

Тимофеев Максим Анатольевич

Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод

03.02.08 – Экология (биология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Томск – 2010

Работа выполнена в лаборатории «Проблемы адаптации биосистем» Научно-исследовательского института биологии при ГОУ ВПО «Иркутский государственный университет».

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Евгеньев Михаил Борисович
доктор биологических наук Чуйко Григорий Михайлович
доктор биологических наук, профессор Ильинских Николай Николаевич

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН), г. Москва

Защита состоится 26 октября 2010 г. в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при ГОУ ВПО «Томский государственный университет» (634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ГОУ ВПО «Томский государственный университет».

Автореферат разослан « ____ » _____ 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук



Е.Ю. Просекина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследование механизмов, лежащих в основе процессов адаптации живых организмов к условиям среды обитания, всегда являлось одной из основных задач биологического познания. Еще Чарльз Дарвин в «Происхождении видов...» обозначил вопрос: «Как достигли такого совершенства изумительные адаптации одной части организации к другой и к условиям жизни?» (Darwin, 1859). По мере понимания сложности процессов, обуславливающих эволюцию, видообразование и формирование различий в адаптивности видов, появилась и более четкая оценка необходимости изучения комплексных механизмов, лежащих в основе резистентности живых организмов к влиянию стрессовых факторов (Hoffman, Parsons, 1991, 1997). Формирование базовых элементов неспецифичной резистентности проходило еще в раннее эволюционное время. Благодаря этому общие черты функционирования защитных систем могут быть отмечены у всех типов живых организмов. Между тем, несмотря на определенную универсальность неспецифичной защиты, степень участия отдельных её компонентов может иметь межвидовую дифференциацию, зависеть от экологических и эволюционных особенностей видов (Hofmann, Hercus, 2000; Aytrinhac et al., 2004; Portner, Farrel, 2008).

Исследования, направленные на поиск и установление взаимосвязи между особенностями функционирования механизмов системы стресс-адаптации и экологическими характеристиками отдельных видов, приобретают все большую актуальность. Одним из перспективных направлений в этой области является сравнительное изучение особенностей стресс-реакций у организмов, представляющих эндемичную фауну современных очагов интенсивного видообразования. Подобные исследования целесообразно проводить в пределах группы близкородственных видов одного систематического таксона, что позволит снизить вероятность высокого межвидового полиморфизма.

В процессе эволюции у эндемичных видов сформировался комплекс признаков, максимально способствующий выживанию в строгоспецифичных условиях их обитания. Рассматривая широкую группу близкородственных эндемичных видов, представители которой обитают в различных экологических условиях, можно проследить, как именно условия обитания оказывают влияние на процессы формирования механизмов стресс-адаптации.

Одним из наиболее известных участков интенсивного видообразования является озеро Байкал, населенное древнейшей фауной, характеризующейся чрезвычайно высоким уровнем биоразнообразия и эндемизма. В Байкале происходило эволюционирование фауны в уникальных и стабильных условиях среды, что привело к развитию специфичных механизмов стресс-адаптации у эндемиков и выраженной их дифференциации у видов, занимающих узкие экологические ниши и у видов с широкими адаптивными способностями. Помимо стабильных зон в Байкале есть ряд участков, так называемая прибрежно-соровая зона, условия в которой максимально приближены к обычным мелководным водоемам Восточной Сибири, в которых обитают широко распространенные представители фауны Палеарктики. Таким образом, Байкал характеризуется широким спектром условий среды и населен высокоразвитой фауной гидробионтов, представленной как узкоспециализированными эндемиками, так и широко-адаптивными палеарктами. Особый интерес представляет группа амфипод, получившая в Байкале чрезвычайное разнообразие (более 270 эндемичных видов). Амфиподы населяют все зоны от литорали до максимальных глубин, формируя в каждой из зон свои узкоспециализированные сообщества.

Исследования байкальской фауны интересны не только для понимания роли различных защитных механизмов в системах стресс-резистентности, но и в целом для понимания того, каким образом особенности их функционирования связаны с экологией и эволюционной историей отдельного вида.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы явилась сравнительная экспериментальная оценка отношения представителей байкальских и палеарктических видов амфипод к основным абиотическим факторам среды и интоксикации, изучение влияния абиотических стрессовых факторов на содержание стрессовых белков и активность антиоксидантных ферментов у амфипод, а также изучение влияния пониженного содержания кислорода на резистентные механизмы и анаэробные процессы у амфипод и установление межвидовых различий в данных механизмах.

Исходя из цели, были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Оценить отношение нескольких видов байкальских и палеарктических амфипод, представителей различных мест обитания, к абиотическим факторам: сравнить характер термопреференции и степень терморезистентности; оценить предпочитаемые уровни рН среды; сопоставить показатели токсикорезистентности; определить степень чувствительности к недостатку кислорода; оценить влияние пониженного содержания кислорода на термо- и токсикорезистентность амфипод;
- 2) Провести оценку конститутивных показателей активности антиоксидантных ферментов (пероксидазы, каталазы, глутатион S-трансферазы) у байкальских и палеарктических амфипод;
- 3) Провести оценку уровней конститутивного синтеза белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ, иммунохимически родственных α -кристаллину, у байкальских и палеарктических амфипод;
- 4) Провести оценку влияния повышенной температуры, оксидативного и токсического стрессовых воздействий на активность ключевых ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы, глутатион S-трансферазы) и на количественные изменения в синтезе белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ у байкальских и палеарктических амфипод;
- 5) Провести оценку влияния пониженного содержания кислорода на активность ключевых ферментов антиоксидантной системы у байкальских и палеарктических амфипод;
- 6) Определить особенности анаэробного метаболизма у байкальских и палеарктических амфипод, оценить степень активности гликолиза, липолиза и анаэробного образования сукцината в условиях гипоксии;
- 7) Определить характер взаимосвязи основных экологических и физиологических аспектов резистентности байкальских и палеарктических видов амфипод, выявить причины, обуславливающие межвидовые различия.

Положения, выносимые на защиту

1. Существует взаимосвязь основных экологических характеристик амфипод, включая пространственное распространение, температурные и кислородные предпочтения, с резистентными возможностями видов, в основе которых лежат их специфичные способности к различной степени активации физиологических механизмов стрессовой устойчивости.
2. Белки семейств БТШ70 и нмБТШ, иммунохимически родственные α -кристаллину, принимают участие в механизмах устойчивости амфипод к температурному, окислительному и токсическому воздействиям, причем конститутивные уровни содержания БТШ у

байкальских и палеарктических амфипод связаны с показателями их термоустойчивости и устойчивости к гипоксии.

3. Существуют межвидовые различия в характере реакции на воздействие абиотических стрессовых факторов антиоксидантных ферментов (пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы) *in vivo* у эндемичных байкальских и палеарктических видов.

4. Характер и скорости стресс-реакции литоральных и глубоководных видов амфипод на температурное, окислительное и токсическое воздействие различаются.

Научная новизна

Большинство фактических данных и выявленных закономерностей являются новыми. Так, впервые проведено комплексное сравнительное экспериментальное исследование отношения представителей байкальских и палеарктических амфипод к основным абиотическим факторам среды и интоксикации. Прослежены важнейшие закономерности развития стрессовых реакций амфипод – от базовых поведенческих реакций до процессов, проходящих на клеточном уровне. Получены данные о характере термопреференции и степени терморезистентности видов, оценены предпочитаемые уровни рН-среды, установлены и сопоставлены межвидовые показатели токсикорезистентности, определены особенности чувствительности к недостатку кислорода, оценено влияние пониженного содержания кислорода на термо- и токсикорезистентность амфипод разных видов. Впервые проведена оценка конститутивных показателей активности антиоксидантных ферментов и уровня синтеза БТШ у эндемичных байкальских амфипод, проведено сопоставление с палеарктическими видами. Исследовано влияние повышенной температуры, окислительного и токсического стрессовых воздействий на активность ключевых ферментов антиоксидантной системы и интенсивность синтеза БТШ у байкальских эндемичных амфипод, проведено сопоставление с палеарктическими видами. Впервые описано присутствие нмБТШ, иммунохимически-родственных а-кристаллинам, у пресноводных беспозвоночных и их участие в стресс-реакции. Получены новые данные о специфике анаэробного метаболизма у байкальских и палеарктических амфипод. Выявлены различия в характере и скорости стресс-реакций литоральных и глубоководных видов амфипод на температурное, окислительное и токсическое воздействие. Установлена зависимость основных экологических характеристик амфипод, включая пространственное распространение, температурные и кислородные предпочтения, с резистентными возможностями видов, показана связь специфических способностей видов амфипод к различной степени активации и их физиологических механизмов стрессовой устойчивости.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы могут найти применение при прогнозировании влияния глобального изменения климата на состояние водных экосистем, для разработки высокоэффективных маркеров состояния гидробиоценозов и, в первую очередь, уникальной экосистемы оз. Байкал. Полученные данные представляют особый интерес для понимания вопросов экологии и эволюции байкальской фауны. Материалы исследования включены в отчеты 16 грантовых проектов, выполненных под руководством М.А. Тимофеева, из них гранты РФФИ: 02-04-48677, 04-04-63098, 05-04-97239, 05-04-97263, 06-04-48099, 08-04-100065, 08-04-00928, 09-04-00398, РФФИ–CRDF: 10-04-92505-ИК, гранты ФЦП «Кадры»: ГК № 2.1.1/982, ГК № 2.2.2.3.10067, ГК № 2.1.1/8069, ГК № 2.2.2.3, ГК № 02.442.11.7120, ГК № 02.740.11.5136, а

также Грант Президента РФ молодым кандидатам наук – МК-351.2009.4. Материалы данного исследования включены в учебный процесс ИГУ при чтении курсов лекций на биолого-почвенном факультете («Практикум по экологии», «Современные проблемы лимнологии» и др.), при проведении полевых учебных практик студентов ИГУ, а также включены в программу российско-германской летней школы «Лимноэкология озера Байкал» (ИГУ – Университет Кристиана-Альбрехта, г. Киль, Германия).

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на серии международных и всероссийских конференций, в том числе: Межд. конф. «Экология речных бассейнов» (Владимир, 1999), «Чтения памяти профессора М.М. Кожова» (Иркутск, 1998, 1999, 2000), Всерос. конф. «Безопасность биосферы» (Екатеринбург, 1999), «Сохранение биоразнообразия геотермальных рефугиев Байкальской Сибири» (Иркутск, 2000), III и IV Межд. Верещагинских конф. (Иркутск, 2000, 2005), Межд. симп. «Ecotechnology in environmental protection and fresh water lake management» (Таежон, Южная Корея, 2000), Межд. конф. «Озера холодных регионов» (Якутск, 2000), Межд. конф. «Biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia, international conference» (Новосибирск, 2000), Всерос. конф. «Актуальные вопросы мониторинга экосистем антропогенно-нарушенных территорий» (Ульяновск, 2000), XXVIII International Society for Limnology Congress (Австралия, 2001), Eco-Informa 2001 conference (Аргопп, США, 2001), Межд. симп. «Speciation in Ancient Lakes» (Иркутск, 2002), 11th Biennial Conference of the International Humic Substances Society (Бостон, США, 2002), Всерос. семинар «Концептуальные и практические аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных» (Томск, 2004), Межд. конф. «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных» (Саранск, 2005), Межд. конф. «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок, 2007), Межд. конф. «Актуальные вопросы изучения микро-, мейо-зообентоса и фауны зарослей пресноводных водоемов» (Борок, 2007), Всерос. конф. по водной токсикологии памяти Б.А. Флерова (Борок, 2008), «US – Russia conference Aquatic Animal Health» (Литаун, США, 2009), Межд. симп. «Environmental Physiology of Ectotherms and Plants» (Токио, Япония, 2009) и других.

Публикации. По теме диссертации М.А. Тимофеевым опубликованы 110 печатных работ, в том числе 2 главы в международных научных монографиях, 31 статья в ведущих рецензируемых российских и зарубежных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК (из них 14 статей в журналах, входящих в систему цитирования «Web of Science»), 15 статей в прочих научных журналах, 9 статей в сборниках научных трудов и 53 публикации в материалах научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 384 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, методической и экспериментальной частей, раздела, посвященного описанию систематической принадлежности и экологии исследованных видов, результатов исследования, общего заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа включает 169 рисунков и 7 таблиц. Список литературы состоит из 618 источников, из них 265 на русском и 353 на английском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основу диссертации составляют материалы экспериментальных полевых и лабораторных работ, проведенных в период с 1997 по 2010 годы. Полевые работы проводили в различных районах Байкальского региона (Восточная Сибирь, Россия): в южных, центральных и северных районах оз. Байкал, в мелководных озерах Южного Прибайкалья и окрестностях г. Иркутска. Часть материалов собрана в водоемах Федеральной земли Бранденбург и г. Берлина и Федеральной земли Шлезвиг Гольштейн г. Киля (Германия). Обработку материала проводили на базе научных лабораторий химического и биологического факультетов Иркутского государственного университета, НИИ биологии при ИГУ (Иркутск), Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск), Института биологии Гумбольдского университета (Берлин, Германия), Института экологии пресных вод им. Лейбница (Берлин, Германия), а также Кристиан-Альбрехт университета г. Киля (Киль, Германия). В экспериментах были использованы как байкальские эндемичные виды амфипод, так и виды – представители палеарктической (европейско-сибирской) фауны. Основная часть выбранных байкальских видов – обитатели литорали: *Eulimnogammarus vittatus*, *E. verrucosus*, *E. marituji*, *E. cyaneus*, *Gmelinoides fasciatus* и симбионт губок *Brandtia parasitica*. Глубоководную фауну в экспериментах представляли эврибатный вид *Ommatogammarus flavus*. Часть биохимических исследований была проведена с труднодоступными и специализированными видами: *Plesiogammarus martinsoni*, *Parapallasea puzyllii nigra*, *Pallasea bovskii*, *Parapallasea grubei*, *Pallasea cancellus*, *Pallasea cancelloides*, *Acantogammarus brevispinus*. Палеарктическую (европейско-сибирскую) фауну представляли виды: *Gammarus lacustris*, *G. tigrinus*, *G. pulex*, которые являются типичными обитателями мелководных водоемов.

Методы экспериментальных исследований. Для определения температурного преферендума, т.е. зоны предпочитаемых температур при наличии градиента, применяли общепринятую методику с использованием термоградиентного прибора (Siemien, Stauffer, 1989). Для определения pH-предпочтения амфипод использовали проточные установки множественного выбора. Определение кислородного предпочтения проводили в проточных установках парного выбора (Hartwell et al., 1986). Исследования по определению температурной резистентности проводили в термостатируемых камерах при температурах 25 и 30 °С. Определение устойчивости рачков к гипоксии проводили по модифицированной методике А.Я. Базикаловой (1941). Токсический стресс изучали 24-часовым экспонированием амфипод в растворах с различными концентрациями хлорида кадмия (CdCl_2). При проведении экспериментов по экспонированию в условиях гипоксии амфипод выдерживали в условиях концентрации кислорода (3,5–4 мг O_2 /л). Контрольную группу содержали в аналогичных условиях с подведением аэрации (10,5 мг O_2 /л). Для экспериментов по оценке способности к реоксигенации часть экспонированных в гипоксии рачков повторно помещали в условия аэрации (нормоксию) на 3 ч, после чего фиксировали. Окислительное воздействие индуцировали экспонированием амфипод в растворах лабораторных гуминсодержащих препаратов «Schwarzer See NOM» (IGB, Germany) и «Sanctuary pond» (Burlington, Canada), являющихся в растворах продуцентами широкого спектра активных форм кислорода (Steinberg, 2006). Была проведена серия экспериментов, в которых рачков экспонировали в растворах препаратов с различными концентрациями «Schwarzer See» – 30 и 60 мг/л (в пересчете на содержание углерода 0,6 и 1,2 ммоль/л), «Sanctuary pond» 50 мг/л (содержание углерода 2,2 ммоль/л). Эксперименты проводили с различными периодами экспозиции от 30 минут до 6 суток. После экспериментов живых рачков замораживали в жидком азоте.

Методы химического и биохимического анализа. Определение кислорода проводили с помощью цифрового кислородомера «HD Dissolved Oxygen Meter 407510» (Extech instruments, США). Контроль показателей прибора проводили калибровкой по методу Винклера. Измерение содержания лактата проводили энзиматическим спектрофотометрическим методом с помощью стандарт-набора согласно протоколу фирмы производителя (Vital diagnostic, СПб). Образцы для определения активности ферментов готовили согласно методике Weigand et al. (1999). Активность пероксидазы измеряли в соответствии с методикой Drotar et al. (1985), каталазы – по методике Н. Aebi (1984), глутатион S-трансферазы – по W. Habig (1974). Содержание белка определяли по методу Бредфорд (1976) или по Лоури (1951). Содержание БТШ – используя стандартный метод денатурирующего электрофореза с ДДС-Na в ПААГ (Laemmli, 1970) с последующим Вестерн-блоттингом (Bers, Garfin, 1985). Содержание перекиси водорода – по методу Jana and Choudhuri (1982). Содержание ацетона, ацетоуксусной кислоты, β -оксимасляной кислоты и сукцината – методом ЯМР-спектроскопии. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию диеновых конъюгатов (продуктов ПОЛ) по модифицированному методу Стальной (1977), Колесниченко и др. (2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. ОТНОШЕНИЕ АМФИПОД К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ, ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

В ходе первого этапа работы у амфипод различных видов определяли преферентные поведенческие реакции по отношению к основным факторам среды – температуре, кислороду и pH. В частности, проводили определение термопреферендума, оксипреферендума и pH-преферендума, а также оценку влияния стрессовых факторов среды на выживаемость амфипод.

1.1. Реакции предпочтения и избегания

Термопреферендум. Определение температурного преферендума проводили у байкальских видов: *G. fasciatus*, *E. cyaneus*, *E. marituji*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *O. flavus*, *B. parasitica* и палеарктического *G. lacustris* (Тимофеев, 2000; Timofeyev, 2002; Тимофеев, Кириченко, 2004; Timofeyev, Shatilina, 2007). У большинства видов оценивали термопреферентные реакции у особей, относящихся к двум размерно-возрастным группам (молоди и взрослым особям). По результатам исследования к группе с наиболее выраженным термоизбирательным поведением рачков (более 30%) отнесено большинство исследованных литоральных видов. Среди видов данной группы наиболее сильная реакция была отмечена у *E. vittatus* (максимальный показатель – 52%). В отличие от литоральных видов, глубоководный *O. flavus* продемонстрировал наименьшую способность к термоизбирательному поведению (максимальный показатель – 20%). У симбиотического *B. parasitica* выявлена редукция термопреферентной реакции.

Полученные экспериментальные материалы позволили расположить изученные виды амфипод по степени повышения значения предпочитаемых температур в следующем порядке: *O. flavus* (3–4 °C) < *E. verrucosus* = *E. vittatus* (5–6 °C) < *E. cyaneus* (11–12 °C) < *E. marituji* (13–14 °C) < *G. lacustris* (15–16 °C) $\leq$ *G. fasciatus* (17–18 °C). Сопоставление полученных данных с известными сроками размножения видов позволило сделать заключение об их взаимосвязи. Так, у холодолюбивых литоральных видов *E. vittatus*, *E. verrucosus* зимний период размножения совпадает с периодом низких температур в литорали. Глубоководные холодолюбивые *O. flavus* имеют круглогодичное размножение, проходящее при стабильных

температурах 3,5–4 °С. Для литоральных видов *E. cyaneus* и *E. maritiji*, занимающих промежуточное положение, характерен весенне-летний период размножения в условиях температур выше среднегодовых по литорали. Наиболее теплолюбивые *G. fasciatus* и *G. lacustris* характеризуются высокой пластичностью по периодам размножения. Они способны давать по несколько пометов за год в зависимости от температурных условий среды. При этом высокие температуры ведут к ускорению сроков созревания и увеличению частоты пометов. Таким образом, полученные данные о температурных предпочтениях видов могут быть связаны с их потребностью в выборе благоприятных температурных условий для размножения (Тимофеев, 2000; Тимофеев, Кириченко, 2004).

