ в контроле не детектируется. Показано, что интоксикация водорастворимыми фракциями нефти ведет к снижению содержания белков семейства БТШ70 у байкальского эндемика *E. verrucosus* и палеарктического *G. lacustris*.

На 2 этапе исследования проводили изучение влияния острого температурного стресса на содержание БТШ70 у амфипод. Температура экспозиции была выбрана в зависимости от терморезистентного статуса амфипод: глубоководный и наименее терморезистентный *O. flavus* экспонировали при 20°C; наиболее терморезистентный палеарктический *G. lacustris* – при 30°C; *E. vittatus* *G. pulex* – при 25°C. Показано увеличение содержания БТШ70 при остром температурном стрессе. Характерной особенностью глубоководных амфипод является минимальное детектируемое количество БТШ70. Увеличение содержания этого белка свидетельствует, что механизм использования БТШ в ответе на повышенные температуры у глубоководного вида не редуцирован. Однако это увеличение происходит с задержкой, что может быть связано с длительной эволюцией данного вида в стабильных условиях низких температур. Показанное на этапе 1 выполнения проекта отсутствие конститутивного синтеза БТШ70 у глубоководных амфипод подтверждает данное предположение. Таким образом, повышение содержания БТШ70 у амфипод может использоваться при мониторинге для оценки негативного влияния глобального потепления на экосистему озера Байкал. При этом для глубоководных амфипод данный метод следует применять, учитывая особенности изменения содержания БТШ70 в ответ на острое температурное воздействие.

На 3 этапе исследования изучали влияние стрессовых факторов на содержание нмБТШ. Были исследованы температурный стресс: 25°C для палеарктических *G. pulex* и *E. berreloni*, а так же для байкальских *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *G. fasciatus*; токсическое воздействие CdCl<sub>2</sub> с концентрацией 0,05 мг/л у палеарктического *G. lacustris* и байкальских *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *G. fasciatus*. Показано, что каждое из исследованных стрессовых воздействий вызывает увеличение содержание нмБТШ. При

этом степень увеличения содержания нмБТШ зависела от устойчивости вида к воздействию фактору. Установлены нуклеотидные последовательности гена *bmi70* и гена *актина* у байкальского эндемичного *E. verrucosus* и палеарктического *G. lacustris*, с помощью их клонирования и секвенирования.

В ходе выполнения работ на 4 этапе было показано, что при токсическом воздействии хлорида кадмия (растворы с концентрацией 5 мг/л) общей реакцией для исследованных видов (байкальские *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, и палеарктический *G. lacustris*) является увеличение уровня лактата. Это свидетельствует об увеличении доли анаэробного гликолиза в энергетическом обмене амфипод. Изученные виды характеризуются различной динамикой накопления и утилизации лактата при интоксикации. Проанализировав степень и скорость накопления и утилизации лактата у изученных видов, было обнаружена обратная зависимость между чувствительностью энергетических процессов у данных видов и показателями их токсикорезистентности. В условиях пониженного содержания кислорода у байкальских *E. verrucosus* происходит активация анаэробного гликолиза. Температурный стресс так же воздействует на образование лактата у байкальских *E. vittatus* и *E. maritiji*. При этом, наиболее устойчивый к исследуемому стрессовому воздействию вид характеризуется меньшим уровнем накопления лактата. Так же проведена оценка взаимосвязи между ростом доли анаэробных процессов в энергетическом метаболизме и интенсивностью синтеза белков семейства БТШ70. Показано, что связь между уровнем анаэробного гликолиза и содержанием БТШ70 в большей степени проявляется у менее резистентных к исследуемым воздействиям видов. На 6 этапе исследования показано, что экспозиция байкальских *E. verrucosus* и при температуре 25°C вызывала достоверное повышение активности генов *bmi70* уже на самых ранних этапах стрессового воздействия. Также следует отметить, что снижение экспрессии генов *bmi70* к концу эксперимента скорее отражает угнетение жизненных функций и защитных механизмов вида, в том числе и синтез мРНК *bmi70*, и не связано с приобретением адаптации к стрессовому воздействию. При токсическом воздействии (хлористый кадмий 5мг/л) у байкальских *E. verrucosus* так же происходило повышение активности гена *bmi70*, в то время как окислительное воздействие (гуминсодержащий препарат HS1500) вело к снижению экспрессии исследуемого гена.

На основе анализа полученных данных было сделано заключение о возможности использования в качестве стресс-маркеров исследованных клеточных показателей у байкальских организмов. На основании анализа данных, полученных в процессе выполнения проекта предложены рекомендации по использованию исследованных клеточных стресс-маркеров при диагностике состояния видов-эндемиков озера Байкал.

По материалам исследования опубликовано 5 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 на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Иркутск, 2012. – 21 с.



2. 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 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 // Molecular ecology, 2013, 22, 1416–1430
3. Axenov-Gribanov D. V et al. Determination of Lake Baikal endemic amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) thermal optima limits by changes in its metabolic markers / Axenov-Gribanov D. V., Lubyaga J. A., Shakhtanova N. S., Gurkov A. N., Bedulina D. S., Shatilina Zh. M., Kondratyeva E. M., Vereshchagina K. P., Timofeyev M. A // Journal of stress physiology and biochemistry. – 2012. – 4. – pp. 289-301.
4. 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. Структурно-функциональные особенности организации генов бтш70 у эндемичных байкальских амфипод, отличающихся по отношению к температуре // Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. – Пущино, 2012. – С. 348 – 349.
5. Protopopova M.V. et al. Inducibility of HSp70 protein but not transcript expression correlates with toxic resistance levels of fresh-water amphipods upon cadmium exposure / Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Shahtanova N.S., Luckenbach T. // “Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten der Programme “Michail Lomonosov II” und “Immanuel Kant II”- 2011/2012, Moskau, 28-29 April 2012». - 2012. – P. 130 – 132.