

На правах рукописи



ПРОТОПОПОВА Марина Владимировна

**МЕХАНИЗМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У
БАЙКАЛЬСКИХ И ПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ АМФИПОД В УСЛОВИЯХ
ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ КАДМИЯ**

03.02.10– гидробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

г. Красноярск 2011 г.

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет», г. Иркутск.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
Тимофеев Максим Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Гладышев Михаил Иванович
Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск

кандидат биологических наук

Калюжная Оксана Викторовна
Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок

Защита диссертации состоится «18» марта 2011 г. в 10 часов на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 212.099.15 при Сибирском федеральном университете по адресу: 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, ауд. Р 8-06
Тел./факс: (391) 291 28 29 E-mail: nikgna@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Сибирского федерального университета.

Автореферат разослан «17» января 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент



Н. А. Гаевский

Актуальность проблемы. В настоящее время в результате роста промышленного производства увеличивается антропогенная нагрузка на водные экосистемы (Laws, 2000; Camargo et al., 2006; Chuiko, 2007). Токсическое загрязнение водных экосистем соединениями тяжелых металлов является одним из наиболее распространенных последствий антропогенного воздействия на водоемы (Gladyshev et al, 2001).

Особенно негативно последствия токсического загрязнения могут отразиться на существовании древних пресноводных сообществ, население которых представлено в основном узкоадаптированными видами-эндемиками (Brooks et al, 2006; Forest et al., 2007). Одной из таких экосистем является озеро Байкал, характеризующееся огромным биоразнообразием и высоким уровнем эндемизма. Исследований возможного влияния токсического воздействия на физиологическое состояние байкальского бентоса до настоящего времени практически не проводилось. Проводимые работы в основном выполнены на уровне оценки токсикорезистентных способностей видов по показателю их выживаемости в растворах различных токсических веществ (Косолапов, 1982; Черепанов и др., 1981; Камалтынов, 1983 Стом и др., 2003) или поведенческих реакций (Волков, 1983).

Эндемичные амфиподы (Crustacea, Amphipoda) являются одной из важнейших бентосных групп организмов Байкала. Одними из наиболее важных и хорошо изученных механизмов неспецифической резистентности организмов являются антиоксидантная система (Varata et al., 2005; Меньшикова, 2006) и белки теплового шока (БТШ) (Evgen'ev et al., 1985; Baird et al., 2006; Rozhkova et al., 2010). Некоторые клеточные механизмы стресс-ответа при интоксикации у байкальских и палеарктических амфипод освещены в работах группы ученых под руководством М.А. Тимофеева (Тимофеев и др., 2006; Timofeyev et al., 2008). Тем не менее, специфика этих механизмов у байкальских эндемиков требует дальнейшего изучения. Исходя из этого, большую актуальность приобретают исследования механизмов резистентности к токсическому воздействию у байкальских эндемичных видов.

Цель исследования. Целью исследования являлось изучение особенностей активации ключевых механизмов неспецифической резистентности (белков теплового шока и ферментов антиоксидантной системы) у байкальских и палеарктических амфипод в условиях интоксикации хлоридом кадмия.

Для достижения цели исследования необходимо было решить следующие **задачи.**

1. Провести оценку влияния интоксикации хлоридом кадмия на уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод.

2. Провести оценку влияния интоксикации хлоридом кадмия на активность ключевых ферментов антиоксидантной системы у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод.

3. Провести оценку влияния интоксикации хлоридом кадмия на изменение содержания белков теплового шока семейств БТШ70 и низкомолекулярных БТШ (нмБТШ) у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод.

4. Провести оценку влияния интоксикации хлоридом кадмия на процессы анаэробного гликолиза у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод.

Научная новизна.

Впервые были получены данные об особенностях активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) у байкальских и палеарктических амфипод в условиях интоксикации. Была установлена зависимость между степенью активации процессов ПОЛ и токсикорезистентностью видов. Получены новые данные об изменении активности антиоксидантных ферментов (каталаза, пероксидаза, глутатион S-трансфераза) у байкальских и палеарктических амфипод в условиях интоксикации. Выявлены различия в реакции антиоксидантных ферментов у амфипод, различающихся по своим токсикорезистентным способностям. Впервые было показано, что у байкальских и палеарктических амфипод происходит увеличение содержания белков БТШ70 в условиях интоксикации. Была выявлена зависимость между интенсивностью накопления белков семейств БТШ70 и нмБТШ и степенью токсикорезистентности видов. Впервые показано, что в условиях интоксикации у байкальских и палеарктических амфипод происходит увеличение доли анаэробного гликолиза в энергетическом метаболизме. Установлена зависимость между скоростью накопления конечного продукта анаэробного гликолиза - лактата и степенью токсикорезистентности видов.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты диссертационной работы расширяют имеющиеся к настоящему времени в литературе представления об общих и специфических механизмах физиологических и биохимических адаптаций водных организмов и вносят значительный вклад в развитие представлений о взаимоотношениях организма и среды. Полученные данные представляют особый интерес для понимания вопросов экологии и эволюции байкальской фауны. Результаты могут быть использованы при прогнозировании влияния промышленного загрязнения на

состояние водных экосистем, для разработки высокоэффективных биомаркеров состояния гидробиоценозов при совершенствовании различных систем мониторинга, и, в первую очередь, для уникальной экосистемы оз. Байкал. Материалы данного исследования включены в учебный процесс Иркутского государственного университета (ИГУ) при чтении курсов лекций на биолого-почвенном факультете («Практикум по экологии», «Современные проблемы лимнологии»), при проведении полевых учебных практик для студентов ИГУ, а также включены в программу российско-германской летней школы «Лимноэкология озера Байкал» (ИГУ – Университет Кристиана-Альбрехта, г. Киль, Германия).

Основные положения, выносимые на защиту

1. В условиях интоксикации хлоридом кадмия у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод происходит развитие окислительного стресса, что сопровождается снижением активности ферментов антиоксидантной системы и усилением процессов перекисного окисления липидов.

2. В условиях интоксикации хлоридом кадмия у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод происходит увеличение доли анаэробного гликолиза в энергетических процессах.

3. Белки теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ являются элементами защитных механизмов байкальских и палеарктических амфипод к токсическому воздействию хлорида кадмия.

4. Степень и скорость активации механизмов клеточной резистентности в условиях интоксикации хлоридом кадмия у амфипод разных видов отличаются и связаны с показателями токсикорезистентности видов.