В ходе проведенных экспериментов установлена возможность смены температурных предпочтений у амфипод в зависимости от размерно-возрастной группы. Так, у литоральных *G. fasciatus*, *E. cyaneus* и палеарктического *G. lacustris* показатели температурного предпочтения взрослых амфипод отличаются от молодежи на 1–2 °С. Наиболее сильные различия отмечены у литоральных *E. vittatus* и *E. verrucosus*, разновозрастные стадии которых обитают на различных глубинах, с различными температурными условиями. Предпочитаемые температуры у молодежи этих видов почти вдвое (на 6–7 °С) выше температуры, избираемой взрослыми рачками. В отличие от литоральных видов, у глубоководных *O. flavus* не установлено различий в термопреференции молодежи и взрослых рачков. Данный факт может быть обусловлен совместным обитанием разновозрастных групп в условиях стабильного низкотемпературного режима больших глубин (3,5–4 °С) (Тимофеев, 2000).

рН-преферендум: Определение реакции рН-преферендума проводили у видов: *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus* и *G. lacustris*. Установлено, что все исследованные виды амфипод обладали близким значениями рН-предпочтения (нейтральными или слабощелочными).

Кислородное предпочтение. Определение реакции кислородного предпочтения проводили у *G. fasciatus*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *B. parasitica* и *G. lacustris* (Timofeyev, 2002; Timofeyev, Shatilina, 2007). Установлено, что *E. verrucosus* и *E. vittatus*, являющиеся обитателями средних отделов литорали, характеризуются наиболее высокой чувствительностью к колебаниям содержания кислорода в среде. Байкальский *E. cyaneus* и палеарктические *G. lacustris* и *G. fasciatus* показали наименее выраженные реакции к понижению уровня кислорода. При этом достоверное избегание *G. lacustris* фиксировали только при падении уровня ниже 5 мг О₂/л. Полученные экспериментальные материалы позволили условно расположить изученные виды амфипод по степени увеличения показателей окси-преферендума в следующем порядке: *E. verrucosus* = *E. vittatus* < *E. cyaneus* < *G. fasciatus* = *G. lacustris*. У вида *B. parasitica* в экспериментах не отмечено выраженной реакции на изменение уровня содержания кислорода, что свидетельствует о ее редукции в связи с симбиотическим образом жизни.

1.2. Резистентность амфипод и комплексное влияние стрессовых факторов среды

Терморезистентность амфипод. Определение различий в температурной резистентности проводили у видов: *G. lacustris*, *G. pulex*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *B. parasitica* и *O. flavus* (Тимофеев, 2000; Timofeyev, 2002; Тимофеев, Кириченко, 2004). Оценку терморезистентности проводили с использованием острого теплового воздействия, в два этапа. Первоначально проводили серию экспериментов с температурой 25 °С. В дальнейшем представителей видов, показавших наибольшую устойчивость к температуре 25 °С,

инкубировали при 30 °С. Установлено, что наибольшей устойчивостью к 25 °С обладают байкальские *E. cyaneus*, *G. fasciatus* и палеарктические *G. lacustris* и *G. pulex* (Рис. 1). У видов *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *B. parasitica* гибель 30% рачков наступала в течение первого часа экспозиции. Глубоководные *O. flavus* показали самую высокую чувствительность к данной температуре, полностью погибая в течение первого получаса эксперимента. Инкубация 4-х наиболее терморезистентных видов при 30 °С выявила существенные различия по термоустойчивости: *E. cyaneus* и *G. pulex* обладали меньшей устойчивостью, чем *G. fasciatus* и *G. lacustris*. Полученные материалы позволили разделить виды по степени увеличения их термоустойчивости в следующем порядке: *O. flavus* < *E. verrucosus* = *E. maritiji* = *B. parasitica* < *E. vittatus* < *G. pulex* ≤ *E. cyaneus* < *G. fasciatus* = *G. lacustris* (Тимофеев, Кириченко, 2004).

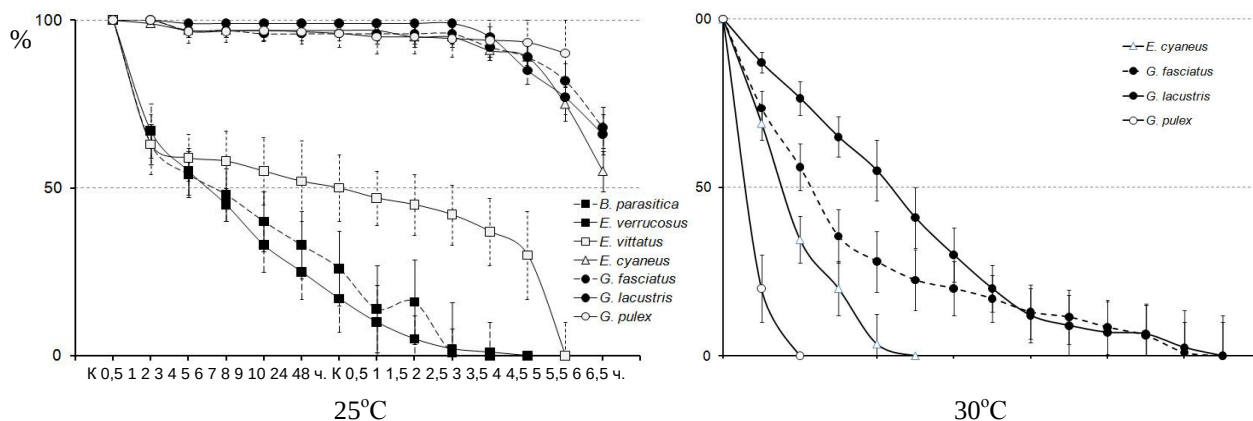


Рисунок 1. Выживаемость амфипод, экспонированных при 25 °С и 30 °С (% от контроля).

Резистентность амфипод к гипоксии. Определение резистентности амфипод к гипоксии проводили у видов: *G. lacustris*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *E. maritiji* и *O. flavus* (Тимофеев, 2000; Timofeyev, 2002; Тимофеев, Кириченко, 2004). Наибольшая устойчивость к гипоксии среди остальных байкальских литоральных видов была отмечена у *E. cyaneus* и *E. vittatus*, у которых критические уровни кислорода были равны и статистически не отличались $0,5 (\pm 0,1)$ мг $O_2/л^{-1}$. У *E. maritiji* и *E. verrucosus* критические значения содержания кислорода в воде были выше и составляли соответственно – $0,8 (\pm 0,1)$ мг $O_2/л^{-1}$ и – $1 (\pm 0,2)$ мг $O_2/л^{-1}$. Среди всех исследованных видов самыми чувствительными к недостатку кислорода были *O. flavus*, гибель которых наступала при $1,2 (\pm 0,2)$ мг $O_2/л^{-1}$. По степени повышения устойчивости к гипоксии все исследованные виды можно условно расположить в следующем порядке: *O. flavus* < *E. verrucosus* < *E. maritiji* < *E. vittatus* = *E. cyaneus* < *G. fasciatus* = *G. lacustris*.

Токсикорезистентность амфипод. Определение токсикорезистентности амфипод оценивали экспозицией в растворах $CdCl_2$ различных концентраций. В экспериментах использовали виды: *E. vittatus*, *E. verrucosus*, *E. maritiji*, *E. cyaneus*, *G. fasciatus*, *O. flavus* и *G. lacustris* (Тимофеев, 2000; Тимофеев и др., 2006; Timofeyev et al., 2008). На основе рассчитанных LC_{50} составлены сравнительные ряды по токсикорезистентности исследованных видов: *O. flavus* ($1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) < *E. maritiji* ($8,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) < *E. cyaneus* ($1,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) < *E. verrucosus* ($1,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л) < *G. lacustris* ($4,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) < *E. vittatus* = *G. fasciatus* ($5,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

1.3. Резистентные способности амфипод при изменении уровня растворенного кислорода

Основной особенностью экосистемы Байкала является равномерное и высокое насыщение воды кислородом. Большинство видов, обитающих в Байкале, на протяжении всей

своей жизни не сталкиваются с критическими понижениями уровня кислорода, в отличие от обитателей палеарктических озер, в которых заморные явления широко распространены. Исходя из этого, было предположено, что резистентные способности байкальских видов могут иметь существенную зависимость от высокого уровня растворенного кислорода. В данном разделе работы оценивали возможность и степень изменения термо- и токсикорезистентных способностей амфипод при ухудшении кислородных условий.

Влияние пониженного содержания кислорода на терморезистентность. Оценку терморезистентных способностей амфипод при разных уровнях содержания кислорода оценивали у 3-х байкальских видов: *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *E. cyaneus* – и палеарктического *G. lacustris* (Тимофеев, Кириченко, 2004; Тимофеев и др., 2005).

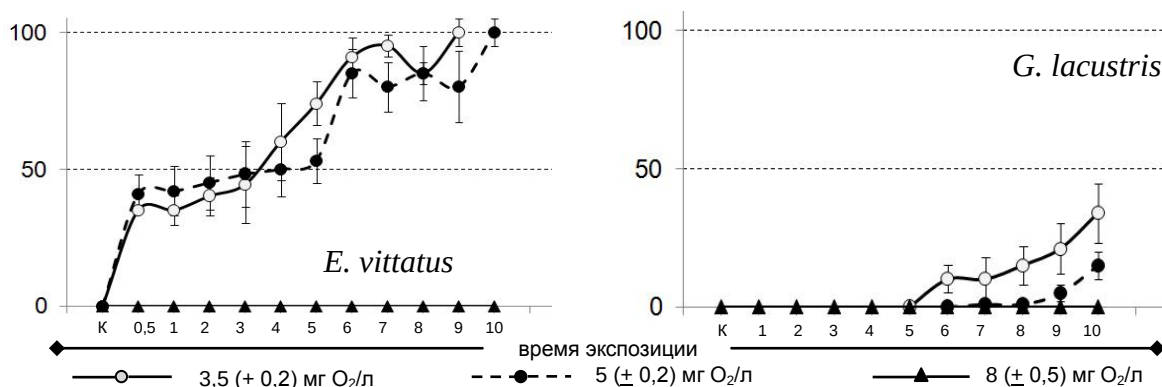


Рисунок 2. Выживаемость амфипод, экспонированных при температуре 25 °C (в % от контроля).

Экспозицию амфипод проводили в течение 10 часов при температуре 25 °C в воде с различным содержанием кислорода. Минимальный уровень составлял 3,5 (±0,2) мг O₂/л, средняя концентрация 5(±0,2) мг O₂/л, в условиях интенсивной аэрации 8 (±0,5) мг O₂/л, (приблизительно к 100% насыщения при данной температуре). Показано, что в условиях совместного действия повышенной температуры и пониженного содержания кислорода смертность амфипод достоверно возрастает (Рис. 2). При этом понижение уровня кислорода отражается на терморезистентности исследованных байкальских видов в большей степени, чем палеарктического *G. lacustris*.

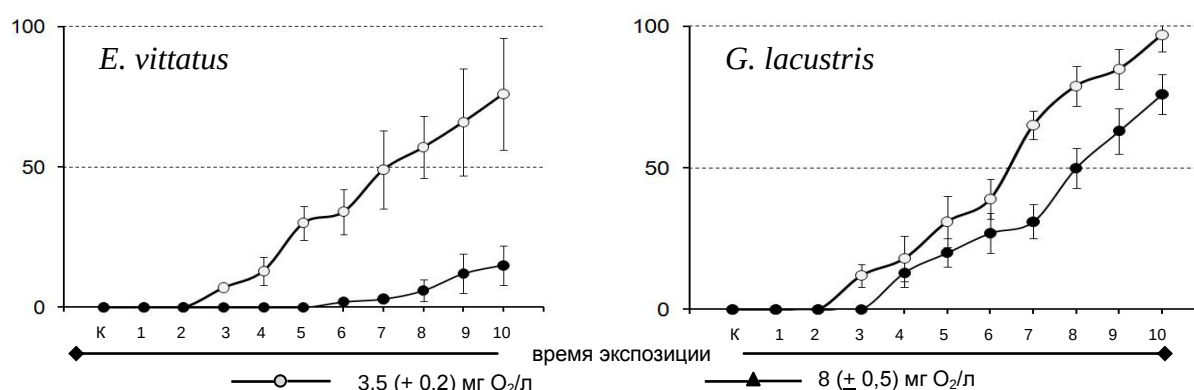


Рисунок 3. Смертность амфипод, экспонированных в растворах хлорида кадмия (15 мг/л) при различных уровнях насыщения воды кислородом (в % от контроля).

Влияние пониженного содержания кислорода на токсикорезистентность. Для оценки токсикорезистентности амфипод при разных уровнях содержания кислорода использовали *G. lacustris* и *E. vittatus*. Эксперименты проводили при температуре 6–7 °C в растворах CdCl₂ 15 мг/л. Показано, что в условиях совместного действия хлорида кадмия и пониженного содержания кислорода смертность особей обоих исследованных видов возрастает (Рис. 3).

Как и в случае с терморезистентностью, снижение уровня кислорода в среде в большей мере отражается на степени токсикорезистентности байкальского вида, чем *G. lacustris*.

1.4. Резистентные способности амфипод и их пространственно-временное распределение

Для выявления общих закономерностей проведено сопоставление рядов резистентности амфипод к исследованным факторам среды. Так, по показателям термопреферендумов исследованные виды были расположены в следующем порядке: *O. flavus* < *E. verrucosus* = *E. vittatus* < *E. cyaneus* < *E. marituji* < *G. lacustris* = *G. fasciatus* (исключение: *B. parasitica*, у которого отсутствует реакция термопреферендума). По показателям оксипреферендума: *E. verrucosus* = *E. vittatus* < *E. cyaneus* < *G. lacustris* = *G. fasciatus* (исключение: *B. Parasitica*, у которого отсутствует реакция оксипреферендума). По показателям температурной резистентности: *O. flavus* < *E. verrucosus* = *E. marituji* = *B. parasitica* < *E. vittatus* < *G. pulex* ≤ *E. cyaneus* < *G. lacustris* = *G. fasciatus*. По показателям устойчивости к гипоксии: *O. flavus* < *E. verrucosus* < *E. marituji* < *E. vittatus* = *E. cyaneus* < *G. lacustris* = *G. fasciatus*.

Из анализа сравнительных рядов устойчивости можно сделать вывод о том, что взаимное положение видов в целом сохраняется. Виды, обладающие более высокой температурной устойчивостью и большей устойчивостью к гипоксии, предпочитают, соответственно, более высокие значения температур и менее чувствительны к изменению содержания растворенного кислорода (Тимофеев, 2000; Timofeyev, 2002; Тимофеев, Кириченко, 2004). Взаимосвязь резистентных и преферентных способностей видов к температурному фактору и к содержанию кислорода, очевидно, обусловлена тем фактом, что в природе температурные и газовые характеристики среды также являются взаимозависимыми. Повышение температуры ведет к изменению содержания кислорода – за счет снижения растворимости газов. В Байкале по градиенту глубин (от литорали до абиссали) наблюдается и градиент снижения колебаний параметров температурно-газового режима. Соответственно, падает и потребность видов в развитии резистентных способностей к этим колебаниям. С увеличением глубины начинают преобладать виды амфипод, предпочитающие более низкие температуры и нуждающиеся в большем содержании кислорода.

Направление процессов видообразования в Байкале, вероятнее всего, шло из литорали в зону больших глубин, т.е. по градиенту условий. Учитывая этот факт, можно предположить, что и эволюция адаптивных способностей видов шла в направлении снижения резистентности вслед за снижением вариабельности температурно-газового режима. Как следует из приведенных данных, градиент факторов среды естественной природы напрямую определяет степень развития адаптивных способностей видов. Это, в том числе, подтверждается и тем фактом, что у всех исследованных видов не выявлено различий в показателях рН-преференции. Градиент изменений рН-среды в Байкале практически не выражен (7,5–8 рН), соответственно, и у видов нет необходимости к дивергенции адаптивных реакций к этому фактору.

Следует отметить, что общие закономерности в полной мере затрагивают только резистентные способности видов по отношению к факторам естественного происхождения. Если рассмотреть сравнительный ряд видов по токсикоустойчивости: *O. flavus* < *E. marituji* < *E. cyaneus* < *E. verrucosus* < *G. lacustris* < *E. vittatus* = *G. fasciatus*, – то можно увидеть, что он отличается от предыдущих рядов. Несмотря на то, что положение наименее резистентного вида *O. flavus* и наиболее резистентного *G. fasciatus* сохраняется, взаимный порядок остальных видов существенно изменился. В чем заключаются причины, обуславливающие большую (или

меньшую) токсикоустойчивость исследованных видов, до конца не ясно. Однако очевидно, что эти причины уже в меньшей степени связаны с эволюцией видов в условиях градиента условий. Положение *G. fasciatus* и *O. flavus* как наиболее и наименее токсикорезистентных видов в ряду, вероятно, обусловлено общей развитостью адаптивных способностей видов и активностью (или редукцией) у них механизмов неспецифической резистентности.

В целом, проведенные исследования позволили установить, что резистентные способности амфипод к влиянию факторов естественной природы (температура, насыщение воды кислородом) связаны с вертикальным распределением видов и периодом их размножения. В этой связи представляет интерес анализ взаимосвязи адаптивных характеристик видов с их горизонтальным распространением в самом Байкале и за его пределами. Для этого было проведено сопоставление рядов резистентности видов с рядом протяженности их распространения за пределы озера Байкал по системе рек Ангара – Енисей. Как и в случае градиента условий среды, наблюдаемого при смене глубин от литорали к абиссали, в системе рек Ангара – Енисей также должен проявляться градиент. Вода, вытекающая из Байкала по Ангаре, в верхнем течении реки близка к байкальской по многим своим параметрам, включая гидрохимические и температурные режимы. По мере удаления от Байкала гидрохимический состав и температурный режим постепенно меняются. Чем дальше от озера, тем больше отличаются характеристики среды обитания. Таким образом, формируется градиент условий среды, направленный от Байкала. Исходя из того, что в результате зарегулирования реки Ангара – Енисей были превращены в систему каскада водохранилищ, что повлекло за собой перестройку всех экосистем, для данного исследования были использованы материалы распределения амфипод, относящихся к периоду, предшествующему зарегулированию. По разным источникам (Базикалова, 1945, 1957; Кожов, Томилов, 1949; Грезе, 1951, 1953; Кожов, 1931, 1962 и др.), за пределами Байкала отмечали виды: *E. vittatus*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. marituji*, *G. fasciatus*. Виды *O. flavus* и *B. parasitica* вне озера отмечены не были. Причем на различных участках, в зависимости от удаленности от Байкала, количество видов сокращалось: на участке от истока р. Ангара до Иркутска отмечали все 5 видов – *E. vittatus*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. marituji*, *G. fasciatus*; на участке от Иркутска до 600 км от Байкала отмечали уже 3 вида – *E. vittatus*, *E. cyaneus*, *G. Fasciatus*; из общего числа на этом участке выпадали два вида – *E. marituji* и *E. verrucosus*; на участке от г. Братска до р. Енисей были отмечены оставшиеся три вида, однако в самом Енисее *E. vittatus* уже не был отмечен; на большей части протяженности р. Енисей встречались *G. fasciatus* и *E. cyaneus*, однако в нижнем течении Енисея последний вид не был отмечен, встречался только *G. fasciatus*, зона распространения которого протянулась вплоть до впадения Енисея в океан. По удаленности распространения от Байкала по системе рек Ангара – Енисей данные виды амфипод можно расположить в следующей последовательности: *O. flavus* < *E. verrucosus* = *E. marituji* < *E. vittatus* < *E. cyaneus* < *G. fasciatus*. Представленный ряд отражает общую порядковую закономерность, характерную для рядов отношения к температурному и кислородному факторам (Тимофеев, 2000; Тимофеев, Кириченко, 2004). Исключение составил только *B. parasitica*, отсутствие которого в Ангаре – следствие отсутствия в ней губок.

