

**АННОТАЦИЯ**  
**научно-технического отчета**  
**о выполнении Государственного контракта**  
**№ П1710 от 23 сентября 2009 г.**

Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. в рамках реализации мероприятия № 1.3.2 «Проведение научных исследований целевыми аспирантами»

по проекту «Стрессовые белки и метаболизм кислорода у байкальских и палеарктических гидробионтов в условиях стресса. Возможность применения в качестве стресс-маркеров при оценке неблагоприятных воздействий на экосистему оз. Байкал и водоемов байкальского региона»

В результате роста промышленного производства и повышения влияния антропогенного фактора на экосистемы возрастает негативная нагрузка на живые организмы. В связи с этим разработки биохимических маркеров негативного воздействия на природные экосистемы – одно из важнейших направлений современной экологии. Такие биологические тесты играют особую роль в оценке состояния окружающей среды, так как они позволяют установить стрессовое воздействие на ранних стадиях. В то же время, несмотря на то, что в качестве стресс-маркеров зачастую используют консервативные биохимические механизмы стресс-резистентности, у эндемичных и узкоадаптированных организмов их функционирование может иметь свою специфику.

Байкальские эндемичные организмы длительное время эволюционировали в крайне специфичных условиях. Возможно, что такие условия существования могли обеспечить формирование высокоспецифичных механизмов адаптации к факторам среды у обитателей озера, отличающихся от таковых у модельных организмов. Поэтому широкое применение стандартных методов мониторинговых исследований или биотестирования на байкальских эндемичных видах может привести к ошибочным выводам.

Одной из наиболее актуальных угроз стоящих перед большинством экосистем планеты является проблема глобальных климатических изменений. Несмотря на огромные размеры и объемы воды Байкала,

глобальное изменение климата уже оказывает влияние на характер его температурного режима. Как следует из опубликованных результатов мониторинговой оценки, средняя температура поверхностных вод озера с 1946 года поднялась на 1,21 градуса по шкале Цельсия (Hampton et al., 2008). Если тенденция повышения температуры будет сохраняться, то в долгосрочной перспективе могут произойти существенные перестройки экосистемы озера. Таким образом, необходимо 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 организмов.

Целью данного исследования было определить специфику функционирования белков теплового шока (БТШ) и механизма множественной устойчивости к ксенобиотикам, а также особенности метаболизма кислорода (путем измерения содержания молочной кислоты - лактата) у байкальских и палеарктических видов амфипод в условиях стресса и оценить возможность применения исследуемых параметров в качестве биомаркеров стрессового воздействия для байкальских эндемичных организмов.

На начальной стадии исследования был проведен анализ более 200 информационных источников по проблеме исследования.

Согласно литературным данным, ответ на стрессовое воздействие в первую очередь происходит на молекулярном и биохимическом уровнях. Существует целый ряд таких механизмов и одним из ключевых являются стрессовые белки, в частности белки теплового шока (БТШ) и белки механизма множественной устойчивости к ксенобиотикам.

Основной функцией БТШ является функция молекулярных шаперонов. Благодаря шапероновой активности происходит: 1) поддержание клеточных белков БТШ в свернутом или несвернутом состоянии; 2) локализация белков в органеллах, их импорт и/или экспорт; 3) минимизация агрегации

ненативных белков; 4) направление ненативных или агрегированных белков на деградацию и удаление из клетки (Feder, Hofmann, 1999).

Ряд БТШ синтезируются в клетке и при нормальных условиях – конститутивно, также их экспрессия дополнительно индуцируется различными физиологическими нарушениями и стрессами (Robert, 2003). Известно, что синтез БТШ индуцируется не только при воздействии высоких температур, но другими стрессовыми факторами, такими как низкие температуры, засоление, ионы тяжелых металлов, оксидативный стресс другие стрессовые воздействия (Gething, Sambrook, 1992, Sanders, 1993, Feder et al., 1995, Hartl, 1996; Polla et al., 1996). Благодаря тому, что при воздействии стрессовых факторов синтез и соответственно количество БТШ увеличивается их широко применяют в качестве стресс-маркеров негативных воздействий (Hofmann et al., 2000; Ito et all, 2003; и др.).

В процессах метаболизации ксенобиотиков принимает участие целый ряд систем, одним из важнейшим среди них является механизм множественной резистентности к ксенобиотикам (в англоязычной литературе известного как механизм MXR - MultiXenobiotic Resistance). Большинство организмов обладают механизмами множественной резистентности к ксенобиотикам (MXR) (Minier et al., 1999; Eufemia, Epel, 1998; Bard, 2000). В основе данного неспецифического процесса, лежит активность ABC-транспортеров - транспортных белков, функционирующих за счет энергии АТФ (АТР- binding cassette (ABC) transportes) (Higgins, 1992; Smital et al., 2003). Важнейшим белком семейства ABC-транспортеров является Р-гликопротеин. Р-гликопротеин, являясь мембранным белком-переносчиком с широкой специфичностью, выводит из клеток обширный спектр ксенобиотиков (Smital et al., 2003 и др.). Выводящая активность Р-гликопротеина часто принимается в качестве ключевого показателя активности всей системы множественной резистентности клетки или организма (Epel, 1998; Smital, Kurelec, 1997, 1998; Smital et al., 2003).