Апробация работы. Об основных результатах докладывалось на следующих конференциях: Международной научной конференции «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных» (г. Саранск, 2005 г.); Ежегодной научно-теоретической конференции молодых ученых ИГУ (г. Иркутск, 2006 г.); VII региональной научно-практической конференции молодых ученых (г. Иркутск, 2006); Международной научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2» (пос. Борок, 2007 г.); I Международной школы-конференции «Актуальные вопросы изучения микро-, мейо-зообентоса и фауны зарослей пресноводных водоемов» (пос. Борок, 2007 г.); Международном симпозиуме «Научно образовательный центр "Байкал": стратегия развития» (пос. Большие Коты, 2007 г.); Ежегодной научно-теоретической конференции аспирантов и студентов ИГУ (г. Иркутск,

2007 г.), III Всероссийской конференции по водной токсикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы», конференции по гидроэкологии «Критерии оценки качества вод и методы нормирования антропогенных нагрузок» и школе-семинаре «Современные методы исследования и оценки качества вод, состояния водных организмов и экосистем в условиях антропогенной нагрузки» (пос. Борок, 2008 г.); Американско-Российской двухсторонней конференции по охране здоровья гидробионтов «US-Russia conference Aquatic Animal Health» (США, 2009), 14 международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», (Москва, 2010 г.), 5 международной Верещагинской байкальской конференции (г. Иркутск, 2010 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано **45** печатных работ. Из них: статей в журналах, рекомендованных ВАК – **12** (в зарубежных журналах системы Web of Science – **3**; в российских изданиях – **9**); в других изданиях – **9**; тезисов конференций – **24**.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на **144** страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, в которой приводится постановка цели и задач исследования, методической и экспериментальной частей, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа включает **40** рисунков. Список литературы состоит из **309** источников, из них **157** на русском и **152** на английском языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы амфиподы двух фаунистических групп. Байкальские эндемичные виды: *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf.), *E. vittatus* (Dyb.), *E. cyaneus* (Dyb.), *E. marituji* Baz., *E. maackii* (Dyb.), *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.), *Ommatogammarus flavus* (Dyb.) и общераспространенные палеарктические виды: *Gammarus lacustris* Sars. и *Gammarus tigrinus* (Sexton).

По литературным данным, токсикорезистентность выбранных видов представляет собой следующий относительный ряд: $O. flavus < E. marituji < E. cyaneus \leq E. verrucosus = E. maackii < G. lacustris = G. tigrinus < E. vittatus = G. fasciatus$ (Тимофеев, 2000, Chambers, 1977; Szaniawska et al., 2003, Wijnhoven et al., 2003).

Материал был собран в 2005–2010 гг. Сбор литоральных амфипод проводили на глубинах 0,5–1 м с использованием гидробиологического сачка, глубоководные виды были отловлены на глубине 100–400 м с помощью драги,

дночерпателя, глубоководных ловушек. Байкальских амфипод отлавливали в прибрежной зоне озера Байкал в районе пос. Листвянка и пос. Большие Коты (Южный Байкал). *G. lacustris* отлавливали в озере, расположенном в черте г. Иркутска в непосредственной близости от р. Ангара и небольшом озере в районе пос. Большие Коты на расстоянии не более 1 км от побережья оз. Байкал. *G. tigrinus* отлавливали на урзе озера Mugulsee федеральной земли Бранденбург (Германия).

Амфипод содержали отдельно по видам в аэрируемых аквариумах при температуре 6–8°C. В экспериментах использовали здоровых и активно плавающих рачков, предварительно акклимированных (преакклимированных) не менее 1–2 суток. Амфипод кормили один раз в сутки коммерческим препаратом TetraMin (Германия). Преакклимацию животных и приготовление растворов токсиканта для экспериментов проводили, используя воду из озера Байкал. Предварительно акклимированных амфипод экспонировали в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л в аэрированных аквариумах. Длительность экспозиции составляла от 30 минут до 3 суток. Амфипод контрольной группы содержали в условиях аналогичных акклимации. После экспозиции живых рачков замораживали в жидком азоте для дальнейших биохимических анализов.

Методы биохимического анализа. Для биохимических анализов использовали целых особей амфипод. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию диеновых конъюгатов (ДК), первичных продуктов ПОЛ, согласно методике И.Д. Стальной (1977) с модификациями (Тимофеев и др., 2003). Уровень анаэробного гликолиза оценивали по содержанию его конечного продукта – лактата. Измерение содержания лактата проводили энзиматическим спектрофотометрическим методом с помощью стандарт-набора согласно протоколу фирмы-производителя (Vital diagnostic, СПб) с модификациями (Павличенко и др., 2009). Активность пероксидазы определяли согласно методике Drotar et al. (1985) с модификациями (Timofeyev et al., 2009), используя в качестве субстрата гваякол при $\lambda = 456$ нм, $T = 25^\circ\text{C}$ и $\text{pH} = 5$. Активность каталазы определяли согласно Н. Aebi (1984) с модификациями (Timofeyev et al., 2009), используя в качестве субстрата перекись водорода (H_2O_2) при $\lambda = 240$ нм, $T = 25^\circ\text{C}$ и $\text{pH} = 7$. Активность глутатион-S-трансферазы определяли согласно W. Habig (1974) с модификациями (Timofeyev et al., 2009), используя в качестве субстратов глутатион и 1-хлор-2,4-динитробензен (CDNB) при $\lambda = 340$ нм, $T = 25^\circ\text{C}$ и $\text{pH} = 6,5$. Концентрацию общего белка в пробах измеряли по методу Бредфорд (1976)

или методу Лоури (1951). Оценку содержания БТШ проводили с помощью стандартного метода денатурирующего электрофореза (Laemmli, 1970) и последующего Вестерн-блоттинга (Bers, Garfin, 1985).

Расчет и статистическая обработка данных. Все эксперименты поставлены в 5 и более повторностях в 3 параллельных группах в каждом эксперименте. Биохимические измерения проводили не менее чем в 3-х повторностях из каждой пробы.

Калибровку электрофореграмм проводили с использованием специализированных программ Sigma Gel (USA) и Total Lab V 1.6 (USA). Для статистической обработки количественных данных пользовались общепринятыми методами: рассчитывали средние арифметические величины, и доверительный интервал. Проверку нормальности распределения осуществляли при помощи критерия Шапиро-Уилка. Оценку достоверности производили с использованием двухвыборочного t-теста Стьюдента. Для проверки статистических гипотез при использовании множественных сравнений также использовали критерий Бонферрони. Статистический анализ проводили с использованием программ Biostat 3.03 и Statistica 5.0. На диаграммах указаны доверительные интервалы. *- обозначены случаи достоверного отличия значений от контрольного при доверительной вероятности – 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение уровня перекисного окисления липидов у амфипод в условиях интоксикации

В исследовании были использованы следующие виды амфипод: *E. cyaneus*, *E. marituji*, *E. verrucosus*, *E. maackii* и *G. lacustris*. Было проведено более 100 анализов, в которых было использовано более 300 рачков.