В свете вопроса о влиянии факторов среды на пространственно-временное распространение амфипод не менее интересными выглядят данные экспериментов по оценке влияния пониженного содержания растворенного кислорода на токсико- и терморезистентность. Как следует из экспериментальных материалов, снижение уровня содержания растворенного кислорода ведет к снижению резистентных способностей у всех

исследованных видов. Это влияние отражается на байкальских амфиподах в существенно большей степени, чем на палеарктических. Данные различия могут пролить свет на механизмы снижения конкурентных возможностей байкальских амфипод в условиях прибрежно-соровой зоны Байкала и причины ограничения распространения байкальских видов за пределы озера. Можно предположить, что при изменении уровня растворенного кислорода, наблюдаемого в сорах и за пределами Байкала, у эндемичных байкальских видов будет происходить снижение резистентных возможностей в большей степени, чем у палеарктических видов. Таким образом, следует ожидать увеличения чувствительности байкальских эндемиков к широкому спектру стрессовых воздействий и, как следствие, снижения способности к конкуренции с палеарктическими видами.

В заключение раздела следует сказать, что резистентные способности по отношению к температурному фактору и сопряженному с ним уровню растворенного кислорода имеют ключевое значение в формировании не только вертикальной, но и горизонтальной пространственной структуры популяций амфипод в озере Байкал, а также влияют на их распространение за пределами озера. Литоральные виды предпочитают более высокие температуры, обладают повышенной терморезистентностью и устойчивостью к гипоксии. Глубоководные виды – холодолюбивые, более чувствительны к повышению температуры и недостатку кислорода. Протяженность распространения видов за пределы Байкала тесно связана со степенью терморезистентности, устойчивости к гипоксии, показателями предпочитаемых температур и предпочитаемых уровней растворенного кислорода у каждого вида.

2. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ АМФИПОД К ВЛИЯНИЮ ФАКТОРОВ СРЕДЫ

2.1. Характеристики конститутивной активности систем резистентности у амфипод

В следующих этапах работы были рассмотрены межвидовые различия физиологических механизмов резистентности в состоянии их конститутивной активности, а также при влиянии стрессовых факторов среды. В качестве маркеров стрессового состояния использованы показатели активации важнейших систем резистентности: белков теплового шока (БТШ) и ферментов антиоксидантной системы.

2.1.1. Межвидовое сопоставление активности антиоксидантных ферментов у амфипод, активность ферментов в различных частях тела и размерно-возрастная зависимость.

Межвидовое сопоставление активности антиоксидантных ферментов у амфипод проводили у видов: *G. lacustris*, *G. tigrinus*, *G. fasciatus*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *P. cancelloides*, *O. flavus* (Тимофеев, 2004; Timofeyev, 2006; Тимофеев, 2007). Определение зависимости активности антиоксидантных ферментов у амфипод в различных частях тела и ее размерно-возрастной зависимости проводили у видов: *P. cancelloides*, *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *O. flavus* и *G. lacustris* (Timofeyev, 2006; Тимофеев, 2007).

а) *Активность антиоксидантных ферментов у различных видов амфипод*: Как показал сравнительный анализ, конститутивные уровни активности ферментов различаются у всех видов. При этом наибольшие межвидовые различия отмечены в активности каталазы и пероксидазы. Показатели активности глутатион S-трансферазы были достаточно близки. Анализ полученных данных выявил, что показатели ферментной активности у амфипод хоть и видоспецифичны, однако никак не связаны с экологическими или резистентными характеристиками самих видов (Timofeyev, 2006).

б) *Активность антиоксидантных ферментов у амфипод в различных частях тела:* Установлено, что активность пероксидазы у амфипод неравномерна. Максимальная активность отмечена в области мезасомы-метасомы, в районе уросомы активность ниже, а в районе головы и антенн – наименьшая. Активность каталазы в разных частях тела также была неравномерной. У большинства видов наиболее высокие уровни активности каталазы отмечены в районе головы и антенн. В остальных сегментах тела показатели активности каталазы были ниже и в основном достоверно не различались между собой. Активность глутатион S-трансферазы во всех сегментах тела амфипод одинаковая (Тимофеев, 2007; Timofeyev, 2006).

в) *Размерно-возрастная зависимость:* У всех байкальских видов отмечено статистически достоверное возрастание активности пероксидазы с увеличением размерно-возрастной группы рачков (Рис. 4). Напротив, у палеарктического *G. lacustris* активность фермента с возрастом снижалась. Характер возрастных изменений активности каталазы был более разнообразным (Рис. 5). Так, у вида *E. verrucosus* достоверно значимых различий в активности выявлено не было, в то время как у *E. cyaneus* отмечено повышение активности с возрастом. Иная картина отмечена у байкальского *P. cancelloides*, у которого наблюдали возрастное снижение активности. У взрослых *G. lacustris* отмечали увеличение активности каталазы.

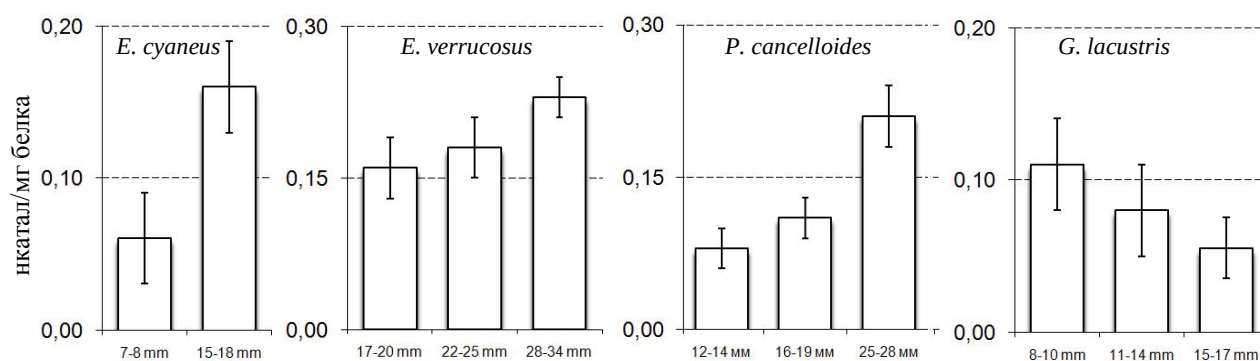


Рисунок 4. Активность пероксидазы у амфипод разных размерно-возрастных групп.

Результаты сопоставления активности глутатион S-трансферазы у представителей различных размерно-возрастных групп амфипод свидетельствуют об отсутствии каких-либо возрастных изменений (Тимофеев, 2004; Timofeyev, 2006; Тимофеев, 2007).

Анализируя возможные причины локализационной зависимости и возрастных изменений активности ферментов, необходимо рассмотреть их функциональную роль. Все исследованные ферменты участвуют в системе антиоксидантной защиты, реализуя различные ее этапы. Пероксидаза и каталаза участвуют в этапе первичной элиминации АФК, а глутатион S-трансфераза – в детоксикации вторичных продуктов свободно-радикального окисления. Следует отметить, что функциональные характеристики каталазы и пероксидазы достаточно близки: оба фермента занимаются расщеплением перекиси водорода. При этом пероксидаза имеет более широкое распространение, чем каталаза. В клетках каталаза в основном сосредоточена в пероксисомах. Таким образом, каталаза имеет функциональное значение в основном по отношению к АФК эндогенного происхождения. Пероксидаза широко распространена в клетке и за ее пределами, представлена значительным количеством изоформ, с широким диапазоном специфичности, и имеет более универсальное значение в системе защиты от АФК как эндогенного, так и экзогенного происхождения. Оценивая основные пути возможного проникновения в организм прооксидантов и экзогенных АФК,

следует отметить, что наиболее вероятно их попадание с пищей, а также в процессе газообмена. Таким образом, основными органами, через которые возможно проникновение прооксидантов и экзогенных АФК во внутреннюю среду организма, вероятно, являются жабры и зона интенсивного всасывания пищеварительной системы – органы, которые и располагаются в области метасомы и мезосомы. Видимо, здесь у амфипод и реализуется основной этап антиоксидантной защиты от экзогенных АФК, а, соответственно, и отмечается наивысшая конститутивная активность пероксидазы.

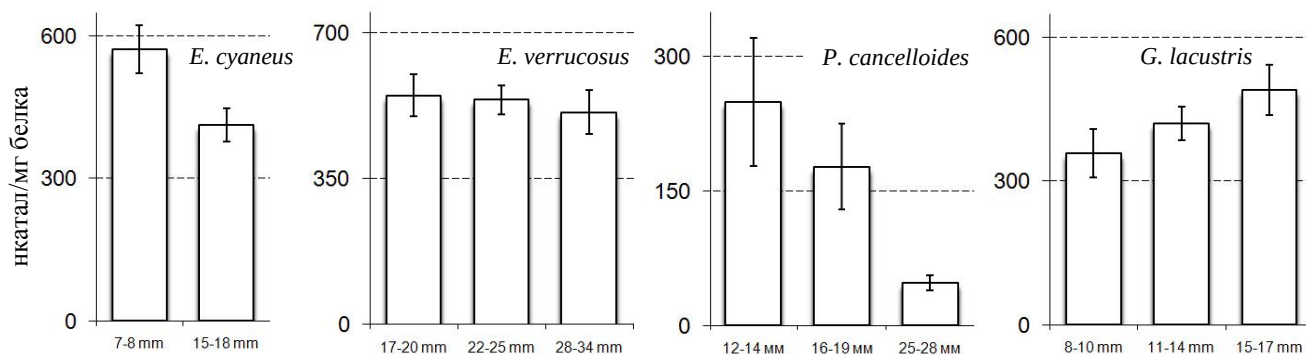


Рисунок 5. Активность каталазы у амфипод разных размерно-возрастных групп.

Причины размерно-возрастных изменений в активности исследованных ферментов не совсем понятны. Известно, что с возрастом у многих организмов происходят нарушения в деятельности антиоксидантных систем (Richter, 1994; Sohal, 1993). По мнению ряда исследователей, изменения эффективности антиоксидантных механизмов являются одними из ключевых механизмов процесса старения (Скулачев, 1996, 2001). Вероятные причины такого изменения могут быть связаны как с нарушениями в функционировании или снижением эффективности функционирования антиоксидантной системы в клетках рачков, так и с возрастными изменениями физиологических потребностей организма. Так, в случае изменения эффективности функциональных характеристик одних элементов антиоксидантной системы оно могло бы вызвать изменение активности пероксидазы и каталазы, компенсирующую потерю их действия и перераспределяющую степень антиоксидантной нагрузки. Не меняющаяся с возрастом активность глутатион S-трансферазы, вероятно, свидетельствует о достаточно стабильной роли данного фермента в метаболизме амфипод в течение всего периода жизни рачка (Тимофеев, 2006).

2.1.2. Конститутивный синтез стрессовых белков у амфипод: Для оценки конститутивного содержания стрессовых белков семейств БТШ70 и нмБТШ, иммунохимически родственных α -кристаллину, были выбраны следующие виды: байкальские *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *G. fasciatus*, *O. flavus* и палеарктические *G. lacustris* и *G. pulex* (Тимофеев и др, 2006; Тимофеев и др, 2009). Установлено, что содержание белка у разных видов различно (Рис. 6). Наибольшее количество БТШ70 было отмечено у термоустойчивых видов *G. lacustris*, *G. fasciatus* и *E. cyaneus*. Конститутивное содержание БТШ70 у более термочувствительных видов *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *G. pulex* было в несколько раз ниже, чем у термоустойчивых видов. Следует особо отметить, что у глубоководного *O. flavus* конститутивный синтез БТШ70 в детектируемых количествах в данной работе был зафиксирован менее чем в половине обработанных проб. Относительное содержание нмБТШ у разных видов также отличалось. Наибольшее количество нмБТШ вновь было отмечено у палеарктического вида *G. lacustris*. Конститутивные уровни белка у видов *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus* и *G. pulex* были близки между собой. У глубоководного *O.*

flavus минимально детектируемые количества нмБТШ были зафиксированы менее чем в половине обработанных проб. Условное расположение видов по уровням конститутивного синтеза БТШ70 дает следующий ряд: *O. flavus* < *G. pulex* < *E. verrucosus* < *E. vittatus* < *E. cyaneus* < *G. fasciatus* < *G. lacustris*. Как видно, порядковое положение видов в ряду близко к ранее показанным рядам резистентности (Тимофеев, 2000; Timofeyev, 2002; Тимофеев, Кириченко, 2004). Наибольший уровень БТШ характерен для видов с наибольшими резистентными способностями, по мере снижения резистентных способностей снижается и уровень конститутивного синтеза.

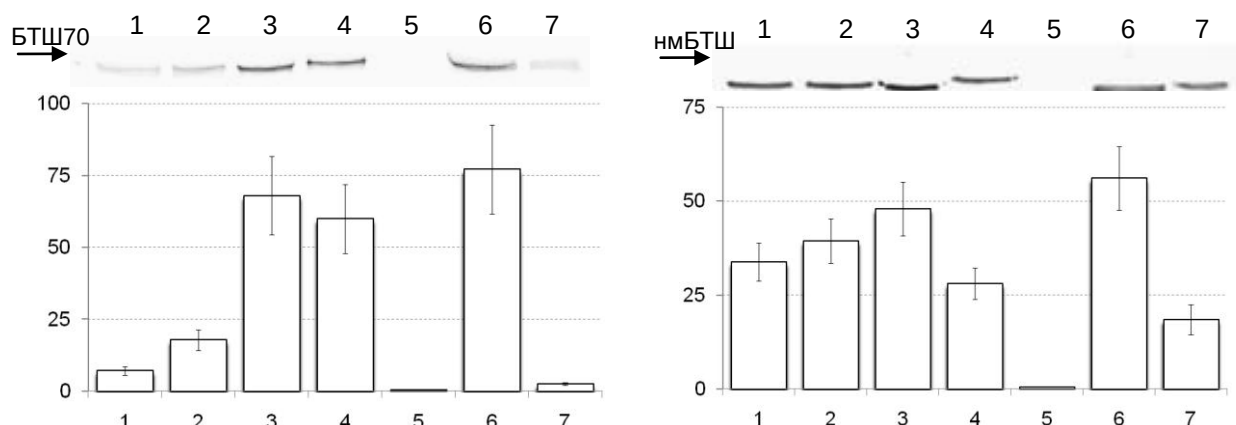


Рисунок 6. Вестерн-блоттинг (мембраны инкубированы в антителах к БТШ70 и нмБТШ) суммарных белков различных видов амфипод. Вверху – типовая мембрана, внизу – полуколичественная оценка. 1. *E. verrucosus*; 2. *E. vittatus*; 3. *E. cyaneus*; 4. *G. fasciatus*; 5. *O. flavus*; 6. *G. lacustris*; 7. *G. pulex*.

Учитывая этот факт, можно говорить, что БТШ70, вероятно, имеет большое значение при определении резистентных способностей отдельных видов амфипод. Несколько иная картина отмечена в случае нмБТШ. Первое и последнее место по уровню конститутивного синтеза белка вновь заняли виды *G. lacustris* и *O. flavus* соответственно. Остальные виды характеризовались близкими между собой показателями. Таким образом, связь между количеством конститутивного синтеза нмБТШ и резистентными способностями видов прослеживается в меньшей степени.

Известно, что белки обоих семейств постоянно присутствуют в клетках. Помимо участия в механизмах стресс-резистентности, они играют важную роль в процессах конститутивного метаболизма клеток. В этой связи следует особо отметить крайне малые уровни конститутивного синтеза белков обоих семейств БТШ у *O. flavus*. Причины низкой концентрации этих белков могут быть связаны с экологическими характеристиками вида. *O. flavus* обитает в зоне глубин с крайне стабильными условиями среды. В ходе своей жизнедеятельности представители вида не сталкиваются с необходимостью активировать резистентные процессы вслед за изменениями условий окружающей среды. Различия в уровнях конститутивного синтеза БТШ обоих семейств, несомненно, связаны с адаптивными способностями видов. Наиболее адаптивные виды характеризуются и наибольшими уровнями БТШ, даже не находясь в стрессовых условиях. Виды менее адаптивные характеризуются меньшим количеством конститутивно-синтезируемых БТШ.

2.1.3. Межвидовой полиморфизм стрессовых белков у амфипод: Для оценки возможного межвидового полиморфизма БТШ70 и нмБТШ проведен сравнительный анализ у 17 различных видов амфипод (Тимофеев и др., 2009). Выбранные виды относятся к нескольким

родам, имеющим разную степень родства: *Eulimnogammarus*, *Pallasea*, *Acanthogammarus*, *Parapallasea* и *Ommatogammarus*.

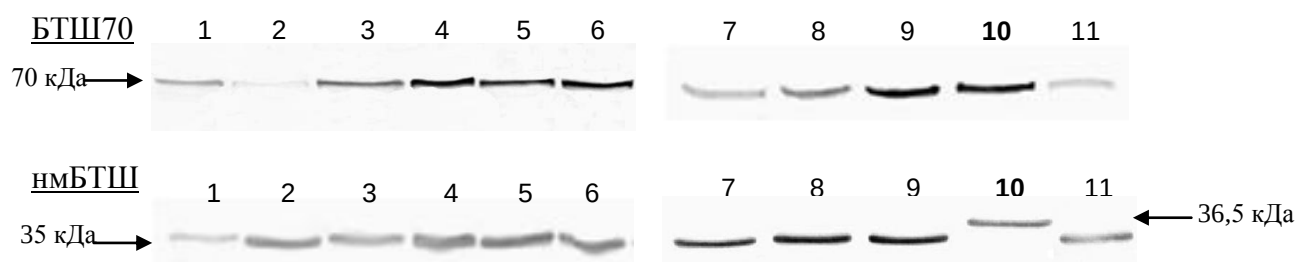


Рисунок 7. Вестерн-блоттинг суммарных белков различных видов амфипод. Мембраны инкубированы в антителах к БТШ70 и нмБТШ. 1. *Plesiogammarus martinsoni*; 2. *Parapallasea borowski*; 3. *Parapallasea puzyllii nigra*; 4. *Parapallasea grubei*; 5. *Pallasea cancellus*; 6. *Pallasea cancelloides*; 7. *Eulimnogammarus verrucosus*; 8. *Eulimnogammarus vittatus*; 9. *Eulimnogammarus cyaneus*; 10. ***Gmelinoides fasciatus***; 11. *Gammarus lacustris*.

Выбранные виды также различались и по своим экологическим характеристикам, в частности по зонам обитания. Из представленных материалов (Рис. 7) хорошо видно, что молекулярные массы БТШ70 у всех исследованных видов совпадают и лежат в области 70 кДа. Иную картину наблюдали для нмБТШ, молекулярные массы большинства видов были близки и лежали в зоне 35 кДа, однако у *G. fasciatus* молекулярная масса белка соответствует 36,5 кДа. Таким образом, для амфипод характерны не только количественные, но и в случае с нмБТШ качественные различия в синтезе стрессовых белков. Особый интерес представляет тот факт, что среди разнообразных видов существенно выделяется только *G. fasciatus*. Это может рассматриваться в свете гипотезы о его реликтовом происхождении (Тахтеев, 2000). Возможно, что эволюционное становление *G. fasciatus* шло отдельно от основной массы байкальских и родственных им видов. Таким образом, у данного вида на каком-то этапе могла произойти дивергенция по структуре и молекулярной массе нмБТШ. Обнаруженные в ходе работы факты могут являться, в том числе, и свидетельством в пользу особого пути эволюции данного вида в Байкале (Тимофеев и др., 2009).

2.2. Физиологические реакции амфипод при температурном стрессе

2.2.1. Температурно-индуцированные изменения активности антиоксидантных ферментов у амфипод: Проведена оценка характера влияния температуры на активность антиоксидантных ферментов у видов: *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *P. cancelloides*, *G. fasciatus*, *O. flavus*, *G. lacustris* и *G. pulex* (Тимофеев и др., 2008; Timofeyev et al., 2009).