Другим показателем стресса является нарушение метаболизма кислорода и переход клеток на анаэробный метаболизм, в клетке начинает преобладать анаэробный гликолиз с накоплением молочной кислоты (лактата) как конечного продукта. Увеличение количества лактата используют в качестве стресс-маркера для обнаружения стрессового состояния у человека (Toffaletti, 1996; Bolton, 2007).

Проведя анализ мировой литературы касающейся проблеме исследования нами была выдвинута гипотеза, что эндемичные организмы озера Байкал обладают спецификой функционирования стресс-механизмов, обусловленных длительной эволюцией в специфических условиях по сравнению с обще-сибирскими палеарктическими видами. Таким образом, оптимальным направлением при выборе стресс-маркеров для мониторинга состояния оз. Байкал будут предварительные исследования с целью установления возможности использования в качестве стресс-маркеров белков теплового шока, белка Р-гликопротеина БТШ и лактата.

Объектом исследования была выбрана группа пресноводных амфипод (Amphipoda, Crustacea). Для исследования были выбраны байкальские эндемичные литоральные виды: *Eulimnogammarus vittatus*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. marituji*. Палеарктическую фауну представлял вид *Gammarus lacustris*, обитатель литорали пресноводных озер.

В результате проделанной работы было установлено, что воздействие повышенной температуры и пониженного содержания кислорода в среде обитания ведет к увеличению содержания БТШ70 у амфипод. При этом происходит многократное увеличение содержания белков семейства БТШ70, в то время как увеличение белков семейства нмБТШ не является таким значительным, а для *E. cyaneus* при температурном стрессе увеличения содержания нмБТШ не было отмечено.

Также выявлено, что исследуемые стрессовые воздействия ведут к увеличению содержания молочной кислоты (лактата) у всех исследованных амфипод.

Результаты НИР показали, что у исследованных байкальских амфипод и палеарктического *G. lacustris* существует механизм множественной резистентности к ксенобиотикам. В работе показано, что, как хлорид кадмия, так и гуминовые вещества вызывали частичное ингибирование MXR у амфипод, но не блокировали его работу полностью.

Результаты работы показали, что адаптированные подходы с использованием активности механизма MXR, белков теплового шока (БТШ) и изменений в метаболизме кислорода могут успешно применяться для оценки стрессового воздействия на байкальскую экосистему и экосистемы байкальского региона.

Результаты, полученные в ходе выполнения НИР легли в основу разрабатываемой адаптированной методики оценки стрессового ответа у байкальских эндемиков. Данная методика позволит проводить мониторинговые исследования экосистем оз. Байкал и Байкальского региона, включая как последствия антропогенного воздействия, так и глобальных климатических изменений.

Материалы, полученные в ходе выполнения работ по НИР, включены в учебный процесс биологического факультета ИГУ (в программы лабораторного практикума «Большой практикум по экологии» и лекционного курса «Современные основы Лимнологии»). Полученные экспериментальные данные включены в основу диссертационной работы руководителя проекта.

Перечень научных работ, опубликованных по результатам исследования:

1) Pavlichenko V.V. Identification of P-glycoprotein gene sequence of Palearctic amphipod species *Gammarus lacustris* Sars // V.V. Pavlichenko, Luckenbach T., D.V. Axenov-Gribanov, M.V. Protopopova, M.A. Timofeyev // The fifth Vereshagin Baikal conference 4-9 October, 2010, Irkutsk, 2010. - P.81

2) 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.

3) Pavlichenko V.V., Axenov-Gribanov D.V. Identification of P-glycoprotein gene sequence from European (Palearctic) and Baikalian endemic amphipods. // "Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten der Programme "Michail Lomonosov II" und "Immanuel Kant II"- 2009/2010, Moskau, 16-17 April 2010». - 2010. – P. 143-146

4) В.В. Павличенко, Ж.М. Шатилина, Д.С. Бедулина, М.В. Протопопова, Е.А. Сапожникова, Д.В. Аксёнов-Грибанов, Б.К. Бадуев, М.А. Тимофеев. 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. – I (3). – С. 190-196.

5) Павличенко В.В. "Стресс-реакции пресноводных амфипод в условиях гипертермии и при интоксикации ксенобиотиками"/ Дис. ... канд. биол. наук. - Иркутск, 2012. – 164 с.

6) 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. - № 4. – С. 623 – 632.

7) Бедулина Д.С. Влияние температурного фактора на клеточные и биохимические механизмы у байкальских и палеарктических амфипод / Дис. ... канд. биол. наук. - Борок, 2009. - 151 с.

8) 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.

9) 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.

10) 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.