Как показало проведенное исследование, у токсикочувствительных байкальских *E. cyaneus* и *E. marituji* происходило увеличение уровня ДК уже после 3 часов экспозиции в растворах хлорида кадмия (Рис. 1). Затем содержание ДК возвращалось к контрольному значению. У *E. marituji* это происходило после 12 часов, а у *E. cyaneus* только после 3 суток эксперимента

У токсикорезистентных байкальского *E. vittatus* и палеарктического *G. lacustris* на протяжении всего эксперимента достоверного увеличения содержания ДК не наблюдали.

Таким образом, установлено, что в условиях интоксикации у токсикочувствительных видов происходило увеличение уровня ДК, при этом у более устойчивых среди них отмечали и более быстрое восстановление уровня ДК до контрольного значения в течение экспозиции. У наиболее

токсикорезистентных среди всех использованных видов увеличения содержания ДК не отмечено.

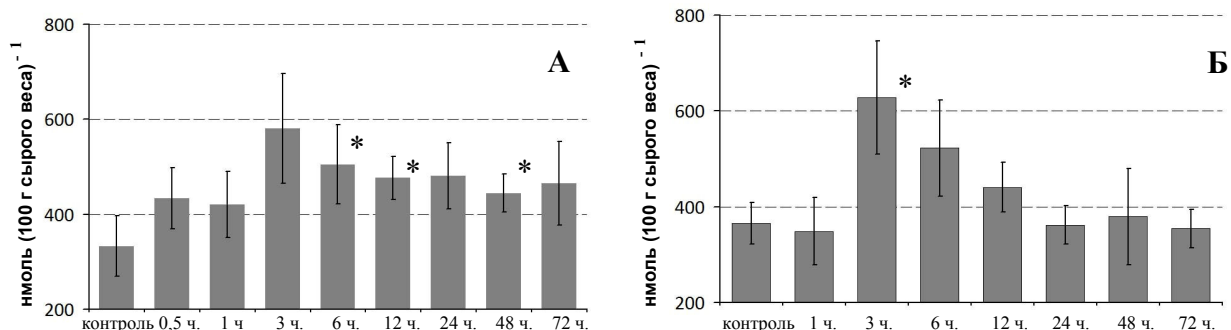


Рисунок 1 - Уровень ПОЛ у *E. cyaneus* (А) и у *E. maritimi* (Б), экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л
* - статистически достоверное отклонение от контроля при $P < 0,05$.

Изменения активности антиоксидантных ферментов у амфипод в условиях интоксикации

В исследовании были использованы виды: *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *G. tigrinus* и *G. lacustris*. В ходе работы было проведено более 130 анализов, в которых использовано более 600 особей рачков.

В результате проведенного исследования установлено, что экспозиция байкальского *E. cyaneus* в растворах хлорида кадмия приводит к постепенному снижению активности фермента на протяжении всего эксперимента (Рис. 2). Достоверное снижение активности пероксидазы фиксировали уже после 6 часов. У байкальского *E. verrucosus* достоверное снижение отмечали только через 72 часа экспозиции (Рис. 2).

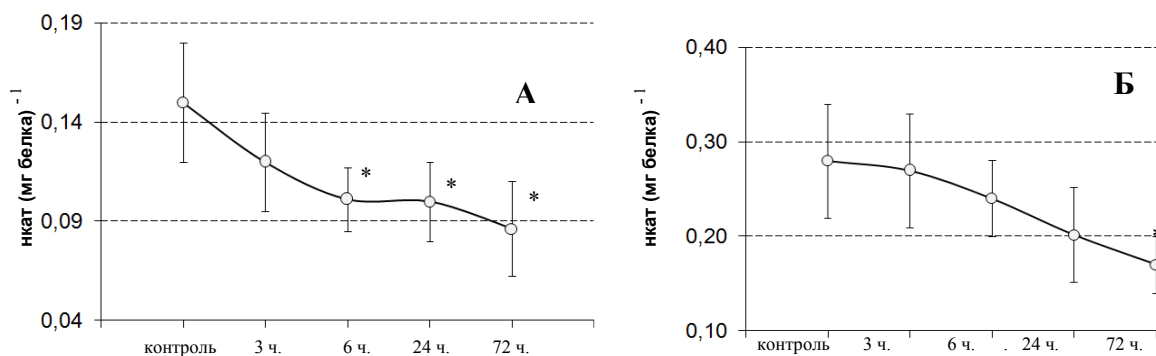


Рисунок 2 - Активность пероксидазы у *E. cyaneus* (А) и *E. verrucosus* (Б), экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л,
* - статистически достоверное отклонение от контроля при $P < 0,05$.

У палеарктических *G. lacustris* и *G. tigrinus* отмечали снижение активности пероксидазы после 72 часов экспозиции в растворах хлорида кадмия (Рис. 3).

Экспозиция байкальских *E. cyaneus* и *E. verrucosus*, а также палеарктических *G. lacustris* и *G. tigrinus* в растворах хлорида кадмия не вызывала изменений активности каталазы на протяжении всего эксперимента.

При определении изменения активности глутатион S-трансферазы наблюдали большее разнообразие реакций. Так экспозиция *E. cyaneus* в растворах хлорида кадмия вызывала снижение активности глутатион S-трансферазы после 24 часов, а у *E. verrucosus* отмечали уже после 3 часов эксперимента (Рис. 4). В отличие от байкальских видов, у палеарктических *G. lacustris* и *G. tigrinus* достоверных изменений активности глутатион S-трансферазы в течение всего эксперимента отмечено не было.