Исследование показало, что температурная экспозиция по-разному влияет на активность пероксидазы у различных видов амфипод. Так, у байкальского *E. verrucosus* было отмечено достоверное, более чем двукратное, снижение активности фермента при 20 °C в течение 3 часов экспозиции с 0,28 (±0,03) до 0,13 (±0,03) нкатал/мг белка и 25 °C с 0,28 (±0,03) до 0,07 (±0,02) нкатал/мг белка. У *E. cyaneus* экспозиция при температуре 20 °C не вызывала статистически достоверных изменений в активности фермента даже на протяжении 3 суток эксперимента. Повышение температуры до 25 °C приводит к снижению активности фермента с 0,15 (±0,02) до 0,07 (±0,02) нкатал/мг белка. При экспозиции *P. cancelloides* при температуре 20 °C и 25 °C наблюдали снижение активности фермента после 6 часов эксперимента с 0,10 (±0,01) до 0,05 (±0,02) нкатал/мг белка. Экспозиция термоустойчивого *G. fasciatus* при 25 °C не

приводила к достоверным изменениям активности пероксидазы. У палеарктических *G. lacustris* и *G. pulex*, экспонированных при 20 °С и 25 °С, не отмечали достоверных изменений в активности пероксидазы в ходе всего 3-суточного эксперимента. Термочувствительных амфипод *O. flavus* экспонировали только при температуре 20 °С, поскольку более высокие температуры приводили к их быстрой гибели. Как показали исследования, в условиях температурного воздействия активность пероксидазы у отдельных экземпляров *O. flavus* колебалась в широком диапазоне, однако достоверной картины повышения или, напротив, понижения активности отмечено не было.

В отличие от пероксидазы, активность каталазы у всех амфипод (за исключением *O. flavus*) в условиях температурной экспозиции возрастала. Определение активности глутатион S-трансферазы у амфипод, экспонированных при различных температурах, позволило выявить большое разнообразие реакций. У байкальского вида *E. verrucosus* было отмечено достоверное снижение активности глутатион S-трансферазы при экспозиции амфипод при обеих температурах уже через 6 часов эксперимента с 9,5 (± 1) до 6 ($\pm 0,5$) нкатал/мг белка. У *E. cyaneus* экспозиция при обеих температурах не вызывала статистически достоверных изменений в активности глутатион S-трансферазы. У байкальского вида *P. cancelloides* были отмечены близкие показатели падения активности глутатион S-трансферазы при температурной экспозиции с 11 ($\pm 0,3$) до 8 ($\pm 0,5$) нкатал/мг белка. Экспозиция *G. pulex* при 25 °С не вызывала существенных изменений в активности фермента. Экспозиция термоустойчивого *G. fasciatus* при 25 °С вела к достоверному повышению активности глутатион S-трансферазы уже через три часа экспозиции с 6 ($\pm 0,5$) до 8,5 (± 1). У палеарктического *G. lacustris*, экспонированного при 20 °С, не отмечали достоверных изменений в активности глутатион S-трансферазы в ходе всего эксперимента. Повышение температуры до 25 °С вело к достоверному росту активности после 3 часа экспозиции с 7,9 ($\pm 0,5$) до 9 ($\pm 0,5$) нкатал/мг белка. У термочувствительных *O. flavus*, экспонированных при температуре 20 °С, достоверных изменений в активности фермента не выявлено.

Следует отметить, что характер изменения активности ферментов у экспонированных при гипертермии амфипод не был линейным, наблюдались как периоды повышения ферментной активности, так и периоды снижения. С учетом этого факта был проведен анализ, в котором оценивали общий показатель направления изменений активности в ходе экспозиции (рост или снижение относительно контроля) у каждого вида (Табл. 1).

Как видно из представленных материалов, прослеживается хорошо выраженные различия у видов, отличающихся по своим резистентным способностям (Тимофеев и др., 2008; Timofeyev et al., 2009; Павличенко и др., 2009). Общей реакцией является температурно-индуцированное увеличение активности каталазы, отмеченное у большинства видов (исключение – *O. flavus*). Иная картина наблюдается при оценке активности пероксидазы. Температуры 20–25 °С не вызывали каких-либо изменений в активности фермента у наиболее термоустойчивых амфипод (*G. lacustris*, *G. fasciatus*). Экспозиция менее устойчивых видов (*E. cyaneus*, *P. cancelloides*, *E. verrucosus*) при обеих температурах вела к снижению активности пероксидазы. Иная картина отмечена у наиболее термочувствительных амфипод вида *O. flavus*, у которых изменения в реакции пероксидазы выражены не были. Анализ активности глутатион S-трансферазы вновь позволил выявить прямую зависимость направления активности фермента от терморезистентного статуса вида. У наиболее термоустойчивых *G. fasciatus* и *G. lacustris* отмечено повышение активности фермента (при максимальном значении температуры) или отсутствие реакции (при минимальном значении температуры).

Таблица 1. Направления изменений активности антиоксидантных ферментов у пресноводных амфипод, инкубированных при повышенных температурах.

	Каталаза		Пероксидаза		Глутатион S-трансфераза	
	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C
Виды						
<i>G. lacustris</i>	↔	↑	↔	↔	↔	↑
<i>G. fasciatus</i>	▨	↑	▨	↔	▨	↑
<i>G. pulex</i>	▨	↑	▨	↔	▨	↔
<i>E. cyaneus</i>	↑	↑	↔	↓	↔	↔
<i>P. cancelloides</i>	↑	↑	↓	↓	↓	↓
<i>E. verrucosus</i>	↑	↑	↓	↓	↓	↓
<i>O. flavus</i>	↔	▨	↔	▨	↔	▨

 Повышение активности
  Снижение активности
  Нет изменений

У других видов по мере снижения их терморезистентных способностей отмечали либо отсутствие реакции, либо падение активности глутатион S-трансферазы. У вида *O. flavus* вновь не отмечено какой-либо выраженной реакции глутатион S-трансферазы на температурные воздействия.

Рассматривая причины выявленных различий, можно предположить, что общее для большинства видов увеличение активности каталазы связано с повышением образования эндогенных АФК. Рост эндогенных АФК у амфипод также может быть вызван повышением интенсивности клеточного дыхания при температурной экспозиции, и (или) вызванное этим воздействием увеличение количества сбоев в процессе метаболизма кислорода. Показанное в работе увеличение активности каталазы в той или иной степени присуще всем исследованным видам (исключение – *O. flavus*). При этом различия по терморезистентности напрямую коррелируют и с порогом активации каталазы. Так, у байкальских видов, начиная с *E. Cyaneus*, он отмечен уже при 20 °C, в то время как у устойчивого палеарктического *G. lacustris* – только при 25 °C. Вероятным объяснением этого факта служит то, что температура 20 °C является обычной температурой обитания данного вида в естественной среде. Таким образом, при данной температуре у *G. lacustris* не происходит сбоев в метаболизме АФК, что, по-видимому, наблюдается у байкальских видов. Причины снижения активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы, видимо, связаны с неспособностью термочувствительных видов поддерживать необходимый уровень активности метаболической активности антиоксидантной системы при повышении температуры. Вероятно, снижение активности ферментов свидетельствует о попытках организма перейти на менее затратные механизмы поддержания жизнедеятельности с концентрацией основных ресурсов на систему защиты от образования эндогенных АФК. Можно предполагать, что у исследованных видов осуществляются разные стратегии борьбы с эндогенно-образованными АФК. При эндогенном образовании АФК первостепенное значение имеет каталаза. Таким образом, стратегия борьбы термочувствительных видов осуществляется за счет поддержания ее высокой активности – при сниженной активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы. Напротив, стратегия термоустойчивых видов направлена на

поддержание активности всех антиоксидантных систем, включая как каталазу, так и пероксидазу, и глутатион S-трансферазу. Одновременная активация всех ферментных систем, вероятно, способствует более эффективной элиминации как первично образованных эндогенных АФК, так и вторичных продуктов их окисления, определяя большую устойчивость видов к температурному стрессу. Причины и механизмы проявления двух различных стратегий не ясны – вероятнее всего, они связаны с большей способностью по использованию дополнительных источников энергии у термоустойчивых видов, которые недоступны термочувствительным видам.

Особенностью наиболее термочувствительных глубоководных амфипод *O. flavus* является то, что при воздействии температурного стресса они не придерживаются какой-либо из описанных адаптивных стратегий. У них не происходит роста активности каталазы или снижения активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы. Вероятнее всего, способность к направленным изменениям активности ферментов антиоксидантной системы в условиях температурного стресса у данных видов редуцирована. Это может являться следствием эволюции видов в зоне глубин, характеризующихся постоянно-стабильным низкотемпературным режимом, без каких либо колебаний условий в течение длительного периода времени. Отсутствие выраженной стратегии использования антиоксидантной системы при воздействии температурного стресса, вероятно, и является одним из факторов, обуславливающих повышенную чувствительность данных видов к его негативному влиянию (Тимофеев и др., 2008; Timofeyev et al., 2009).

2.2.3. Температурно-индуцированные изменения в синтезе стрессовых белков у амфипод

Оценку влияния температурного воздействия на содержание стрессовых белков проводили у видов: *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *G. fasciatus*, *O. flavus*, *G. lacustris*, и *G. pulex* (Тимофеев и др., 2003; Тимофеев и др., 2006; Тимофеев и др., 2008).

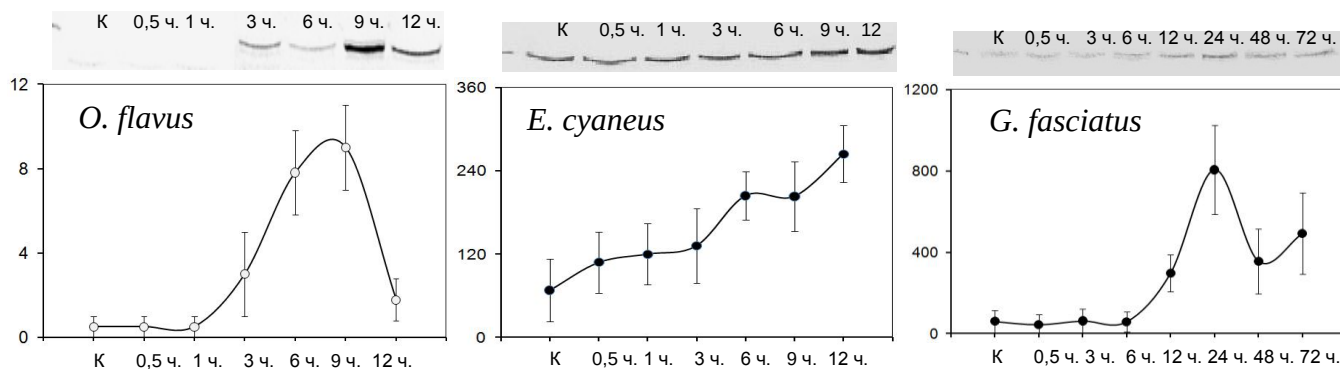


Рисунок 8. Вестерн-блоттинг суммарных белков амфипод, экспонированных при температуре 25(20) °С. Мембраны инкубированы в антителах к БТШ70. Вверху – типовая мембрана, внизу – усредненная полуколичественная оценка (в нг белка).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что температурные воздействия существенным образом влияют на синтез БТШ у амфипод. При этом многократное температурно-индуцированное увеличение количества БТШ70 отмечено у всех исследованных байкальских и палеарктических видов (Рис. 8). У большинства исследованных видов (за исключением *E. cyaneus* и *G. pulex*) также отмечено и увеличение уровня нмБТШ (Рис. 9). Среди исследованных амфипод особое внимание привлекают материалы экспериментов с *O. flavus*. В экспериментах показано, что у данного вида БТШ70 и нмБТШ практически не идентифицировались в контроле, а также до 3-го часа экспонирования при 20

°С. В эти периоды фиксируемое количество обоих белков наблюдали не более чем в 50% исследованных проб, в остальных пробах белки не фиксировались. Впервые устойчивую индукцию синтеза БТШ70 и нмБТШ фиксировали только через 3 часа экспозиции. Наибольший уровень белка отмечали после 9 часов экспозиции. Далее, к 12 часам уровень белка несколько снижался, но оставался по-прежнему выше контроля.

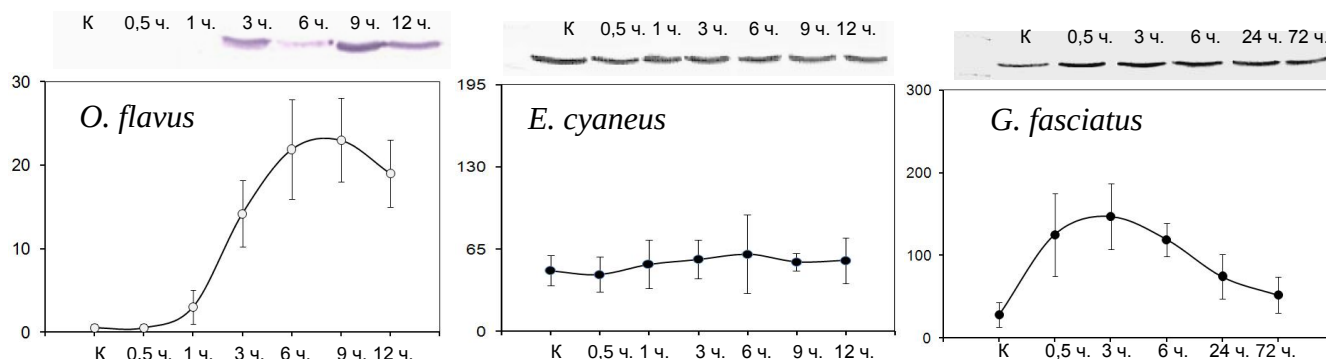


Рисунок 9. Вестерн-блоттинг суммарных белков амфипод, экспонированных при температуре 25(20) °С. Мембраны инкубированы в антителах к нмБТШ. Вверху – типовая мембрана, внизу – усредненная полуколичественная оценка (в нг белка).

Анализировать полученные результаты следует в свете известных данных о функциональном значении БТШ, а также механизмов температурного воздействия на клеточном уровне. Известно, что стрессовое влияние температуры сказывается на клеточном уровне через изменение скорости биохимических реакций, и в первую очередь – через нарушение структуры биохимических соединений, зависящих от «слабых» химических связей (водородных, ионных, гидрофобных и др.). Среди них механизмы формирования высших уровней структуры белков, мембран, комплексов ферментов и лиганд, взаимодействие нуклеиновых кислот и др. (Хочачка, Сомеро, 1988; Плакунов, 2001). Несомненно, в условиях температурного стресса все эти нарушения должны усиливаться и в клетках амфипод.

Повышение уровня БТШ напрямую связано с необходимостью противодействия или компенсации указанных негативных последствий температурного воздействия. БТШ выполняют серию протекторных и регуляторных функций в клетках, реализуемых как в конститутивной, так и в стресс-индуцированных формах. Белкам обоих семейств БТШ70 и нмБТШ присущ ряд общих функций. Среди них основная – шапероновая активность и участие в процессах фолдинга, функция предотвращения агрегации частично денатурированных белков и формирования нерастворимых белковых соединений, а также участие в процессах деградации и элиминации поврежденных белков. С другой стороны, функциональное значение БТШ70 шире, чем у нмБТШ. Белки семейства БТШ70 также обладают регуляторными и транспортными функциями, способствуют процессам переноса белков через мембраны. По-видимому, многофункциональность белков семейства БТШ70 делает их более значимыми и для защиты от температурного стресса.

В таблице 2 представлены данные по количественному сравнению уровней БТШ70 у литоральных амфипод, подвергнутых температурной экспозиции. Как видно из таблицы, прослеживается хорошо выраженная зависимость показателя термоустойчивости видов и количества синтезируемого БТШ70. Так, наибольшие значения содержания БТШ70 отмечаются у термоустойчивых видов *G. lacustris* и *G. fasciatus*. Понижение уровня накопления БТШ70 соответствует и снижению термоустойчивости видов. Для нмБТШ характерна схожая закономерность, хотя и выраженная в меньшей степени. Наиболее

Таблица 2. Сравнительный анализ показателей содержания БТШ у литоральных амфипод, экспонированных в течение 6 и 24 часов при температуре 25 °С (в нг белка).

Виды	БТШ70				нмБТШ			
	6 ч	±	24 ч	±	6 ч	±	24 ч	±
<i>G. lacustris</i>	292	91	1305	210	159	59	1210	249
<i>G. fasciatus</i>	298	48	356	90	119	20	94	27
<i>E. cyaneus</i>	204	35	264	41	46	17	43	15
<i>G. pulex</i>	18	6	49	9	25	8	14	5
<i>E. vittatus</i>	33	7	-	-	196	60	-	-
<i>E. verrucosus</i>	21	9	86	25	78	14	44	12

терморезистентные виды *G. lacustris* и *G. fasciatus* также характеризуются высокими индуцированными уровнями нмБТШ, в то время как у остальных видов показатели заметно ниже. Таким образом, можно говорить, что усиление продукции БТШ70 (в большей степени) и нмБТШ (в меньшей степени) оказывают влияние на устойчивость амфипод к деструктивным температурным

воздействиям. Виды, обладающие большими возможностями по сверхпродукции БТШ, обладают и большими терморезистентными способностями. Напротив, виды, ограниченные в своих возможностях по синтезу БТШ, более чувствительны к температурному стрессовому воздействию. Особо следует отметить характер реакции БТШ у наиболее термочувствительных амфипод вида *O. flavus*. Как следует из полученных материалов, у данных амфипод отмечен крайне незначительный (слабо детектируемый) уровень конститутивного синтеза БТШ обоих семейств. В условиях температурного стресса рост количества БТШ начинается только на 3-м часу экспозиции. До этого периода количество синтезируемого БТШ70 и нмБТШ в клетках амфипод остается на предельно низких (слабодетектируемых) уровнях. Однако даже в случае начала синтеза БТШ его количества очень малы. Как показывает сопоставление в случае с БТШ70, даже максимальные уровни накопленного белка после 9 и 12 часов экспонирования у *O. flavus* ниже конститутивного уровня БТШ70 у других видов, например у литорального *E. cyaneus* (Рис. 10).

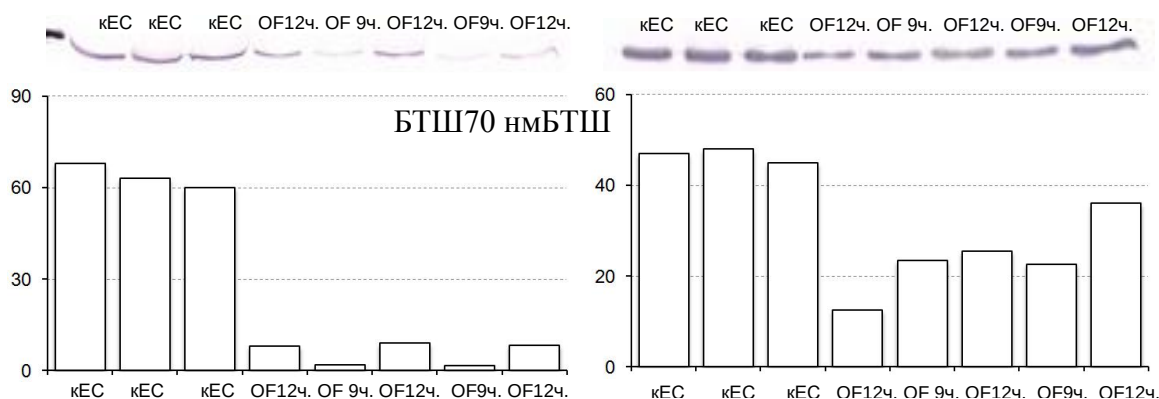


Рисунок 10. Вестерн-блоттинг суммарных белков *E. cyaneus* контроль (кЕС) и *O. flavus*, экспонированных при температуре 20 °С в течение 9 и 12 часов (OF 9ч, OF 12ч). Мембраны инкубированы в антителах к БТШ70 и нмБТШ. Вверху – мембрана, внизу – полуколичественная оценка (в нг белка).

Максимально индуцированные уровни нмБТШ у *O. flavus* также были малы и не превышали конститутивные уровни литоральных амфипод. Анализируя данные факты, следует отметить, что в самые первые часы стрессового воздействия организм подвержен наибольшим деструктивным последствиям. Именно в этот период происходят срочные перестройки метаболических процессов, позволяющие впоследствии либо адаптироваться к

новым условиям, либо, в случае активной преферентной реакции, – и пережить эти изменения, и найти более благоприятные условия.

Как установлено в данной работе, у литоральных видов усиление синтеза БТШ происходит уже в первые минуты и часы экспозиции, что позволяет им легче переносить наиболее тяжелый период стрессовой реакции. У глубоководных амфипод в этот период организм и клетки остаются без защиты перед деструктивными последствиями температурного воздействия.

Причины проявления таких различий в стресс-реакции у литоральных и глубоководных амфипод являются следствием различий в температурных режимах литорали и зоны больших глубин. В литорали амфиподам постоянно приходится испытывать различные изменения температуры среды, имеющие как сезонный, так и суточный характер. Обитание в условиях, характеризующихся относительно широким диапазоном температур, требует активных механизмов биохимической адаптации к этим температурным изменениям на клеточном уровне. Наличие дополнительного «запаса» – повышенного количества БТШ70 и нмБТШ в естественных условиях – в случае изменения этих условий должно дать виду резистентные преимущества.

Для проверки данного заключения был проведен анализ уровней БТШ у представителей различных популяций наиболее термостойкого байкальского вида *G. fasciatus*. Для данного сравнительного исследования были выбраны амфиподы из популяций разных районов Байкала, с контрастными температурными условиями. В частности, представители популяции залива Большие Коты (Южный Байкал) с температурой литорали 6 °С; представители популяции, населяющей горячие источники мыса Котельниковский (Северный Байкал) с температурой воды 29 °С; представители популяции, населяющей Чивыркуйский залив (Северо-восточный Байкал) с температурой воды 25 °С. Как видно из приведенных материалов (Рис. 11), уровни БТШ напрямую связаны с температурой обитания. У амфипод, представителей типичного Байкала, со среднегодовой температурой, близкой к 6 °С, отмечены и наименьшие уровни синтеза как БТШ70, так и нмБТШ.

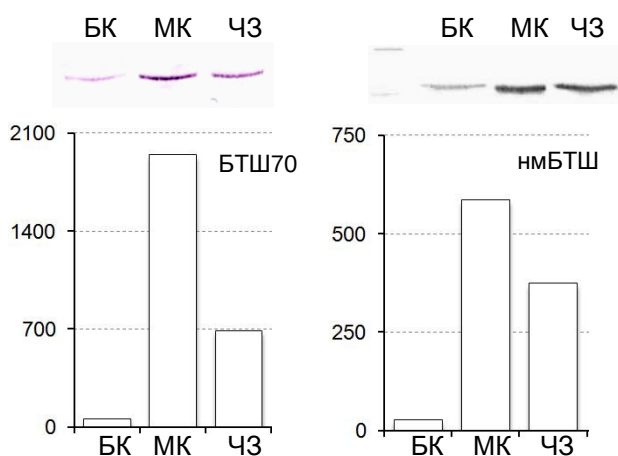


Рисунок 11. Вестерн-блоттинг суммарных белков *G. fasciatus* из различных районов обитания. Мембраны инкубированы в антителах к БТШ70 и нмБТШ. Вверху – типовая мембрана, внизу – полуколичественная оценка (в нг белка).

БК – пос. Большие Коты, Южный Байкал (6 °С),

МК – мыс. Котельниковский, Северный Байкал (Горячий источник, темп. 29 °С),

ЧЗ – Чивыркуйский залив, Северный Байкал (мелководный залив, темп. 25 °С)

Повышение температуры среды обитания ведет к увеличению базового уровня обоих БТШ. Наибольшие уровни выявлены у представителей популяции горячих источников с мыса Котельниковский. Эти наблюдения вполне соответствуют и ранее отмеченным конститутивным уровням БТШ70. Таким образом, попадая в измененные условия среды, виды, имеющие большой «запас» БТШ, могут с меньшими последствиями пережить первоначальное стрессовое состояние и покинуть неблагоприятные условия или, если такой

возможности нет, адаптировать свой метаболизм за счет перестройки физиологических реакций.

2.3. Физиологические реакции амфипод при оксидативном воздействии

2.3.1. Изменение уровня перекисного окисления липидов, содержания перекиси водорода и активности антиоксидантных ферментов у амфипод при оксидативном воздействии

Оксидативный стресс индуцировали экспозицией амфипод в растворах гуминосодержащих препаратов: «Schwarzer See NOM» (IGB, Germany) и «Sanctuary pond NOM» (Burlington, Canada). Причины использования гуминосодержащих препаратов для индукции окислительного стресса связаны с тем, что в естественной среде растворенные гуминовые вещества являются одними из источников образования свободных АФК (Herut et al., 1998; Steinberg, 2003; Paul et al., 2004). При фотолизе растворенные гуминовые вещества, в том числе и использованные в данной работе, являются продуцентами широкого спектра АФК (Herut et al., 1998; Steinberg, 2003; Paul et al., 2004). Таким образом, продуцируемое ими окислительное воздействие наиболее приближено к естественному воздействию, оказываемому в той или иной степени на все водные организмы. На первом этапе работы, с целью оценки наличия окислительных повреждений в клетках, а следовательно, и факта оксидативного стресса у амфипод, проводили измерение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ). Также определяли изменение концентрации перекиси водорода в организме. На втором этапе работы проводили оценку изменения показателей активности пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы.

Определение уровня ПОЛ проводили у байкальских *E. cyaneus*, *E. verrucosus* и палеарктических *G. tigrinus*, *G. lacustris* (Тимофеев и др., 2002, 2003; Timofeyev et al., 2006). Оценку уровня перекиси водорода проводили у видов *E. cyaneus* и *G. lacustris* (Timofeyev et al., 2006). Оценку активности антиоксидантных ферментов проводили у 8 видов, из них, помимо уже указанных, использовали байкальских *P. cancelloides*, *G. fasciatus*, *O. flavus* и палеарктического *G. pulex* (Тимофеев и др., 2003; Timofeyev et al., 2004; Timofeyev, Steinberg, 2006; Timofeyev et al., 2006; Тимофеев, 2006, 2008, 2009). Как показали проведенные эксперименты, экспозиция *E. cyaneus*, *G. lacustris* и *G. tigrinus* в растворах «Schwarzer See NOM» вела к достоверному росту уровня ПОЛ. При этом у байкальского *E. cyaneus* в растворах с меньшей концентрацией начало роста было отмечено через 2 часа, а после 6 суток уровень ПОЛ снижался до контрольных значений. У палеарктических видов снижения уровня ПОЛ не происходило. Достоверный рост уровня ПОЛ отмечен и при экспонировании *E. cyaneus* и *E. verrucosus* в растворах препарата «Sanctuary pond NOM». Определение изменения уровня перекиси водорода показало, что у экспонированного байкальского *E. cyaneus* происходит снижение концентрации перекиси водорода в тканях. При этом вновь наблюдалась зависимость «доза – эффект». В растворах с меньшей концентрацией препарата достоверное снижение было зафиксировано только после 6 суток экспозиции, а в растворах с большей концентрацией снижение отмечали уже через полчаса эксперимента. Иная картина была отмечена у палеарктического *G. lacustris*, у которого был отмечен многократный рост концентрации (Рис. 12). Таким образом, следует сказать, что экспозиция амфипод в растворах гуминосодержащих препаратов приводила к достоверному росту интенсивности процессов ПОЛ, а также изменениям в уровне перекиси водорода и активности антиоксидантных ферментов.

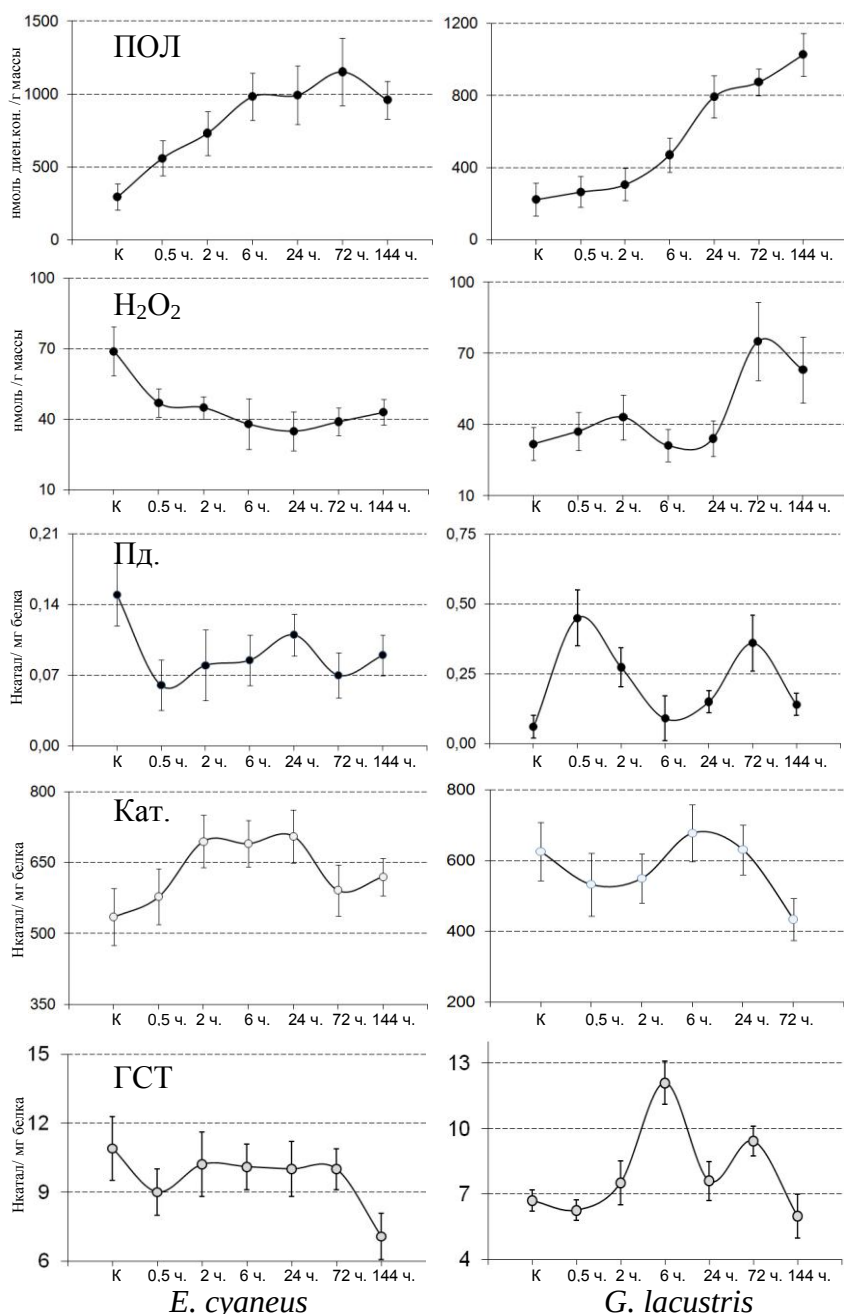


Рисунок 12. Уровни ПОЛ, H_2O_2 и активность пероксидазы (Пд), каталазы (Кат) и глутатион S-трансферазы (GST) у амфипод, экспонированных в растворах «Schwarzer See NOM» концентраций 60 мг/л.

высокого уровня активности фермента. Далее, после осуществления необходимых метаболических изменений в клетке следует вторичный подъем активности пероксидазы и поддержание ее на повышенном уровне.

Из палеарктических видов наиболее полный цикл исследования выполнен с *G. lacustris* при его экспонировании в растворах «Schwarzer See NOM» (Рис. 12). Сопоставив материалы оценки активности пероксидазы у данного вида с результатами измерения активности глутатион S-трансферазы, накоплением перекиси водорода, а также уровнем ПОЛ, можно отметить следующее: уровень ПОЛ остается соответствующим контрольному после 0,5 и 2 часов и начинает увеличиваться только после 6 часов экспозиции амфипод в растворах с

Повышение интенсивности ПОЛ свидетельствует о возникновении окислительного стресса в клетке, что выражается в общем росте процессов перекисления липидных компонентов мембранных структур клетки и ведет к их повреждению – и, как результат, к понижению клеточной жизнеспособности.

У большинства исследованных амфипод можно выделить два основных этапа реакции антиоксидантной системы на воздействие окислительного стресса. При этом четко выражаются различия в механизмах реакции у байкальских и палеарктических видов. Наиболее сильные различия в направлениях реакции ферментов пероксидазы и глутатион S-трансферазы. Так, у палеарктических амфипод первый этап включает активацию пероксидазы и длится до периода кратковременного спада. Период спада, следующий после многократного роста активности, связан, вероятно, с исчерпанием запаса ресурсов, необходимых для поддержания

обеими использованными концентрациями; уровень глутатион S-трансферазы также не изменяется в первые часы экспозиции, достоверный рост наблюдается только на 6-й час в случае высокой концентрации и на 3-й день – в случае низкой. Таким образом, можно предположить, что в период первоначального всплеска активности пероксидазы, а именно в период мобилизации запасных ресурсов, клетка способна сдерживать негативное окислительное воздействие препарата, поддерживая уровень ПОЛ и активность глутатион S-трансферазы на допустимом уровне. Исчерпание ресурса запаса дает толчок к началу роста показателя ПОЛ, а, следовательно, к росту разрушения мембранных структур клетки и активации глутатион S-трансферазы, элиминирующей вторичные продукты ПОЛ. Последующий рост уровня активности пероксидазы, вероятно, обусловлен перестройкой метаболических процессов клетки. Однако, как видно из дальнейшей картины, эффективность действия вторичного подъема активности пероксидазы заметно ниже. Об этом свидетельствует тот факт, что при одинаковых уровнях активности пероксидазы при 2-часовом и 3-дневном (72 часа) периодах экспозиции степени повреждений липидных клеточных структур (выраженные через уровни ПОЛ и активности глутатион S-трансферазы) различаются. Также во второй стадии развития стресс-реакции происходит сбой в метаболизме перекиси водорода, и наблюдается достоверный рост её концентрации.

У изученных эндемичных байкальских амфипод наблюдается иной механизм реакции антиоксидантной системы, отличный от такового у палеарктических видов (Рис. 12). При схожих процессах окислительного поражения липидных структур, характеризующихся возрастанием уровня ПОЛ, у большинства байкальских амфипод происходит снижение активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы (у палеарктических видов они активируются или остаются стабильными). При этом активность каталазы, напротив, повышается. Интересно отметить, что у байкальских амфипод, в отличие от палеарктических, наблюдается достоверное снижение уровня накопления перекиси водорода в тканях.

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить два различных направления реакции амфипод на окислительное воздействие, отличающееся у палеарктических и байкальских видов (Timofeyev et al., 2006). Исключением из общей картины являются амфиподы вида *O. flavus*. При окислительном воздействии данный вид не проявлял какой-либо выраженной направленности реакций антиоксидантных ферментов. Как и в случае с температурным стрессом, у рачков данного вида отмечали широкий разброс индивидуальных показателей активности, которые при этом достоверно не отличались от контроля. Это наблюдение позволяет говорить о слабой выраженности антиоксидантной реакции ферментных систем данного вида на стрессовое окислительное воздействие. Причины этого могут быть связаны с уже упоминаемыми ранее особенностями обитания *O. flavus*, приуроченного к стабильным условиям среды больших глубин озера Байкал, характеризующихся отсутствием выраженных колебаний факторов среды.

2.3.2. Изменения в синтезе стрессовых белков у амфипод при окислительном стрессе

Для оценки влияния окислительного воздействия на содержание стрессовых белков у амфипод были использованы следующие виды: байкальские *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *G. fasciatus* и палеарктические *G. lacustris* и *G. pulex* (Тимофеев и др., 2002, 2003, 2006; Timofeyev et al., 2004; Bedulina et al., 2010). Проведенные исследования показали (Рис. 13–14), что при окислительном воздействии для всех исследованных амфипод характерно увеличение

количества БТШ обоих семейств (Тимофеев и др., 2002, 2003, 2006; Timofeyev et al., 2004; Bedulina et al., 2010).

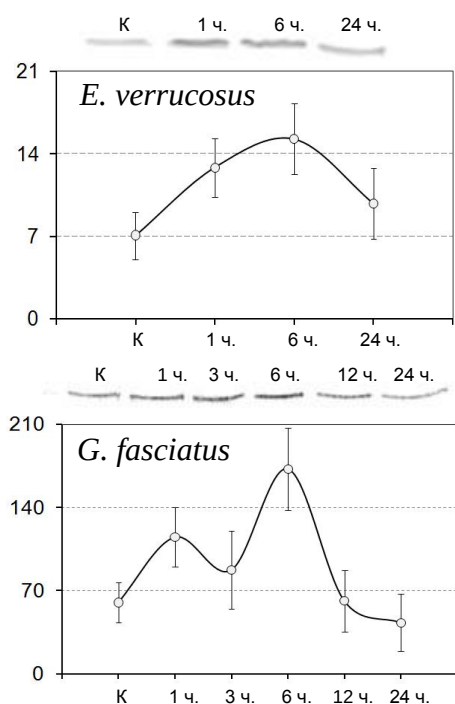


Рисунок 13. Вестерн-блоттинг суммарных белков амфипод, экспонированных в растворах гуминосодержащего препарата «Schwarzer See NOM» концентрации 60 мг/л. Мембраны инкубированы в антителах к БТШ70. Вверху — типовая мембрана, внизу — усредненная полуколичественная оценка в нг.

комплексов, вызываемые АФК и другими свободно-радикальными соединениями.

Как уже отмечалось ранее, функциональные свойства БТШ обоих семейств способствуют восстановлению нативной конформации белковых структур и поддержанию их активности при стрессовых воздействиях. Наиболее вероятно, что эти функции белков и находят прямое применение в условиях окислительных поражений. Участие БТШ70 в механизмах транспорта белков через мембраны так же актуально в случае мембранных нарушений. Таким образом, можно заключить, что показанный синтез БТШ при оксидативном стрессе направлен на предотвращение, защиту и (или) компенсацию структурных нарушений, вызванных усиливающимися процессами свободно-радикального окисления в клетках. При этом нужно отметить, что в отличие от ферментной реакции, в реакции синтеза БТШ у байкальских и палеарктических видов не существует принципиальных

Рассматривать полученные результаты необходимо в свете механизма окислительных повреждений на клеточном уровне. Усиление образования АФК ведет к повышению процессов свободно-радикального окисления в клетках и тканях амфипод, вызывая переокисление липидных соединений (как это показано в предыдущем разделе работы), а следовательно, ведет и к нарушениям мембранных клеточных структур (Тимофеев и др., 2002; Тимофеев и др., 2003; Timofeyev et al., 2006). Следует отметить, что при изменениях свойств мембранных структур, которые вызваны их повреждением, нарушается конформация и активность мембранно-связанных белков и белков, ассоциированных с мембранами. Многие свойства таких белков и функциональная активность напрямую зависят от свойств мембран. Таким образом, при нарушении мембран изменяется и их активность. Помимо этого, не менее опасные последствия несут окислительные повреждения непосредственно белков и их

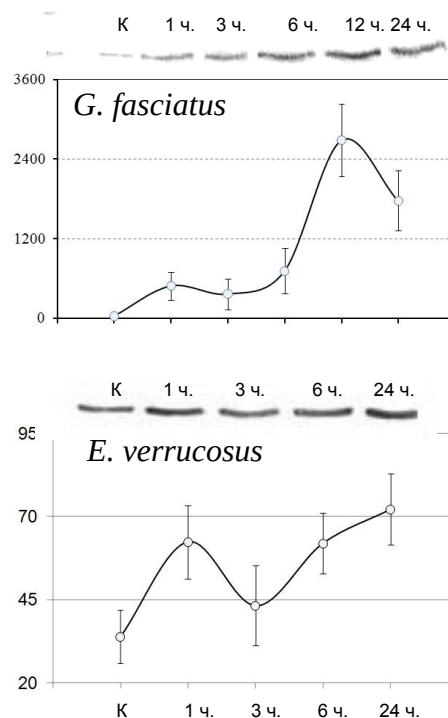


Рисунок 14. Вестерн-блоттинг суммарных белков амфипод, экспонированных в растворах гуминосодержащего препарата «Schwarzer See NOM» концентрации 60 мг/л. Мембраны инкубированы в антителах к нмБТШ. Вверху — типовая мембрана, внизу — полуколичественная оценка в нг.