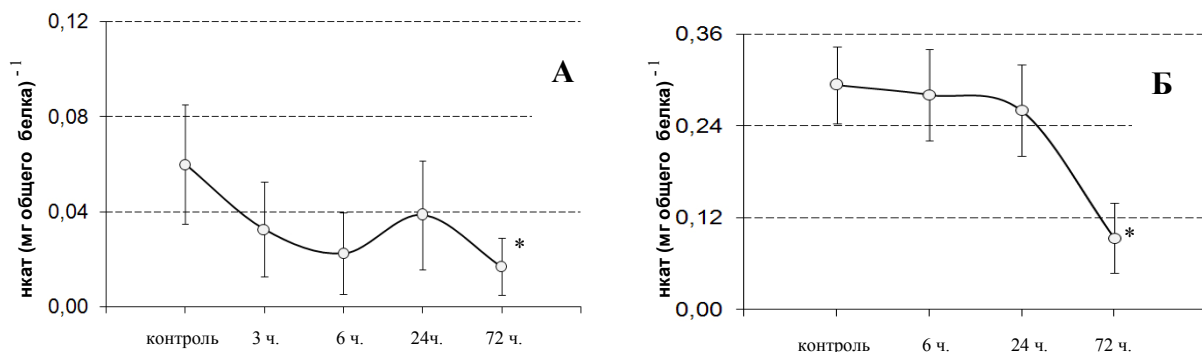


Рисунок 3 - Активность пероксидазы у *G. lacustris* (А) и *G. tigrinus* (Б), экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л
*- статистически достоверное отклонение от контроля при P<0,05.

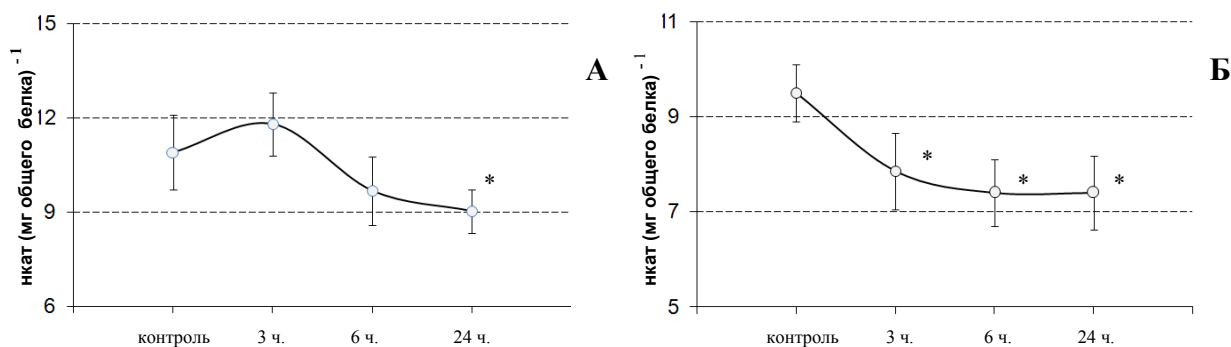


Рисунок 4 - Активность глутатион S-трансферазы у *E. cyaneus* (А) и *E. verrucosus* (Б), экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л
*- статистически достоверное отклонение от контроля при P<0,05.

Таким образом, в ходе исследования была обнаружена выраженная зависимость времени начала снижения активности пероксидазы с токсикорезистентностью видов. У наиболее токсико-чувствительного байкальского *E. cyaneus* было зафиксировано самое раннее снижение активности пероксидазы. В то время как у более токсикорезистентных *G. lacustris*, *E. verrucosus* и *G. tigrinus* снижение активности пероксидазы наблюдали только после 6 суток экспозиции. У наиболее резистентных к интоксикации палеарктических *G. lacustris* и *G. tigrinus* падение активности пероксидазы не сопровождалось снижением активности глутатион S-трансферазы. Напротив, у более токсикочувствительных байкальских видов

происходило снижение активности как пероксидазы, так и глутатион S-трансферазы.

Изменения содержания белков теплового шока при интоксикации

В работе проводили оценку изменения уровня белков семейств БТШ70 и нмБТШ у амфипод в условиях интоксикации. В исследовании были использованы следующие виды: *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *G. fasciatus*, *O. flavus*, *G. lacustris* и *G. tigrinus*. В ходе работы было проведено более 200 анализов, в которых использовано более 4000 особей рачков.

Результаты исследования показали, что экспозиция *E. verrucosus* в растворах хлорида кадмия приводила к многократному увеличению содержания БТШ70 после 6 часов, а нмБТШ после 3 часов. После 24 часов экспозиции отмечали снижение содержания белков обоих семейств, которое все же многократно превышало их контрольные значения (Рис. 5).

У *G. fasciatus* увеличение содержания нмБТШ наблюдали после 3 часов, а БТШ70 только после 24 часов экспозиции амфипод в растворах хлорида кадмия.

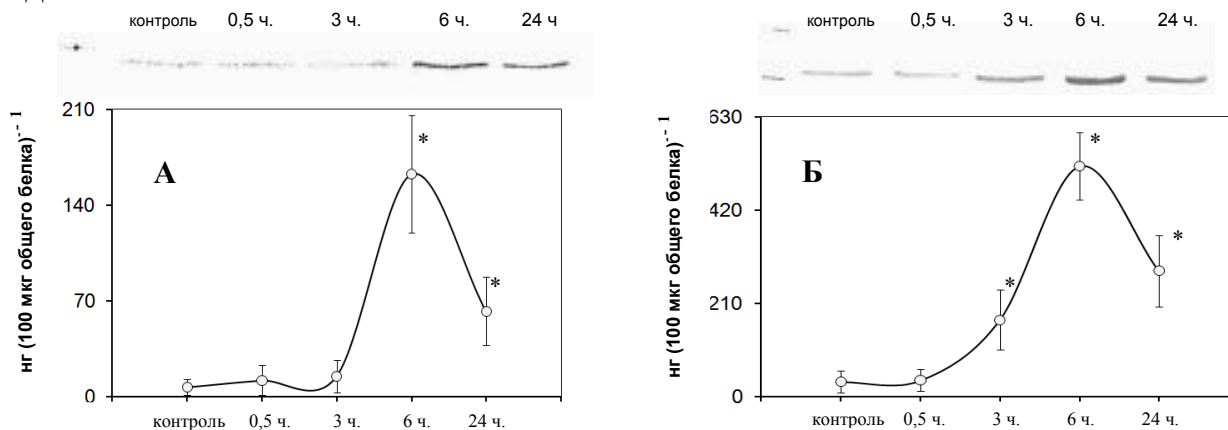


Рисунок 5 - Вестерн-блоттинг *E. verrucosus*, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л. Мембраны инкубированы в растворах антител к БТШ70 (А) и нмБТШ (Б). Вверху типовая мембрана, внизу усредненная полуколичественная оценка
* - статистически достоверное отклонение от контроля при $P < 0,05$.

У *E. vittatus* многократное увеличение содержания БТШ70 происходило после 24 часов, а достоверное увеличение содержания нмБТШ наблюдали уже после 1 часа эксперимента и его содержание продолжало увеличиваться до 24 часов эксперимента (Рис. 6).

Экспозиция амфипод *G. lacustris* в растворах токсиканта приводила к увеличению уровня БТШ70 через 6 часов эксперимента, а через 12 часов наблюдали максимальное содержание белка (Рис. 7). Максимальное содержание нмБТШ отмечали после 24 часов эксперимента.

У глубоководного *O. flavus* наблюдали крайне низкое содержание белков семейств БТШ70 и нмБТШ даже в контрольных условиях. В течение первых часов экспозиции в растворах хлорида кадмия содержание БТШ70 и нмБТШ у амфипод не изменялось, оставаясь в большинстве экспериментов на уровне, близком к контрольному значению (Рис. 8). Содержание БТШ70 и нмБТШ достигало детектируемого уровня только после 3 часов эксперимента, но даже максимальные количества БТШ были на несколько порядков ниже конститутивного уровня БТШ у литоральных видов.

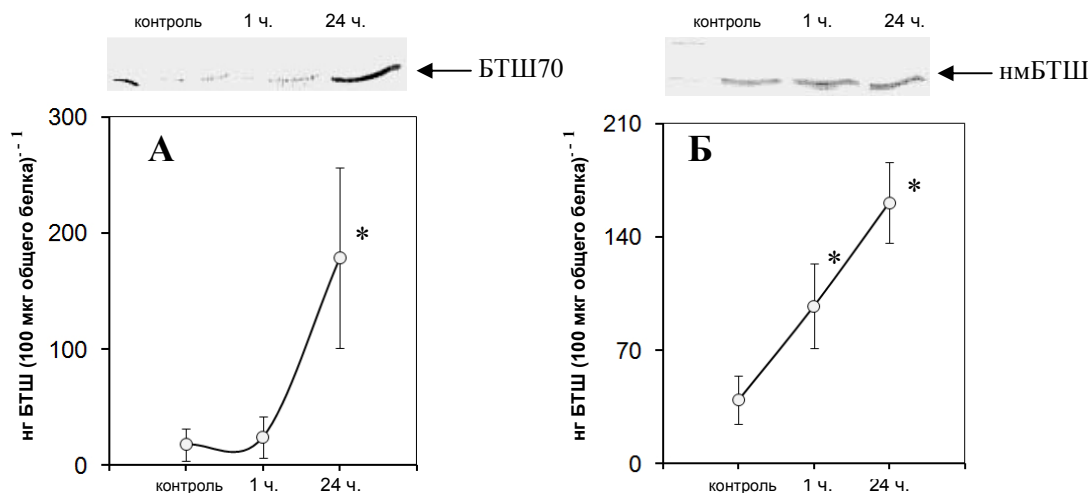


Рисунок 6 - Вестерн-блоттинг *E. vittatus*, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л. Мембраны инкубированы в антителах к БТШ70 (А) и нмБТШ (Б). Вверху типовая мембрана, внизу усредненная полуколичественная оценка
* - статистически достоверное отклонение от контроля при P<0,05.

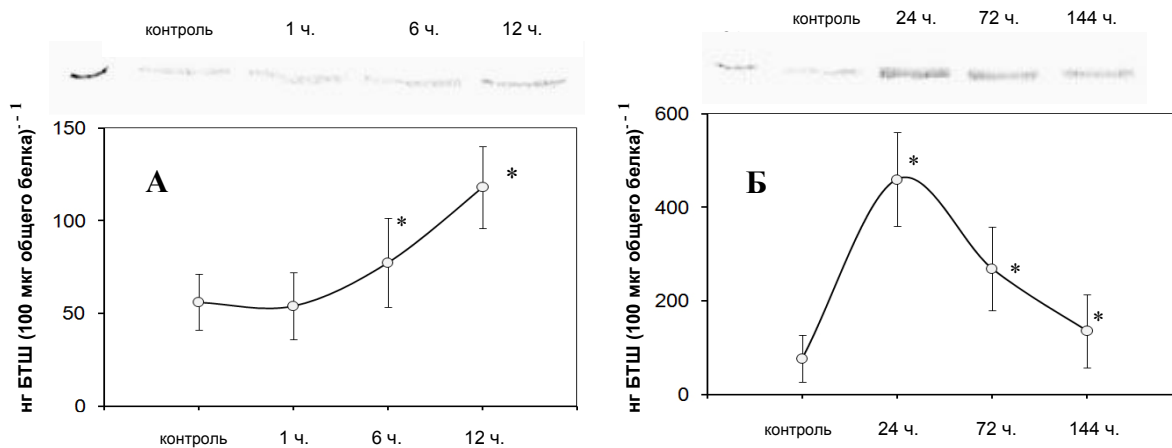


Рисунок 7 - Вестерн-блоттинг *G. lacustris*, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л. Мембраны инкубированы в растворах антител к БТШ70 (А) и нмБТШ (Б). Вверху типовая мембрана, внизу усредненная полуколичественная оценка
* - статистически достоверное отклонение от контроля при P<0,05.

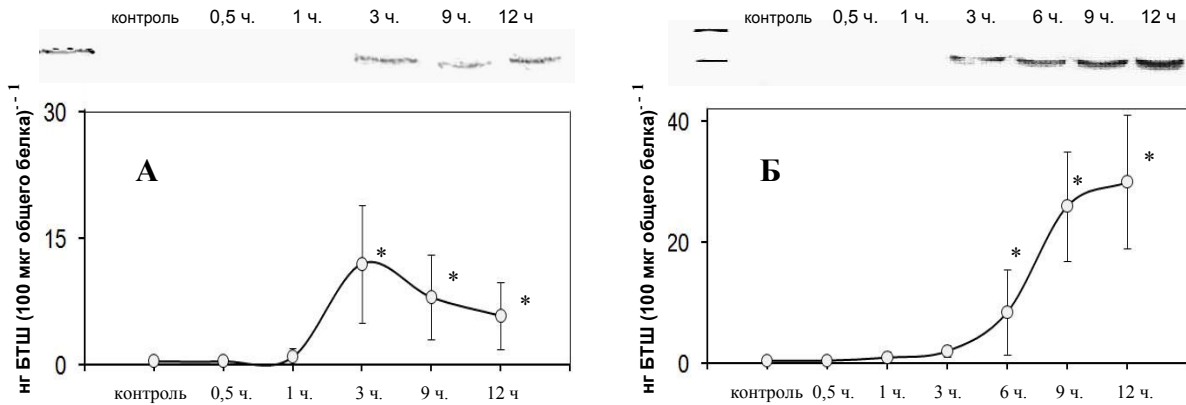


Рисунок 8 - Вестерн-блоттинг *O. flavus*, экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л. Мембраны инкубированы в растворе антител к БТШ70 (А) и нмБТШ (В). Вверху типовая мембрана, внизу усредненная полуколичественная оценка
* - статистически достоверное отклонение от контроля при P<0,05.