различий. Выраженное накопление БТШ обоих семейств в условиях окислительного стресса происходит в равной степени и начинается уже на самых начальных этапах экспозиции.

2.4. Физиологические реакции амфипод при интоксикации

2.4.1. Изменения активности антиоксидантных ферментов у амфипод при интоксикации

В ходе данного этапа работы проводили определение характера влияния интоксикации растворами хлорида кадмия на активность антиоксидантных ферментов у амфипод. В исследовании были использованы виды: *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *G. tigrinus* и *G. lacustris* (Тимофеев и др., 2006; Timofeyev et al., 2007, 2008; Шатилина и др., 2010). Рачков экспонировали в растворах хлорида кадмия концентрации 0,05 мг/л.

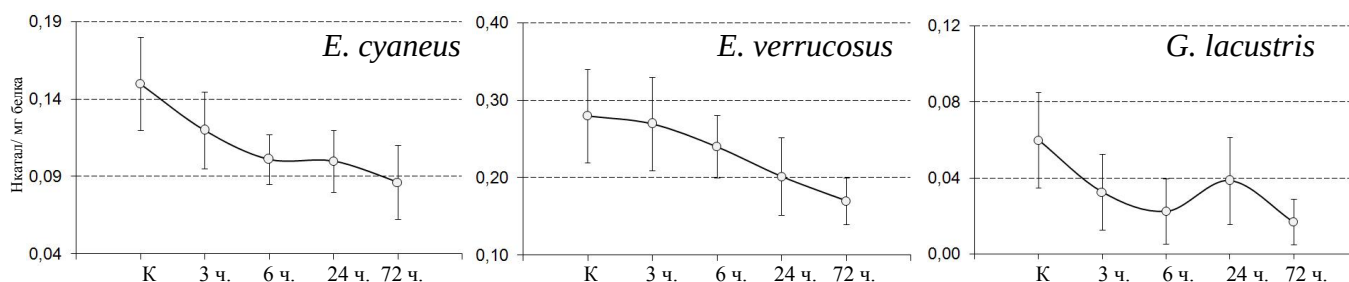


Рисунок 15. Активность пероксидазы у амфипод, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л (в нката/мг белка).

Установлено, что при интоксикации хлоридом кадмия общей реакцией для всех видов, вне зависимости от их фаунистической принадлежности, является снижение активности пероксидазы (Рис. 15). При этом прослеживается четкая порядковая зависимость временного периода начала снижения активности фермента с показателем токсикорезистентности вида. Как известно из ранее полученных данных, порядок устойчивости исследованных видов к интоксикации хлоридом кадмия следующий: *G. lacustris* > *E. verrucosus* ≥ *E. cyaneus* (Тимофеев, 2000). Из литературных данных также известно, что *G. tigrinus* обладает высокой токсикорезистентностью, и по данному показателю близок к *G. lacustris* (Wijnhoven et al., 2003). Основываясь на указанных материалах, можно проследить общую временную закономерность. Так, у наиболее токсико-чувствительного байкальского *E. cyaneus* было зафиксировано самое раннее снижение активности пероксидазы – 6 часов. В то время как у более токсико-устойчивых видов *G. lacustris*, *E. verrucosus* и *G. tigrinus* снижение активности пероксидазы наблюдалось только на 6 сутки экспозиции. Однако у более резистентных палеарктических видов *G. lacustris* и *G. tigrinus* падение активности пероксидазы не сопровождалось снижением активности другого антиоксидантного фермента – глутатион S-трансферазы, в то время как у более токсичувствительных байкальских видов *E. cyaneus* и *E. verrucosus* в условиях интоксикации помимо пероксидазы происходило и снижение активности глутатион S-трансферазы (Рис. 16). Активность каталазы у всех видов амфипод при интоксикации не изменялась.

Анализируя полученные данные, следует рассмотреть механизмы токсического действия солей кадмия. Молекулярными мишенями тяжелых металлов, и в том числе ионов кадмия, являются железосодержащие белки, а также ферменты системы антиоксидантной и антипероксидной защиты. Ионы кадмия способны образовывать комплексы с аминокислотами, содержащими тио- (HS-) или алкило- (RS-) группировки, что приводит к конформационным изменениям в белковых соединениях и последующим сбоям в их функциональной активности. Учитывая белковую природу ферментов, можно говорить о

прямом ингибировании их активности в результате взаимодействия с соединениями кадмия. Снижение активности пероксидазы происходит у всех исследованных амфипод.

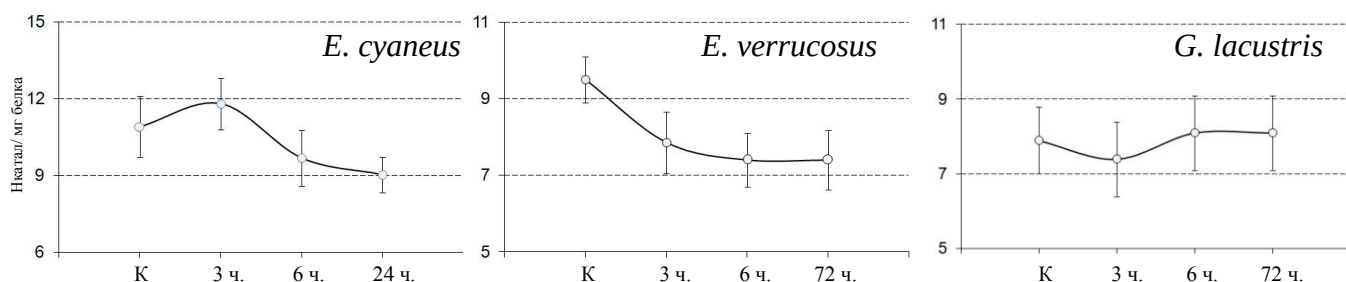


Рисунок 16. Активность глутатион S-трансферазы у амфипод, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л (в нкatal/мг белка).

Однако достоверный порог снижения активности у разных видов достигается в разные временные периоды. Известно, что показатели ферментной активности связаны с целым рядом параметров, среди которых – качественные характеристики ферментных комплексов, их количество, наличие и доступность субстратов и др. Предполагаемое влияние ионов кадмия при интоксикации должно приводить к нарушениям в конформации молекулы пероксидазы. Данный процесс у амфипод может компенсироваться активным синтезом новых молекул фермента. По-видимому, при интоксикации у палеарктических *G. lacustris* и *G. tigrinus* возможности продолжительного синтеза новых ферментов выше, чем у байкальских токсикочувствительных видов. Потеря способности к синтезу новых ферментов байкальскими амфиподами ведет к тому, что они быстрее начинают испытывать возрастающие окислительные воздействия. Деактивация пероксидазы ведет к росту процессов свободнорадикального окисления. Возрастает количество перекисных продуктов, элиминацией которых занимается глутатион S-трансфераза. При этом в условиях стресса у чувствительных видов глутатион S-трансфераза, так же как и пероксидаза, вероятно, могут быть синтезированы в ограниченном количестве. Таким образом, возникает ситуация, при которой существует повышенная необходимость в активности глутатион S-трансферазы, усиливается и расход ферментов вследствие износа молекул и прямого окислительного повреждения, а возможности по дополнительному синтезу ограничены. Этим, по-видимому, и объясняется падение активности глутатион S-трансферазы. Все это в совокупности ведет к снижению защитных способностей организма и, как следствие, к снижению его способности к выживанию в условиях токсического стресса. У более чувствительных видов данные процессы происходят быстрее и с большей интенсивностью, чем у резистентных видов (Тимофеев и др., 2008, Timofeyev et al., 2008).

2.4.2. Изменения в синтезе стрессовых белков у амфипод при токсическом стрессе

Оценку влияния токсического воздействия на содержание стрессовых белков проводили у байкальских: *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *G. fasciatus*, *O. flavus*, палеарктических *G. lacustris*, *G. tigrinus* и *G. pulex* (Тимофеев и др., 2003, 2006, 2008; Timofeyev et al., 2008; Шатилина и др., 2010). Результаты исследования показали, что при интоксикации хлоридом кадмия у всех изученных видов происходило увеличение количества БТШ70 и нмБТШ (Рис. 17–18).

Учитывая известный механизм токсического влияния соединений кадмия на белковые структуры, а также шапероновую роль БТШ обоих семейств, восстанавливающих нативную конформацию и функциональную активность белков, следует предположить, что синтез БТШ

направлен на противодействие и (или) компенсацию негативных последствий процессов, связанных с интоксикацией.

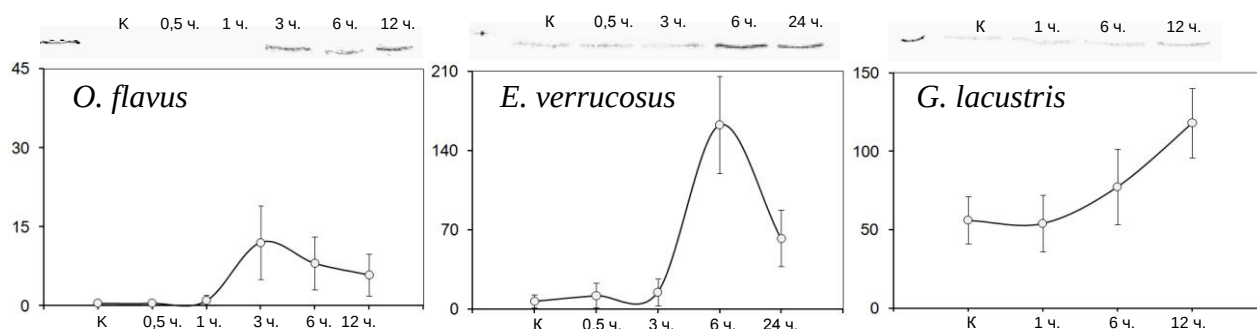


Рисунок 17. Вестерн-блоттинг суммарных белков амфипод, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л. Мембраны инкубированы в антителах к БТШ70. Вверху – типовая мембрана, внизу – усредненная полуколичественная оценка (в нг).

При этом, в отличие от ранее показанного температурного воздействия, при токсическом стрессе участие БТШ70 и нмБТШ проявлялось в равной степени. О защитном предназначении синтеза дополнительного количества БТШ свидетельствует и характерная зависимость «доза – эффект». При увеличении концентрации хлорида кадмия в растворах, в которых экспонировали рачков, наблюдали и увеличение количества синтезируемых БТШ. В пределах использованных концентраций хлорида кадмия отмечена прямая зависимость между степенью увеличения БТШ у амфипод и концентрацией токсиканта.

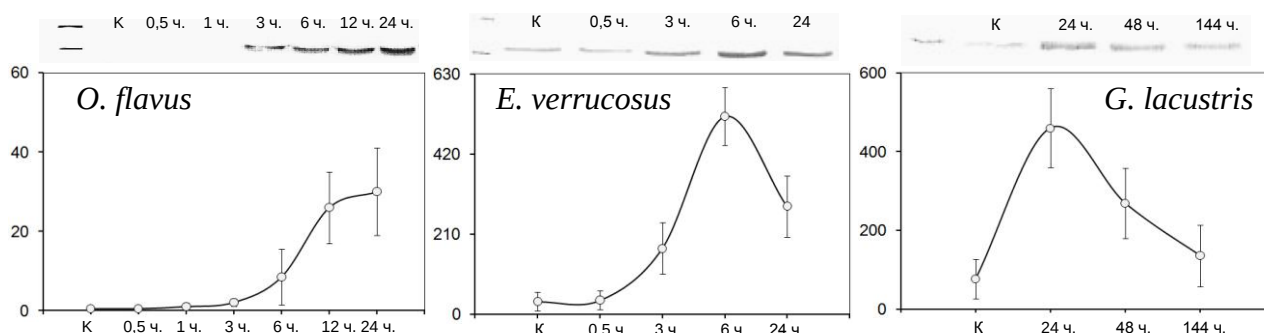


Рисунок 18. Вестерн-блоттинг амфипод, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л. Мембраны инкубированы в антителах к нмБТШ. Вверху – типовая мембрана, внизу – усредненная полуколичественная оценка (в нг).

Литоральные и глубоководные виды отличались как по срокам начала накопления БТШ, так и по количеству накопленного белка. У всех литоральных видов рост концентрации обоих БТШ происходил уже в самом начале токсического воздействия. У глубоководного вида *O. flavus* индуцированное накопление БТШ фиксировали, начиная с 3-х часов экспозиции. До того времени количество БТШ у большей части исследованных рачков оставалось ниже детектируемого порога. Однако даже в случае синтеза БТШ его количество очень мало. Как показывает сопоставление, даже максимальные количества накопленного БТШ70 или нмБТШ после 9 и 12 часов экспонирования у *O. flavus* ниже конститутивных уровней у других видов, например у литорального *E. cyaneus* (Рис. 19).

По-видимому, как и в случае с температурным воздействием, ослабленный синтез БТШ у глубоководных видов должен приводить к большей степени токсического повреждения и, вероятно, в существенной степени определять их повышенную чувствительность к интоксикации. Напротив, интенсивный синтез БТШ, наблюдаемый у литоральных видов,

должен обеспечивать им дополнительные преимущества в защите от первоначального стрессового воздействия и, следовательно, повышать их резистентность к интоксикации.

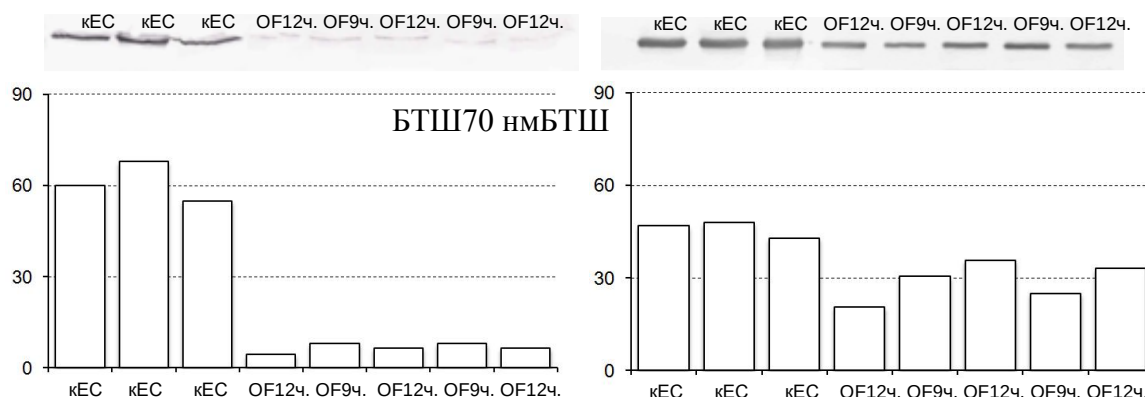


Рисунок 19. Вестерн-блоттинг суммарных белков *E. cyaneus* контроль (кЕС) и *O. flavus*, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л в течение 9 и 12 часов (OF9 ч, OF12 ч). Мембраны инкубированы в антителах к БТШ70 и нмБТШ. Вверху – мембрана, внизу – полуколичественная оценка (в нг белка).

2.5. Физиологические реакции амфипод при гипоксии

2.5.1. Изменения активности антиоксидантных ферментов у амфипод при гипоксии:

Влияние пониженного содержания кислорода на активность антиоксидантных ферментов оценивали у видов *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *O. flavus* и *G. lacustris* (Тимофеев и др., 2003, 2006). Установлено, что общим для всех видов является отсутствие изменений в активности каталазы. Наиболее выраженные изменения у большинства видов отмечены в активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы. Выявлены заметные различия у видов, отличающихся по своей устойчивости к гипоксии. Так, у оксичувствительного *E. verrucosus* уже через 30 минут экспонирования было отмечено снижение активности пероксидазы с 0,28 ($\pm 0,05$) до 0,13 ($\pm 0,03$) нкатал/мг белка и глутатион S-трансферазы – с 9,5 (± 1) до 5,3 ($\pm 0,5$) нкатал/мг белка. У более устойчивого *E. cyaneus* активность пероксидазы снижалась с 0,15 ($\pm 0,02$) до 0,05 ($\pm 0,01$) нкатал/мг белка немного позже (через 1 час экспозиции), а снижение активности глутатион S-трансферазы с 11 (± 1) до 8,5 ($\pm 0,6$) нкатал/мг белка происходило только после 12 часов экспонирования. У наиболее устойчивого к гипоксии палеарктического *G. lacustris* в ходе экспозиции не только не происходило снижения активности ферментов, а, напротив, была обнаружена кратковременная активация глутатион S-трансферазы с 7,5 (± 1) до 11 (± 1) нкатал/мг белка. *O. flavus* – единственный вид, не проявивший никакой направленности в изменениях активности всех антиоксидантных ферментов.

Рассматривая причины выявленных различий, необходимо учитывать, что при гипоксии, а следовательно – в условиях крайней ограниченности в энергетических ресурсах клеточные системы снижают расход энергии в соответствии с адаптивными способностями видов. В условиях гипоксии происходит активация серии защитных реакций, требующих определенных энергозатрат, что также должно сопровождаться перераспределением энергетических ресурсов и снижением части метаболических потребностей. У чувствительных видов этот процесс сопровождается снижением активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы. Устойчивые виды способны не только не снижать ферментной активности, но и в ограниченной степени могут ее активировать для минимализации последствий внутриклеточных повреждений. При этом активность каталазы, отвечающей в большей

степени за контроль АФК эндогенного происхождения, всеми видами поддерживается на конститутивном уровне. Известно, что каталаза относится к ферментам, которые наиболее длительно сохраняют свою высокую активность и почти не требуют энергии активации (Kirkman et al., 1999). Видимо, по этой причине при гипоксии амфиподам удается поддерживать активность каталазы независимо от окислительного статуса вида.

Таким образом, как и в случае с температурным и окислительным воздействиями, можно говорить о том, что у исследованных видов наблюдаются различные стратегии метаболической адаптации в условиях гипоксического стрессового воздействия. Устойчивый палеарктический вид способен не только поддерживать метаболизм на конститутивном уровне, но может активировать дополнительные защитные системы. Напротив, байкальские чувствительные виды снижают активность своих метаболических процессов. У глубоководного вида *O. flavus* адаптивная реакция снижения активности метаболических систем не выражена, что, вероятно, ведет к быстрому истощению энергетических ресурсов и, как следствие, вызывает быструю гибель организма. Возможные причины ограничения энергетических ресурсов в той или иной степени необходимо искать в механизмах, отвечающих за клеточное дыхание, а также за способность производить достаточное количество энергии в условиях пониженного кислородного обеспечения. Изучению данного вопроса посвящен следующий этап настоящей работы.

2.5.2. Сравнительный анализ накопления и утилизации лактата, ацетона, ацетоуксусной и β -оксимасляной кислот, а также сукцината в тканях амфипод:

Поведен анализ накопления и утилизации лактата (молочной кислоты), ацетона, ацетоуксусной и β -оксимасляной кислот, а также сукцината (янтарной кислоты) у амфипод, находящихся в условиях гипоксии и последующей нормоксии (Тимофеев и др., 2003, 2006, 2007).