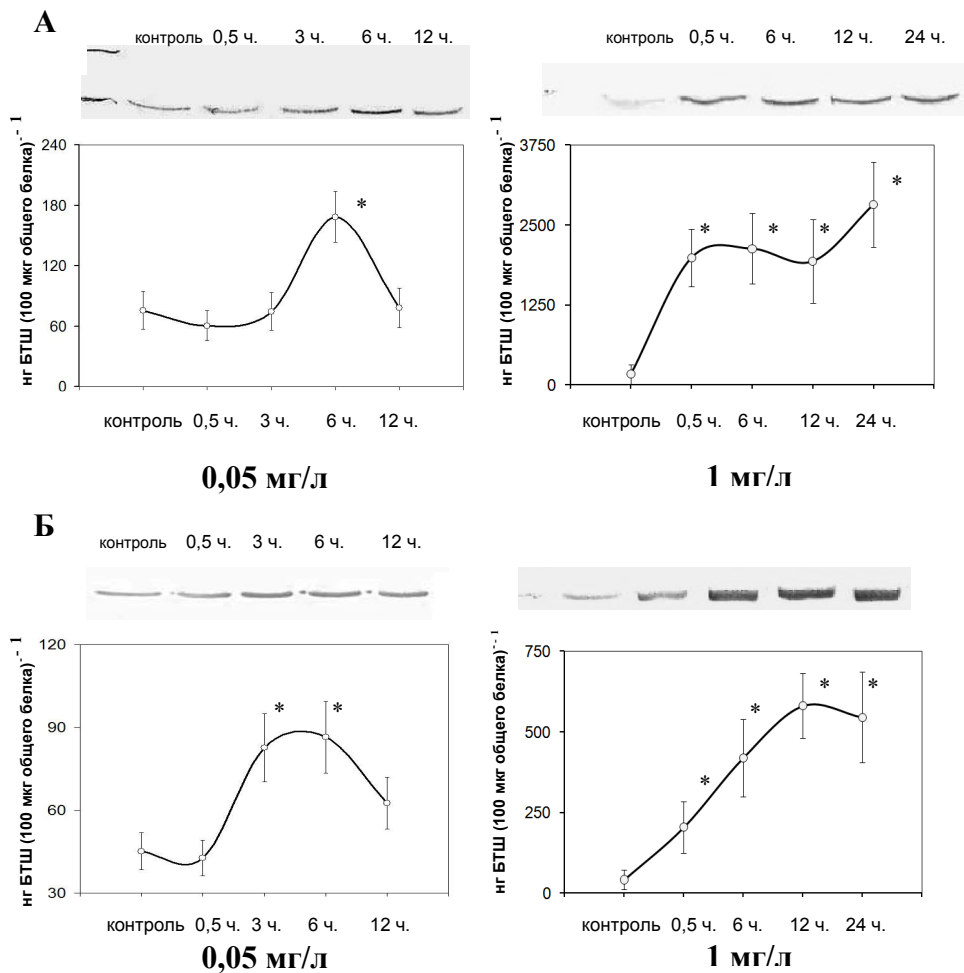


Рисунок 9 - Вестерн-блоттинг *E. suaveus*, экспонированных в растворах хлорида кадмия с различными концентрациями. Мембраны инкубированы в растворах антител к БТШ70 (А) и нмБТШ (Б). Вверху типовая мембрана, внизу усредненная полуколичественная оценка
* - статистически достоверное отклонение от контроля при P<0,05.

В условиях интоксикации хлоридом кадмия у амфипод была выявлена характерная зависимость «доза–эффект» (Рис. 9). При использовании более высоких концентраций токсиканта достоверное увеличение содержания БТШ происходило на более ранних этапах и максимальный уровень накопленных белков бы выше, чем при использовании низких концентраций (Рис. 9).

Таким образом, результаты исследования показали, что у всех изученных видов происходит увеличение содержания БТШ обоих исследованных семейств в условиях интоксикации хлоридом кадмия.

Обнаружено, что при экспонировании амфипод в растворах с более высокой концентраций токсиканта достоверное увеличение содержания БТШ происходило на более ранних этапах и максимальный уровень накопленных белков бы выше, чем в растворах с низкой концентрацией. Показано, что литоральные и глубоководные виды отличаются как по срокам начала накопления БТШ, так и по уровню накопленного белка. У наиболее токсикочувствительных глубоководных видов накопление БТШ происходило медленнее и в меньшей степени, чем у более токсикорезистентных литоральных видов.

Изменение уровня анаэробного гликолиза у амфипод в условиях интоксикации

Как показали полученные результаты, у амфипод в условиях интоксикации происходит активация серии защитных механизмов, что требует высоких энергозатрат. Одним из механизмов поддержания энергопродукции в клетках на необходимом уровне в условиях энергодефицита является активация процессов анаэробного гликолиза (Pörtner, Knust, 2007). Анаэробный гликолиз является малоэффективным путем получения энергии, и переход на него является вынужденной мерой для организма. Кроме того, активация гликолиза приводит к множеству негативных последствий в клетках, в том числе к ацидозу. Логично предположить, что у более токсикорезистентных видов механизмы, обеспечивающие стабильность клеточного дыхания в условиях интоксикации, должны быть развиты в большей степени, а переключение с аэробного на анаэробный путь получения энергии должно происходить на более поздних этапах.

Для проверки данной гипотезы, были использованы следующие виды амфипод: *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. marituji* и *E. vittatus*, *G. lacustris*. Было проведено более 160 анализов, в которых было использовано более 500 рачков.

Установлено, что достоверное увеличение содержания лактата у *E. cyaneus* происходило уже через 30 минут экспозиции, максимальный уровень лактата отмечали после 6 часов (Рис. 10).

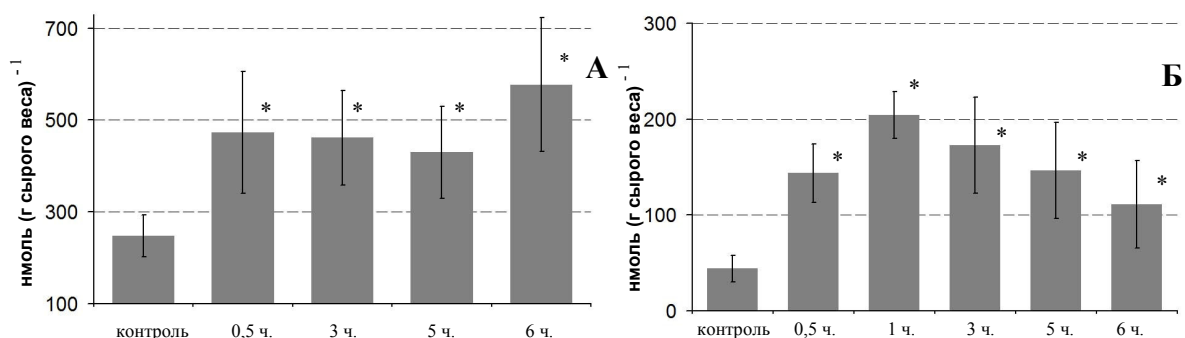


Рисунок 10- Содержание лактата у *E. cyaneus* (А) и *E. verrucosus* (Б), экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л
*- статистически достоверное отклонение от контроля при $P < 0,05$.

У *E. verrucosus* также наблюдали увеличение содержания лактата после 30 минут эксперимента, максимальное содержание лактата отмечали после 1 часа, после чего, его содержание снижалось, однако по-прежнему было выше контрольного значения (Рис. 10).

У *G. lacustris* (Рис. 11) достоверное увеличение содержания лактата происходило после 2 часов эксперимента, но уже после 3 часов содержание лактата снижалось до контрольного уровня.

Достоверное увеличение содержания лактата у наиболее токсикорезистентного *E. vittatus* наблюдали только после 6 часов экспозиции (Рис. 11).

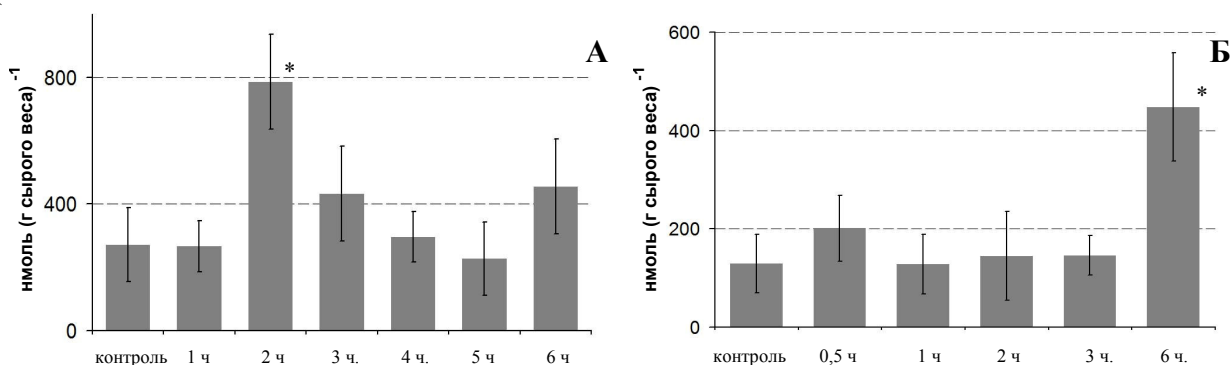


Рисунок 11 - Содержание лактата у *G. lacustris* (А) и *E. vittatus* (Б), экспонированных в растворах хлорида кадмия с концентрацией 0,05 мг/л (нмоль/г сыр. веса)
*- статистически достоверное отклонение от контроля при $P < 0,05$.

Таким образом, обнаружено, что в условиях интоксикации общей реакцией для всех видов амфипод является увеличение уровня лактата. При этом у более токсикорезистентных видов *G. lacustris* и *E. vittatus* достоверное увеличение содержания лактата происходит позднее, чем у токсикочувствительных видов. Полученные данные позволяют предположить,

что токсикочувствительные виды обладают менее эффективными механизмами перераспределения и расходования энергии в условиях интоксикации и переключение на анаэробный гликолиз у них происходит быстрее, чем у токсикорезистентных видов.

ОБЩЕЕ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что различия в функционировании защитных механизмов у амфипод разных видов в условиях интоксикации определяют их токсикорезистентность.

Так, в условиях интоксикации хлоридом кадмия у более токсикорезистентных видов (*E. vittatus* и *G. lacustris*) не происходит увеличения содержания ДК. У более токсикочувствительных видов (*E. cyaneus* и *E. maritiji*), наоборот, отмечено накопление ДК. Увеличение содержания ДК свидетельствует об увеличении интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и, соответственно, о развитии окислительного стресса у амфипод. Вероятно, что более токсикорезистентные виды обладают более эффективными антиоксидантными механизмами, снижающими уровень ПОЛ, а также более эффективными механизмами элиминации продуктов ПОЛ, образующихся у амфипод в результате токсического воздействия. У более токсикочувствительных видов эти механизмы, видимо, развиты в меньшей степени, что и приводит к накоплению у них ДК.

Для всех исследованных видов, вне зависимости от их фаунистической принадлежности, характерно снижение активности пероксидазы в условиях интоксикации хлоридом кадмия. У более токсикочувствительных видов снижение активности пероксидазы происходит на более ранних этапах, чем у более токсикорезистентных. У резистентных к интоксикации палеарктических видов падение активности пероксидазы не сопровождается снижением активности глутатион S-трансферазы. У наиболее токсикочувствительных среди байкальских видов происходит снижение активности как пероксидазы, так и глутатион S-трансферазы. Снижение активности антиоксидантных ферментов можно объяснить прямым ингибированием ионами кадмия (Romeo et al., 2000; Orbea et al., 2002). Процесс нарушения конформации пероксидазы у амфипод может компенсироваться активным синтезом новых молекул фермента. По-видимому, токсикорезистентные палеарктические виды в условиях интоксикации способны поддерживать синтез новых ферментов более длительное время, в отличие от байкальских токсикочувствительных видов. Снижение способности к синтезу новых антиоксидантных ферментов у байкальских амфипод приводит к увеличению образования перекисных

продуктов, за элиминацию которых ответственна глутатион S-трансфераза. В результате увеличения потребности клеток в функционировании глутатион S-трансферазы должен усиливаться износ молекул фермента. В то же время возможности дополнительного синтеза новых молекул фермента ограничены, вследствие чего, вероятно, и наблюдается падение ферментативной активности глутатион S-трансферазы, что ведет к снижению резистентных возможностей организма и его способности к выживанию в условиях токсического стресса. У более токсикочувствительных видов данные процессы происходят быстрее и с большей интенсивностью, чем у токсикорезистентных видов.