Накопление лактата. Установлено, что в условиях гипоксии у байкальских видов происходит более интенсивное увеличение уровня лактата и медленная его утилизация при возвращении к нормоксии. Напротив, у палеарктического *G. lacustris* были отмечены наименьшая скорость и степень увеличения содержания лактата, а также самая высокая скорость его утилизации. Так, у *E. verrucosus* в контроле лактат присутствовал в концентрации 0,016 ($\pm 0,007$) мкг/мг с.в., а после 6 часов уровень лактата достигал 1,225 ($\pm 0,1$) мкг/мг с.в. Возвращение в условия аэрации приводило к уменьшению уровня накопленного лактата до 0,196 ($\pm 0,06$) мкг/мг с.в. Однако даже сниженный уровень лактата 10-кратно превышал контрольный. У *E. vittatus* в контроле лактат присутствовал в концентрации 0,011 ($\pm 0,006$) мкг/мг с.в., после 6 часов экспозиции происходило увеличение до 0,967 ($\pm 0,26$) мкг/мг с.в., а при возвращении к аэрации уровень лактата уменьшался до 0,10 ($\pm 0,02$) мкг/мг с.в. (10-кратно превышая контрольное значение). У *E. cyaneus* в контроле лактат присутствовал в количестве 0,009 ($\pm 0,002$) мкг/мг с.в. 6-часовая экспозиция приводила к увеличению до 0,60 ($\pm 0,09$) мкг/мг с.в., а возвращение к аэриобиозу вело к снижению уровня накопленного лактата до 0,051 ($\pm 0,011$) мкг/мг с.в. (5-кратно превышало контрольный уровень). У *G. lacustris* в контроле лактат присутствовал в количестве 0,010 ($\pm 0,003$) мкг/мг с.в., через 6 часов происходило увеличение концентрации до 0,211 ($\pm 0,039$) мкг/мг с.в., а возвращение к нормоксии вызывало уменьшение уровня до 0,016 ($\pm 0,003$) мкг/мг с.в. В отличие от всех исследованных байкальских видов у палеарктического *G. lacustris* наблюдали снижение концентрации лактата до контрольного значения.

Говоря о механизмах адаптации амфипод к недостаточному содержанию кислорода следует учитывать то, что процесс анаэробного гликолиза является малопродуктивным способом мобилизации энергии химических связей, требующим значительного расходования энергетических веществ с их окислением до промежуточных кислых продуктов.

Таблица 3. Скорости накопления лактата и его утилизации у амфипод при гипоксии и последующей нормоксии.

	В целом по рачку		В гемолимфе	
	Накопление мкг/ час	Утилизация мкг/ час	Накопление ммоль/час	Утилизация ммоль/час
<i>G. lacustris</i>	0,03	0,07	0,08	0,14
<i>E. cyaneus</i>	0,10	0,18	-	-
<i>E. vittatus</i>	0,16	0,32	-	-
<i>E. verrucosus</i>	0,21	0,34	1,33	1,08

Повышение роли анаэробного гликолиза для организма является вынужденной мерой и ведет к множеству негативных последствий. Чрезмерное накопление лактата ведет к закислению внутренней

среды организма (лактат-ацидозу). Изменение внутри- и внеклеточного уровня pH вызывает нарушения в функционировании различных структур клетки, а также ключевых биохимических процессов регуляции метаболизма. Устранение этих негативных последствий является существенной частью всей системы анаэробного метаболизма. В аэробных условиях образовавшийся лактат транспортируется в гемолимфу и далее в специализированные ткани, в клетках которых, в результате процессов глюконеогенеза и гликонеогенеза, лактат перерабатывается в глюкозу и гликоген, а частью распадается до CO₂ и H₂O. В условиях гипоксии процессы глюконеогенеза и гликонеогенеза снижают свою эффективность, приводя к росту накопления лактата в тканях. Как показали недавние исследования (Maciel et al., 2008), в гипоксических условиях при чрезмерном накоплении лактата в гемолимфе беспозвоночных часть лактата экскрецируется в окружающую среду. Однако этот процесс не может предотвратить процессов закисления организма от повышающегося содержания лактата, уровень которого растет как в цитозоле клеток, так и в гемолимфе. Учитывая этот факт, была проведена оценка накопления лактата в гемолимфе амфипод. Для чего использовали наиболее крупные (по размерам) виды, различающиеся по степени своей устойчивости к гипоксии: байкальского *E. verrucosus* и палеарктического *G. lacustris*.

Установлено, что в течение эксперимента у обоих видов происходил рост накопления лактата в гемолимфе, причем степень и скорость такого накопления у видов различалась: наблюдался 18-кратный прирост у *E. verrucosus* до 8,45 (±1,0) ммоль/л и 4,5-кратный – у *G. lacustris*: до 0,63 (±0,09) ммоль/л. При возвращении к нормоксии у обоих видов происходило снижение концентрации накопленного в гемолимфе лактата: у *E. verrucosus* фиксировали уменьшение содержания лактата до 5,2 (±0,8) ммоль/л, тогда как у *G. lacustris* – до 0,20 (±0,05) ммоль/л. Следует отметить, что даже сниженный уровень лактата у *E. verrucosus* 10-кратно превышал контрольный, а у *G. lacustris* снижение проходило до контрольного уровня.

Для оценки межвидовых различий в процессах метаболизма лактата были рассмотрены показатели скорости накопления и ресинтеза, а также относительной эффективности этих процессов. В таблице 3 представлены материалы сравнительного анализа параметров накопления/утилизации лактата у амфипод, подверженных гипоксии. Как видно из представленных материалов, у всех видов скорость утилизации лактата превышает скорость его накопления. Наибольшая скорость накопления лактата отмечена у *E. verrucosus*. Далее в порядке возрастания устойчивости к гипоксии от *E. verrucosus* до *G. lacustris* снижается и скорость. Таким образом, показано, что скорости накопления связаны с порядком устойчивости видов. Сопоставление изменения отношений концентрации лактата в гемолимфе

к концентрации в целом по организму позволило выявить показатели транспорта лактата в ходе эксперимента. Установлено, что отношение концентрации лактата в гемолимфе относительно его концентрации в целом по организму снижалось в ходе всего периода экспозиции у обоих видов. Изменение этого соотношения свидетельствует в пользу того, что все большее количество лактата оставалось в цитозоле клетки относительно того количества, которое переходило в гемолимфу. Таким образом, зафиксировано угнетение процессов транспорта лактата из цитозоля в гемолимфу. При этом сам процесс транспорта лактата не останавливался. Возвращение к нормоксии вело к восстановлению показателя транспорта до контрольного значения. Известно, что транспорт лактата через мембраны может осуществляться несколькими путями. Среди них – прямая диффузия через мембраны или при помощи специфичных белков-транспортеров. Снижение мембранного транспорта лактата вследствие изменения рН-среды и в результате воздействия температурного стресса ранее было показано у млекопитающих (Juel, 1988; Roth, Brooks, 1990). Наиболее вероятной причиной, ведущей к угнетению транспорта лактата из цитозоля в гемолимфу, наблюдаемое у амфипод, является снижение проницаемости мембраны, вызванное самим закислением (ацидозом) и последствием стресс-индуцированных перекисных процессов, а также ингибированием мембранных переносчиков.

Другим негативным последствием гипоксического воздействия на организм является переход метаболизма на менее эффективный путь получения энергии. Результатом перехода на анаэробный распад углеводов является нарастающий дефицит глюкозы. Для поиска дополнительных источников обеспечения энергией организм вынужден подключать процесс распада липидов – липолиз. В условиях пониженного содержания кислорода распад липидов происходит не полностью, а лишь до промежуточного продукта – ацетил-КоА, из которого в данных условиях образуются кетоновые тела (ацетон, ацетоуксусная и β -оксимасляная кислоты), накапливающиеся в тканях.

Накопление ацетона: Как показали результаты экспериментов, у всех исследованных видов ацетон в контроле отсутствовал. В условиях гипоксии у *E. vittatus* содержание ацетона увеличивалось до 0,068 ($\pm 0,006$) мкг/мг с.в. При возвращении к нормоксии уровень ацетона снижался до 0,052 ($\pm 0,003$) мкг/мг с.в. У *E. cyaneus* концентрация увеличивалась до 0,037 ($\pm 0,005$) мкг/мг с.в. При возвращении к нормоксии наблюдали снижение уровня ацетона до 0,027 ($\pm 0,004$) мкг/мг с.в. У *G. lacustris* концентрация увеличивалась до 0,019 ($\pm 0,001$) мкг/мг с.в, а при возвращении к нормоксии снижалась до 0,013 ($\pm 0,001$) мкг/мг с.в. Таким образом, наибольший рост концентрации ацетона происходил у *E. vittatus*. Вид *E. cyaneus* по показателям степени накопления ацетона занимал промежуточное положение, отличаясь от *E. vittatus* меньшими значениями данных показателей. Наименьший темп прироста ацетона отмечен у палеарктического *G. lacustris*. Наибольшая скорость утилизации ацетона отмечена у *G. lacustris* и *E. cyaneus*, а наименьшая – у *E. vittatus*. При возвращении к аэрации у *G. lacustris* и *E. cyaneus* снижалось содержание ацетона на 33% и 28% соответственно, у *E. vittatus* содержание ацетона снижалось на 24%.

Накопление ацетоуксусной кислоты: Результаты оценки ацетоуксусной кислоты выявили ее отсутствие в контроле. Экспозиция в условиях гипоксии вела к накоплению ацетоуксусной кислоты у всех видов, при возвращении к нормоксии происходило снижение концентрации. Так, у *E. vittatus* после 6-часового экспонирования ее содержание увеличивалось до 0,155 ($\pm 0,014$) мкг/мг с.в., а при возвращении к нормоксии снижалось до 0,118 ($\pm 0,008$) мкг/мг с.в. У *E. cyaneus* отмечали увеличение уровня до 0,084 ($\pm 0,015$) мкг/мг

с.в, при возвращении к нормоксии концентрация снижалась до 0,040 ($\pm 0,008$) мкг/мг с.в. У *G. lacustris* экспонирование вело к росту ее содержания до 0,055 ($\pm 0,005$) мкг/мг с.в., при возвращении нормоксии концентрация снижалась до 0,026 ($\pm 0,003$) мкг/мг с.в. Таким образом, наибольший прирост содержания ацетоуксусной кислоты был характерен для байкальских видов, а у палеарктического *G. lacustris* показана меньшая степень накопления ацетоуксусной кислоты. При возвращении в условия нормоксии содержание ацетоуксусной кислоты у исследованных видов амфипод снижалось относительно накопленного уровня у *G. lacustris* и *E. cyaneus* на 50%, у *E. vittatus* – на 25%.

Накопление β -оксимасляной кислоты: Результаты определения β -оксимасляной кислоты показали ее отсутствие в контроле. Гипоксия вела к росту, а возвращение к нормоксии – к снижению накопленной β -оксимасляной кислоты. Так, у *E. vittatus* 6-часовое экспонирование вело к увеличению концентрации до 0,182 ($\pm 0,014$) мкг/мг с.в. После возвращения к нормоксии происходило снижение до 0,126 ($\pm 0,025$) мкг/мг с.в. У *E. cyaneus* происходило увеличение до 0,110 ($\pm 0,018$) мкг/мг с.в, а при возвращении к нормоксии – снижение до 0,045 ($\pm 0,012$) мкг/мг с.в. У *G. lacustris* отмечено увеличение концентрации до 0,070 ($\pm 0,012$) мкг/мг с.в., а при возвращении к нормоксии – снижение до 0,018 ($\pm 0,002$) мкг/мг с.в. Таким образом, наибольшая степень увеличения содержания β -оксимасляной кислоты была отмечена у *E. vittatus*. Наименьшая степень прироста содержания β -оксимасляной кислоты, среди представленных видов, была характерна для *G. lacustris*. Концентрация β -оксимасляной кислоты, при возвращении в условия аэрации, снизилась у *G. lacustris* на 70%, у *E. cyaneus* – на 55%, у *E. vittatus* – на 30% (Тимофеев и др., 2003, 2007).

Таблица 4. Сопоставительный анализ отношения скорости накопления продуктов анаэробного липолиза у амфипод при гипоксии и их последующей утилизации при возвращении к нормоксии (в мкг/ час).

Виды	Ацетон				Ацетоуксусная кислота				β -оксимасляная кислота			
	1 ч	3 ч	6 ч	норм	1 ч	3 ч	6 ч	норм	1 ч	3 ч	6 ч	норм
<i>G. lacustris</i>	0,012	0,005	0,003	0,002	0,022	0,012	0,009	0,010	0,014	0,011	0,012	0,017
<i>E. cyaneus</i>	0,023	0,009	0,006	0,003	0,031	0,021	0,014	0,015	0,035	0,021	0,018	0,022
<i>E. vittatus</i>	0,035	0,017	0,011	0,005	0,072	0,043	0,026	0,012	0,068	0,038	0,030	0,019

Таким образом, как показали результаты исследования, у всех амфипод в контрольных условиях продукты анаэробного липолиза в детектируемых количествах не обнаруживались. В условиях гипоксии доля анаэробного липолиза в метаболизме амфипод повышается. Необходимо отметить, что анаэробный распад липидов является малоэффективным способом продукции метаболической энергии, а накопление продуктов данного процесса вызывает кетоацидоз. По-видимому, из-за этих негативных последствий наиболее интенсивно данный процесс идет в первые часы экспозиции амфипод, далее скорость накопления постепенно снижается (Табл. 4). У наиболее адаптированных к гипоксии видов использование данного пути выражено меньше. Так, у *G. lacustris* показана самая низкая степень увеличения доли анаэробного липолиза и наиболее быстрая метаболизация его конечных продуктов при возвращении к нормоксии. У менее резистентных байкальских видов *E. cyaneus* и *E. vittatus* отмечены более интенсивные процессы накопления.

Накопление сукцината: Одним из эффективных процессов образования энергии в условиях гипоксии является процесс анаэробного образования сукцината. Исходя из этого, следующим этапом работы была оценка накопления сукцината в условиях гипоксии и последующая его утилизации после возвращения к нормоксии. Как показали результаты исследования, у всех видов в контроле был отмечен определенный уровень сукцината. Гипоксия вела к росту концентрации сукцината, а возвращение нормоксии – к снижению. При этом уровни накопления и метаболической утилизации сукцината у исследованных видов отличались. Так, у *E. vittatus* содержание сукцината в контроле составляло 0,059 ($\pm 0,008$) мкг/мг с.в., экспозиция вызывала увеличение до 0,461 ($\pm 0,026$) мкг/мг с.в., а возвращение к

Таблица 5. Сопоставительный анализ скорости накопления сукцината у амфипод при гипоксии и его утилизации при возвращении к нормоксии (в мкг/ час).

Виды	1 ч	3 ч	6 ч	норм
<i>G. lacustris</i>	0,046	0,116	0,111	0,141
<i>E. cyaneus</i>	0,015	0,048	0,040	0,040
<i>E. vittatus</i>	0,027	0,079	0,067	0,036

нормоксии – снижение до 0,352 ($\pm 0,015$) мкг/мг с.в. У *E. cyaneus* содержание в контроле составляло 0,025 ($\pm 0,004$) мкг/мг с.в., при экспозиции – 0,262 ($\pm 0,047$) мкг/мг с.в., при возвращении к нормоксии – 0,143 ($\pm 0,042$) мкг/мг с.в. У *G. lacustris* в контроле – 0,059 ($\pm 0,002$) мкг/мг с.в., при гипоксии – 0,723 ($\pm 0,057$) мкг/мг

с.в., при возврате к нормоксии – 0,301 ($\pm 0,028$) мкг/мг с.в. В целом у байкальских видов амфипод отмечены меньшие показатели накопления сукцината, в то время как палеарктический вид *G. lacustris* характеризовался большей степенью накопления (Тимофеев и др., 2006; Тимофеев, Кириченко, 2004).

Говоря о способности исследованных видов к повышению доли анаэробных процессов в энергетическом метаболизме, в первую очередь следует оценивать совместную эффективность систем метаболизма лактата, кетонных тел и сукцината. При этом необходимо отметить существенные различия в системе протекания анаэробных процессов у изученных видов (Тимофеев и др., 2007). Как следует из полученного материала, наиболее эффективно система метаболизма лактата работает у палеарктического вида *G. lacustris*. Для адаптивной метаболической реакции у данного вида характерны более поздний и наименее выраженный рост уровня лактата в тканях, наименьшее его увеличение относительно контроля и полная элиминация при возврате к нормоксии. Для *G. lacustris* также характерна меньшая степень использования низкоэффективного пути образования энергии – анаэробного липолиза и большая степень использования более эффективного пути образования метаболической энергии в условиях низкого содержания кислорода – процесса анаэробного образования сукцината. Далее по эффективности следует поставить байкальский вид *E. cyaneus*. У этого вида начало роста уровня лактата отмечено уже к первому часу экспозиции в гипоксии. Накопление лактата у *E. cyaneus* происходит с наименьшей скоростью и до самого маленького уровня среди всех байкальских видов. При возвращении к нормоксии организм данного вида также способен элиминировать большую часть накопившегося лактата. Вид *E. vittatus* занял промежуточное положение между *E. cyaneus* и *E. verrucosus* с довольно высокими скоростями и уровнями накопления лактата, а также слабой способностью к его утилизации. Наименьшей эффективностью среди изученных видов обладал *E. verrucosus*, реакция которого характеризовалась наиболее интенсивной скоростью накопления лактата до самых больших уровней. С другой стороны, будучи возвращенным в условия нормоксии, данный вид не способен с той же скоростью элиминировать весь накопившийся лактат, как это делали более

резистентные виды (Тимофеев и др., 2007). У байкальских видов выявлены более выраженная индукция анаэробного липолиза и меньшая степень подключения процесса анаэробного образования сукцината. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что именно степень развития анаэробных процессов, включающих в себя также эффективную систему утилизации токсических продуктов анаэробного гликолиза и липолиза, а также повышение доли процессов анаэробного образования сукцината в совокупности определяют степень устойчивости вида к гипоксии, которая, в свою очередь, связана с экологическими характеристиками каждого отдельного вида (Тимофеев и др., 2003, 2006, 2007).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что различия в функционировании отдельных физиологических систем определяют дивергенцию видов по их резистентным способностям. Все исследованные виды амфипод используют белки теплового шока и антиоксидантные ферменты в системе стрессового ответа на действие неблагоприятных факторов среды. Однако степень участия данных элементов в защитных механизмах и способность к длительному поддержанию активности на повышенном уровне у видов существенно различаются. Если проводить сопоставление реакций литоральных видов между собой и с глубоководными амфиподами, можно выявить существенные отличия. Так, при любом стрессовом факторе литоральные виды реализуют разнообразные сценарии стрессовой реакции. Напротив, глубоководные амфиподы характеризуются отсутствием направленных изменений в активности антиоксидантных ферментов, а также задержкой и низкой интенсивностью индуцированного накопления БТШ.

Разнообразие стрессовых сценариев у литоральных видов наиболее ярко выражено в реакции антиоксидантных ферментов. При этом прослеживаются адаптивные изменения, отражающие перераспределение защитных ресурсов организма, выраженные с различной степенью у разных видов. Общей реакцией на воздействие стрессовых факторов является индуцированный синтез БТШ. У наиболее устойчивых видов наблюдается более выраженное увеличение содержания БТШ в стрессовых условиях, чем у более чувствительных. Во всех случаях различия в стресс-реакциях связаны с резистентными характеристиками видов.