Для всех исследованных видов характерно увеличение количества БТШ при интоксикации хлоридом кадмия. Было обнаружено, что при экспонировании амфипод в растворах с более высокой концентраций токсиканта достоверное увеличение содержания БТШ происходило на более ранних этапах и максимальный уровень накопленных белков бы выше, чем при экспонировании в растворах низкой концентрацией. Можно предположить, что синтез БТШ направлен на противодействие и (или) компенсацию негативных последствий интоксикации. Было показано, что литоральные и глубоководные виды отличаются как по срокам начала накопления БТШ, так и по количеству накопленного белка. У наиболее токсикочувствительных глубоководных видов накопление БТШ происходит медленнее и в меньшей степени, чем у более токсикорезистентных литоральных видов. По-видимому, задержка синтеза БТШ у глубоководных видов должна приводить к высокой степени токсического повреждения и, вероятно, в существенной степени определять их повышенную чувствительность к интоксикации.

Для всех исследованных видов характерен рост уровня лактата в условиях интоксикации. Это свидетельствует об увеличении доли анаэробного гликолиза в энергетическом обмене амфипод. При этом выявлено, что у более токсикочувствительных видов увеличение доли энергетически малоэффективного анаэробного гликолиза происходит быстрее по сравнению с более токсикорезистентными видами. Причины увеличения доли анаэробных процессов помимо возросших энергетических потребностей амфипод в условиях интоксикации следует также связывать с нарушением функционирования электрон-транспортной цепи митохондрий и ингибированию процессов окислительного фосфорилирования (Sokolova, 2004; Geret et al., 2002; Viarengo, 1989). В условиях энергодефицита клетка поддерживает энергетические потребности за счет активации процессов анаэробного гликолиза, что приводит к увеличению его конечного продукта - лактата. Кроме того, при нарушении

работы дыхательной цепи наблюдается снижение потребления пирувата, образовавшегося в результате гликолиза. В результате, избыток образовавшегося пирувата восстанавливается в лактат, чтобы освободить переносчики протонов и электронов, необходимые для непрерывного протекания гликолиза (Маянский, 1994). Независимо от причины, накопление лактата приводит к развитию ацидоза, который, в свою очередь, дополнительно усиливает повреждение мембранных структур и развитие патологических процессов в клетках.

ВЫВОДЫ

1. В условиях интоксикации хлоридом кадмия у токсикочувствительных байкальских эндемичных амфипод происходит усиление процессов ПОЛ, в то время как у токсикорезистентных палеарктических видов уровень ПОЛ достоверно не изменяется.

2. В условиях интоксикации хлоридом кадмия у всех исследованных видов амфипод происходит снижение активности пероксидазы. У токсикочувствительных видов снижение активности фермента происходит раньше, чем у токсикорезистентных видов.

3. В условиях интоксикации хлоридом кадмия у всех исследованных видов амфипод не происходит изменений активности каталазы.

4. В условиях интоксикации хлоридом кадмия у более токсикочувствительных байкальских эндемичных амфипод происходит снижение активности глутатион S-трансферазы, в то время как у более токсикорезистентных палеарктических видов активность фермента достоверно не изменяется.

5. В условиях интоксикации хлоридом кадмия у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод происходит увеличение содержания белков БТШ70 и нмБТШ. Интенсивность увеличения зависит от концентрации токсиканта. У наиболее токсикочувствительных глубоководных видов амфипод накопление БТШ происходит в меньшей степени, чем у более токсикорезистентных литоральных видов.

6. В условиях интоксикации хлоридом кадмия у байкальских эндемичных и палеарктических амфипод происходит увеличение доли анаэробных процессов в энергетическом метаболизме, что сопровождается увеличением содержания лактата. У видов, более чувствительных к интоксикации, увеличение доли анаэробного гликолиза происходит раньше, чем у токсикорезистентных видов.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

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

1. Шатилина Ж.М., Губанов М.В., Задереев Е.С., Павличенко В.В., Аксёнов-Грибанов Д.В., Сапожникова Е.А., **Протопопова М.В.**, Бедулина Д.С., Тимофеев М.А. Сравнительное исследование клеточных механизмов термоустойчивости у представителей популяций *Gammarus lacustris* Sars, населяющих соленое оз. Шира (респ. Хакассия) и пресный водоем Прибайкалья. // Доклады Академии наук. – 2010 – Т. 434. - № 6. – С. 1-4.

2. 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.

3. 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.

4. Тимофеев М. А., Шатилина Ж.М., Павличенко В.В., Бедулина Д.С., **Протопопова М.В.**, Аксенов-Грибанов Д.В., Сапожникова Е.А.. Оценка активности механизма множественной резистентности пресноводных амфипод к ксенобиотикам по интенсивности выведения родамина С. Известия Иркутского государственного университета, Серия «Биология. Экология», 2010. Т. 3, № 2. С. 14–19.

5. Timofeyev M., **Protopopova M.**, Pavlichenko V, Steinberg C. Can acclimation of amphipods change their antioxidative response? // Aquatic Ecology. - 2009. 43. P. 1041–1045.

6. Timofeyev M.A., Shatilina Zh.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. – V. 34. - P. 281–285

7. 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.

8. Колесниченко А.В., Тимофеев М.А., **Протопопова М.В.** Токсичность наноматериалов – 15 лет исследований // Российские нанотехнологии. – 2008. – Т. 3. – № 3–4. – С. 54–61.

9. 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. – Vol. 70.–No.–1. – P. 99–105.

10. 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, № 1, т. 15, с. 23–29.

11. 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.

12. Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., **Протопопова М.В.** Участие низкомолекулярных БТШ в механизмах клеточной защиты, активизирующихся при интоксикации солями кадмия // Вестник Российского государственного медицинского университета. – М.: РГМУ.– 2005. №3 (42). – С. 195.

Гранты и именные стипендии

Выполнение работы поддержано рядом грантовых проектов, выполненных под руководством Протопоповой М.В., в том числе: ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», проект НК-267/2; АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 гг.)», проекты 2.1.1/8115, 2.2.2.3.16116; Грантом германской службы академических обменов (DAAD); Грантом «Эразмус Мундус: окно в Европейское Сотрудничество»; Грантом поддержки научно-исследовательской работы аспирантов и молодых сотрудников ИГУ, проект 111-02-000/8-10.

Протопопова М.В. была удостоена именной стипендией для аспирантов Правительства РФ (2009), именной стипендии Президента РФ для студентов (2007), именной стипендии негосударственного экологического фонда им. В.И.Вернадского (2007), именной стипендии Губернатора Иркутской области для аспирантов (2010).