Наиболее вероятным объяснением различий в механизмах стресс-реакции является разная способность к перераспределению энергетических потоков с менее важных систем метаболизма на более важные. В условиях стрессового воздействия возрастает необходимость в дополнительном энергетическом обеспечении систем, которые не задействованы в нормальных условиях. Возникающий дефицит энергии может отражаться и на процессах энергообеспечения и накопления побочных метаболитов. Было предположено, что в условиях дефицита энергии может происходить смещение баланса аэробных и анаэробных метаболических процессов. Для проверки этого предположения была проведена экспериментальная оценка уровня лактата у литоральных видов при температурном стрессе и интоксикации на первоначальных этапах воздействия. Установлено, что уже в ходе первых 3 часов температурного стресса у всех исследованных видов происходит увеличение концентрации лактата. Из этого следует, что у амфипод, находящихся в условиях температурного стрессового воздействия, происходит рост доли анаэробных процессов в общем метаболизме. У менее терморезистентных видов (*E. vittatus*, *E. verrucosus*) достоверный рост лактата отмечен уже через 1 час экспозиции. Напротив, у более термоустойчивых видов (*E. cyaneus*, *G. lacustris*) рост фиксируется позже. Можно сделать вывод, что у всех видов

возникают изменения в энергетическом метаболизме. При этом у видов, менее устойчивых к стрессу, они возникают раньше, чем у более устойчивых. Накопление лактата отмечено и при инкубации амфипод в растворах хлорида кадмия. У более токсикорезистентных амфипод вида *E. vittatus* достоверное увеличение уровня лактата фиксировали только после 6 часов экспозиции, в то время как у менее резистентных видов (*E. verrucosus*, *E. cyaneus*) уже после 1 часа экспозиции.

Учитывая тот факт, что относительные показатели устойчивости видов к воздействию разных стрессов близки, можно предположить, что различия в сценариях стресс-реакции, наблюдаемые в экспериментах, должны быть связаны с нарушениями в энергетическом обеспечении у амфипод. Как показывают различия в реакциях, более резистентные виды способны к более эффективному решению проблемы дефицита энергии, чем менее резистентные виды. Вероятнее всего, в условиях дефицита энергии и роста доли анаэробных метаболических процессов у амфипод реализуются сценарии энергообеспечения, характерные для гипоксических состояний. Различия в устойчивости к гипоксии связаны с более эффективными механизмами энергообеспечения, характеризующимися меньшим накоплением токсических продуктов анаэробноза (Тимофеев и др., 2003, 2006, 2007). Учитывая тот факт, что уровни термоустойчивости и устойчивости к гипоксии у видов близки (Тимофеев, Кириченко, 2004), а реакция на температурный стресс так же как и на гипоксические состояния сопровождается накоплением лактата, можно ожидать, что в условиях стрессового энергообеспечения задействованы общие механизмы, проявляемые в той или иной мере и с разной степенью эффективности.

В отличие от литоральных видов, у глубоководных амфипод в условиях исследованных стрессовых воздействий не выявлено развитых адаптивных сценариев. Так, в результате воздействия всех использованных стрессовых факторов у глубоководных *O. flavus* не происходило направленных изменений в активности ферментных систем. Причем отсутствие реакции наблюдали до самого момента критического ослабления и гибели амфипод от влияния стрессового фактора. Для глубоководных амфипод также были характерны крайне низкие уровни конститутивного синтеза БТШ и задержка индуцированного синтеза в условиях стрессового воздействия.

Показанное отсутствие направленной реакции антиоксидантных ферментов на стрессовое воздействие и снижение роли БТШ у глубоководных амфипод свидетельствует о существенной редукции адаптивных систем, которая, вероятно, имеет эволюционные основания. Учитывая то, что при стрессе возникает потребность в росте энергозатрат для обеспечения функционирования резистентных механизмов, организмы стараются снизить и перераспределить свое потребление энергии. При этом – в зависимости от возможностей организма поставлять эту энергию – используются более или менее эффективные системы защиты.

Если рассматривать этот вопрос с точки зрения проблемы выживания вида, то необходимо отметить, что только обитание в среде с переменными условиями обуславливает необходимость поддержания энергетического «запаса» в организме для функционирования механизмов стрессовой защиты. В отличие от глубоководных, литоральные амфиподы обитают в постоянно изменяющихся условиях среды, характеризующихся в первую очередь колебаниями температурно-газового режима. Поддержка повышенных уровней конститутивного синтеза БТШ должна давать им определенные резистентные преимущества в случаях изменении этих условий.

Необходимость же поддержания адаптивного «запаса» для глубоководных видов не очевидна. В водоеме по вертикальному градиенту условий происходит снижение параметров флуктуации факторов среды (от литорали к абиссали). В Байкале этот процесс идет одновременно со снижением продуктивности окружающей среды. На больших глубинах видам сложнее находить пищу, а следовательно, они ограничены в источниках метаболической энергии. Таким образом, виды сталкиваются с выбором: либо поддерживать повышенную активность систем резистентности и тратить на это труднодобываемую энергию, либо, отказавшись от дополнительных энергозатрат на поддержание функционирования резистентных систем, увеличить свою энергоэффективность. С учетом отсутствия необходимости поддерживать свои резистентные системы в постоянной функциональной готовности к флуктуациям факторов среды, эволюция амфипод пошла по пути повышения энергоэффективности. Таким образом, уже у видов амфипод, обитателей средних и нижних отделов литорали, начинает проследиваться снижение конститутивных и стресс-индуцированных параметров активности систем резистентности. У глубоководных же амфипод наблюдается существенная редукция способности к их активации.

При этом снижение работоспособности адаптивных систем идет неравномерно. Так, способность к направленным изменениям активности антиоксидантных ферментов у глубоководных амфипод практически полностью утрачена, однако в случае с более консервативными механизмами БТШ реакция увеличения экспрессии белков в ответ на стрессовое воздействие сохраняется. Однако эффективность этой реакции все же крайне мала. Во-первых, «поздний старт» реакции не защищает амфипод от наиболее негативного первоначального этапа стрессового воздействия. Во-вторых, даже максимальный индуцированный уровень БТШ у глубоководных амфипод не превышал конститутивных уровней литоральных видов. Вероятнее всего, у *O. flavus* конститутивно поддерживается синтез БТШ на минимальном уровне, требуемом для протекания основных метаболических процессов. Глубоководные амфиподы настолько оптимизировали свои метаболические процессы в соответствии с условиями среды, что утратили способность к развитию адекватной адаптивной реакции в случае их изменений. Учитывая крайнюю стабильность условий обитания в зоне больших глубин, развитые резистентные системы не являются необходимым условием для существования в ней организмов, а значит, редуцирование данных систем ведет к увеличению энергоэффективности метаболических процессов вида и, следовательно, является естественным проявлением адаптивного эволюционного процесса.

Таким образом, в ходе проведенных исследований выявлена не только взаимосвязь основных экологических характеристик амфипод, включая пространственное распространение, температурное и кислородное предпочтения, резистентные возможности, но и тот факт, что в основе этих резистентных возможностей лежат специфические способности видов к различной степени активации физиологических механизмов стрессовой устойчивости, обусловленные особенностями мест их обитания и связанные с эффективностью их энергетических процессов.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена зависимость основных экологических характеристик амфипод, включая пространственное распространение, температурные и кислородные предпочтения, с резистентными возможностями видов, в основе которых лежат специфичные способности видов к различной степени активации физиологических механизмов стрессовой устойчивости.

2. Выявлена прямая связь между температурной преференцией, температурной резистентностью, чувствительностью к гипоксии, кислородным преферендумом, вертикальным и горизонтальным распространением амфипод в оз. Байкал и за его пределами. Литоральные виды обладают повышенной терморезистентностью и устойчивостью к гипоксии, а также характеризуются наибольшими показателями предпочитаемых температур. Напротив, глубоководные виды обладают наименьшей резистентностью и предпочитают самые низкие температуры. Виды с развитыми резистентными способностями имеют и большее распространение за пределами Байкала.

3. Показано, что белки семейств БТШ70 и нмБТШ, иммунохимически родственные α -кристаллину, принимают участие в механизмах устойчивости амфипод к температурному, окислительному и токсическому воздействиям. Белки семейства БТШ70 у всех исследованных байкальских и палеарктических видов амфипод представлены белками с молекулярной массой 70 кДа, полиморфизм отсутствует. Белки семейства нмБТШ, иммунохимически родственных α -кристаллину, обладают большим полиморфизмом и у большинства исследованных видов имеют молекулярную массу 35 кДа, за исключением байкальского реликтового *G. fasciatus*, у которого она составляет 36,5 кДа.

4. Показатели термоустойчивости и устойчивости к гипоксии у байкальских и палеарктических амфипод взаимосвязаны с конститутивным содержанием БТШ. Для наиболее резистентных видов характерны и наибольшие конститутивные уровни БТШ, у менее резистентных видов их уровни ниже. У наиболее резистентных видов также наблюдается способность к более выраженному увеличению количества БТШ в условиях стрессового воздействия.

5. Активность пероксидазы и каталазы в организме амфипод имеет неравномерное распределение в разных частях тела и зависит от их возраста (размера). Напротив, активность глутатион S-трансферазы имеет равномерное распределение по телу амфипод и не изменяется с возрастом (размером). Активность ферментов имеет межвидовые различия, однако не привязана к экологическому или резистентному статусу самих видов.

6. Существуют различия в характере реакции антиоксидантных ферментов *in vivo* на влияние температурного фактора у термочувствительных и термоустойчивых литоральных видов амфипод. У наиболее термоустойчивых амфипод реакция на температурное воздействие характеризуется ростом активности каталазы и глутатион S-трансферазы при отсутствии изменений в активности пероксидазы. У менее термоустойчивых видов происходит рост активности каталазы при одновременном снижении активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы (у *E. suapeus* активность глутатион S-трансферазы остается неизменной).

7. Выявлены различия в характере реакции на оксидативный стресс антиоксидантных ферментов *in vivo* у байкальских и палеарктических видов. При схожих показателях оксидативного повреждения у большинства байкальских амфипод происходит снижение активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы на фоне повышения активности каталазы. У палеарктических видов активность пероксидазы и глутатион S-трансферазы повышается, а активность каталазы, напротив, снижается.

8. В условиях токсического стресса у всех видов амфипод наблюдается снижение активности пероксидазы. При этом у токсичувствительных байкальских видов снижение активности пероксидазы происходит раньше и сопровождается также снижением активности глутатион S-трансферазы.

9. В условиях гипоксии у байкальских видов *E. cyaneus* и *E. verrucosus* происходит снижение активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы, в то время как у палеарктического *G. lacustris* активность пероксидазы остается стабильной, а активность глутатион S-трансферазы растет. При гипоксии у всех исследованных амфипод наблюдается увеличение доли анаэробного метаболизма, включая процессы гликолиза, анаэробного липолиза и анаэробного образования сукцината. Байкальские амфиподы и палеарктический *G. lacustris* обладают различной эффективностью использования анаэробных процессов.

10. Выявлены различия в характере и скорости стресс-реакции литоральных и глубоководных видов амфипод на температурное, окислительное и токсическое воздействие. Особенностью реакции литоральных видов является активация разнообразных сценариев стрессового ответа, включая направленные изменения активности антиоксидантных ферментов и интенсивный синтез БТШ. Глубоководные амфиподы характеризуются отсутствием направленных изменений в активности антиоксидантных ферментов, а также задержкой и низкой интенсивностью индуцированного накопления БТШ.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

Главы в монографиях

1. Steinberg C.E.W., **Timofeyev M.A.** and Menzel R. Dissolved Humic Substances: Interactions with Organisms // Gene E. Likens, (Editor) Encyclopedia of Inland Waters. 2009. Vol. 2. P. 747–753. Oxford: Elsevier.
2. Wiegand C., Meems N., **Timofeyev M.A.**, Steinberg C., Pflugmacher S. More evidence for humic substances acting as biogeochemicals on organisms // Humic Substances: Nature's Most Versatile Materials. Eds. E. A. Ghabbour and G. Davies, Francis & Taylor New York. 2004. P. 340–372.

Статьи в ведущих рецензируемых российских и зарубежных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК (в том числе входящих в систему цитирования «Web of Science»)

3. Bedulina D.S., **Timofeyev M.A.**, Zimmer M., Zwirnmann E., Menzel R., Steinberg C.E.W. Different natural organic matter isolates cause similar stress response patterns in the freshwater amphipod, *Gammarus pulex* // Environmental Science and Pollution Research. 2010. 17. P. 261–269.
4. Шатилина Ж.М., Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Павличенко В.В., **Тимофеев М.А.** Белки теплового шока в механизмах стресс-адаптации у байкальских амфипод и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars: I. Семейство БТШ70 // Сибирский экологический журнал. – 2010. – № 1. – С. 57–67.
5. 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. 45–54.
6. **Timofeyev M.A.**, Shatilina Z.M., Protopopova M.V., Bedulina D.S., Pavlichenko V.V., Kolesnichenko A.V., Steinberg C.E.W. Thermal stress defense in freshwater amphipods from contrasting habitats with emphasis on small heat shock proteins (sHSPs) // Journal of Thermal Biology. 2009. 34. P. 281–285.

7. **Timofeyev M.**, Protopopova M., Pavlichenko V, Steinberg C. Can acclimation of amphipods change their antioxidative response? // *Aquatic Ecology*. 2009. 43. P. 1041–1045.
8. **Тимофеев М.А.** Активация антиоксидантной системы у байкальского литорального вида *Eulimnogammarus verrucosus* // *Известия Самарского научного центра РАН*. – 2009. – Т. 11. – № 1. – С. 177–180.
9. **Тимофеев М.А.**, Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Колесниченко А.В. Особенности применения белков теплового шока (БТШ) в качестве стресс-маркеров у байкальских эндемичных амфипод // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2008. – Т. 44. – № 3. – С. 343–347.
10. **Тимофеев М.А.** Особенности механизмов активации АОС у пресноводных амфипод: II. Байкальский литоральный *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.) (Amphipoda, Crustacea) // *Сибирский экологический журнал*. – 2008. – Т. 5. – С. 681–687.
11. Колесниченко А.В., **Тимофеев М.А.**, Протопопова М.В. Токсичность наноматериалов – 15 лет исследований // *Российские нанотехнологии*. – 2008. – Т. 3. – № 3–4. С. 54–61.
12. **Тимофеев М.А.**, Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Павличенко В.В., Колесниченко А.В. Сравнительное исследование клеточных механизмов терморезистентности у байкальского и палеарктического видов эврибионтных амфипод // *Сибирский экологический журнал*. – 2008. – Т. 15. – № 1. – С. 23–29.
13. **Timofeyev M.A.**, Shatilina Z.M., Bedulina D.S., Protopopova M.V., Pavlichenko V., Grabelnich O.I., Kolesnichenko A.V. Evaluation of biochemical responses in Palearctic and Lake Baikal endemic amphipod species exposed to CdCl₂ // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008. 70, № 1. P. 99–105
14. Steinberg C.E.W., Meinelt T., **Timofeyev M.A.**, Bittner M., Menzel R. Dissolved: Dissolved Humic Substances (review series). Part 2: Interactions with Organisms // *Environmental Science and Pollution Research*. 2008. 15, № 2. P. 128–135.
15. **Тимофеев М.А.** Изучение активности некоторых антиоксидантных ферментов у байкальских амфипод, локализация и размерно-возрастная зависимость // *Сибирский экологический журнал*. – 2007. – № 4. – С. 521–526.
16. **Timofeyev M.**, Shatilina Z. Different preference reactions of three Lake Baikal endemic amphipods to temperature and oxygen are correlated with symbiotic life // *Crustaceana*. 2007. 80, № 2. P. 129–138.
17. **Timofeyev M.**, Shatilina Z.M., Bedulina D.S., Menzel R., Steinberg C.E.W. Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb) and *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerst.) // *Comparative biochemistry and physiology. Part B*. 2007. 146. P. 496–503.
18. **Тимофеев М.А.**, Кириченко К.А., Бедулина Д.С. Сравнительная оценка особенностей анаэробного метаболизма у байкальских амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf.), *E. cyaneus* (Dyb.) и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars. // *Сибирский экологический журнал*. – 2006. – Т. 13. – № 6. – С. 733–739.
19. **Тимофеев М.А.**, Шатилина Ж.М., Колесниченко А.В., Бедулина Д.С. Полиморфизм белковых спектров эндемичных амфипод озера Байкал и палеарктических видов, влияние температурного стресса // *Сибирский экологический журнал*. – 2006. – № 5. – С. 571–579.
20. **Тимофеев М.А.** Особенности механизмов активации АОС у пресноводных амфипод: I. Палеарктический *Gammarus lacustris* Sars (Amphipoda, Crustacea) // *Сибирский экологический журнал*. – 2006. – № 5. – С. 623–628.

21. **Timofeyev M.A.**, Steinberg C. Antioxidant response to natural organic matter (NOM) exposure in three Baikalean amphipod species from contrasting habitats // Comparative biochemistry and physiology, Part B. 2006. 145. P. 197–203.

22. **Timofeyev M.** Antioxidant enzyme activity in endemic Baikalean *versus* Palaearctic amphipods: Tagma- and size-related changes // Comparative biochemistry and physiology, Part B. 2006. 143. P. 302–308.

23. **Timofeyev M.**, Shatilina Z., Kolesnichenko A., Kolesnichenko V., Pflugmacher S., Steinberg C. Specific antioxidants reaction to oxidative stress promoted by natural organic matter (NOM) in two endemic amphipod species from Lake Baikal // Environmental Toxicology. 2006. 21, № 2. P. 104–110.

24. **Тимофеев М.А.**, Шатилина Ж.М., Колесниченко А.В. Токсичность солей кадмия для байкальских эндемичных амфипод, некоторые биохимические последствия // Сибирский экологический журнал. – 2006. – № 2. – С. 243–248.

25. Steinberg C., Kamara S., Prokhotskaya V., Manusadžianasp L., Karasyova T., **Timofeyev M.**, Jie Z., Paul A., Meinel T., Farjallap V., Matsuo A., Burnison K., Menzel R. Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? (Review) // Freshwater Biology. 2006. 51. P. 1189–1210.

26. **Timofeyev M.**, Shatilina Z., Kolesnichenko A., Kolesnichenko V., Bedulina D., Steinberg C. Natural organic matter (NOM) promotes oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *G. tigrinus* (Sexton) // Science of The Total Environment. 2006. 366, № 2–3. P. 673–681.

27. **Тимофеев М.А.**, Шатилина Ж.М., Кириченко К.А., Бедулина Д.С., Протопопова М.В. О возможности использования показателя общей пероксидазной активности в качестве стресс-маркеров у байкальских организмов // Вестник Бурятского государственного университета. Серия 2: Химия, география, биология. Специальный выпуск. – 2006. – С. 223–229.

28. **Timofeyev M.**, Wiegand C., Burnison B.K., Shatilina Z.M., Pflugmacher S., Steinberg C.E.W. Impact of natural organic matter (NOM) on freshwater amphipods // Science of the Total Environment. 2004. 319, № 1–3. P. 115–121.

29. **Тимофеев М.А.**, Кириченко К.А. Экспериментальная оценка роли абиотических факторов в ограничении распространения эндемиков за пределы оз. Байкал на примере амфипод // Сибирский экологический журнал. – 2004. – № 1. – С. 41–50.

30. **Тимофеев М.А.**, Шатилина Ж.М., Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Грабельных О.И. Оксидативное влияние растворов гуминовых веществ на европейских и байкальских амфипод; эволюционный взгляд на причины резистентных различий // Сибирский экологический журнал. – 2003. – № 5. – С. 569–574.

31. **Тимофеев М.А.**, Шатилина Ж.М., Колесниченко А.В., Побежимова Т.П., Грабельных О.И. Стрессовые белки в системе адаптации к неблагоприятным факторам среды у пресноводных амфипод // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАН. – 2003. – № 7. – С. 149–152.

32. **Тимофеев М.А.** О возможности применения результатов биохимических исследований в изучении механизмов «несмешиваемости» // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАН. 2003. № 7. С. 146–149.

33. **Тимофеев М.А.**, Кириченко К.А., Рохин А.В. К вопросу о существовании механизмов устойчивости к гипоксии у байкальских амфипод // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАН. 2003. № 7. С. 152–155.