

ORIGINAL ARTICLE

The evaluation of the antioxidant enzyme's activity and activity of anaerobic glycolysis' enzymes under gradual temperature increase in Baikal amphipod species *Eulimnogammarus marituji*, *E. maackii* and *Gmelinoides fasciatus*

Axenov – Gribanov D. V.^{1,2}, Lubyaga J. A.¹

¹ Irkutsk State University. 664003 Irkutsk, K. Marx str., 1, Russia

² Baikal research centre*. 664003 Irkutsk, Lenin str., 3-120 Russia

*Tel.: +7 (3952) 600 893

*E-Mail: brc.contact@gmail.com

Received September 26, 2012

The aim of present study was the evaluation of the antioxidant enzyme's activity and activity of anaerobic glycolysis enzymes under gradual temperature increase in Baikal amphipods species *Eulimnogammarus marituji* (Baz., 1945), *E. maackii* (Gerstf, 1858) and *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899). In all species under gradual temperature increase exposition elevation of peroxidase' activity was observed. Activities of catalase', glutathione S – transferase' and lactate dehydrogenase' activity in *E. marituji* and *E. maackii* were differed from *G. fasciatus*. It was proposed that changes in the antioxidant enzyme's activity and activity of anaerobic glycolysis enzymes in Baikal amphipods may contribute to increasing of glycolytic processes functional efficiency and keeping of energetic homeostasis in endemic organisms.

Key words: Amphipods / catalase / glutathione S – transferase / lactate dehydrogenase / peroxidase

ORIGINAL ARTICLE

**Влияние повышенной температуры окружающей среды на
активность ферментов антиоксидантной системы и анаэробного
гликолиза у эндемичных байкальских видов амфипод
Eulimnogammarus marituji, *E. maackii* и *Gmelinoides fasciatus***

Аксенов – Грибанов Д. В.^{1,2}, Лубяга Ю. А.¹

¹ ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет». 664003 г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1, Россия

² АНО «Байкальский исследовательский центр»*. 664003 г. Иркутск, ул. Ленина, 3-120, Россия

Тел.: +7 (3952) 600 893

*E-Mail: brc.contact@gmail.com

Поступила в редакцию 26 сентября 2012 г.

Целью настоящей работы являлась оценка влияния повышенной температуры окружающей среды на активность ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза у эндемичных байкальских видов амфипод *Eulimnogammarus marituji* (Baz., 1945), *E. maackii* (Gerstf., 1858) и *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899). При экспозиции в условиях повышения температуры, у всех видов амфипод отмечали рост активности пероксидазы. Характер изменений активности каталазы, глутатион S-трансферазы и лактатдегидрогеназы у представителей *E. marituji* и *E. maackii* отличались от таковых у *G. fasciatus*, что свидетельствует о различиях в механизмах стресс-адаптации у этих видов. На основании полученных материалов предположено, что изменения активности антиоксидантных ферментов и ферментов анаэробного гликолиза могут способствовать повышению эффективности функционирования гликолитических процессов и поддержанию энергетического гомеостаза у эндемичных байкальских амфипод.

Ключевые слова: Амфиподы / глутатион S-трансфераза / каталаза / лактатдегидрогеназа/ пероксидаза

Среди защитных систем гидробионтов к повышенным температурам среды важную роль играют неспецифические механизмы стресс – адаптации, включающие в себя различные компоненты антиоксидантной системы и энергетического метаболизма.

Для исследования особенностей механизмов стресс – адаптации наиболее подходящими являются организмы, которые длительное время эволюционировали в стабильных условиях. Одним из природных очагов видообразования является древнейшее (более 25 млн. лет)

пресноводное озеро Байкал. Фауна Байкала насчитывает 2600 видов, 80% из которых являются эндемиками (Тимошкин и др., 2009).

Целью настоящей работы являлась оценка влияния повышенной температуры окружающей среды на активность ферментов антиоксидантной системы и анаэробного гликолиза у эндемичных байкальских видов амфипод.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами настоящего исследования были выбраны представители 3х эндемичных видов амфипод оз. Байкал: *Eulimnogammarus maackii* (Gerstf., 1858), *E. marituji* (Baz., 1945), *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899). Представленные виды амфипод отличаются по терморезистентным способностям (Тимофеев и др., 2006; Тимофеев, 2010). Организмы были собраны в литоральной зоне озера (0 - 2 м), в районе пос. Большие Коты (Южный Байкал). Амфипод содержали отдельно по видам в аэрируемых термостатах при температуре 6-7°C в течение 3 - 4 суток до проведения экспериментов. До эксперимента животных кормили коммерческим кормом Tetramin (Германия). Высокая двигательная активность, питание и отсутствие гибели организмов в акклимационный период позволяют заключить, что содержание в лабораторных условиях не являлось для них стрессовым. Во всех экспериментах использовали здоровых и активных особей.

В исследовании проводили экспозицию амфипод в условиях постепенного повышения температуры с 7°C (средняя температура среды обитания, температура акклимации) до температуры, при которой отмечали гибель 100% особей (30°C). Изменение температуры

проводили в цифровом крио термостате WiseCircu Wcr6 (Германия) со скоростью 1°C•ч⁻¹. Фиксацию материала в жидком азоте проводили каждые 5°C (5 часов). Контрольные образцы фиксировали при температуре акклимации (7°C) в начале и в конце эксперимента.

Оценку активности ферментов АОС (пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы) проводили, согласно модифицированным спектрофотометрическим методикам Drotar (1985), Aebi (1984) и Habig (1974) соответственно (Тимофеев, 2010). Определение активности лактатдегидрогеназы проводили энзиматическим спектрофотометрическим методом с применением стандарт-набора «ЛДГ-вита» (Vital-Diagnostics Spb), согласно рекомендациям производителя.

Измерения проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США) при λ=340 нм для пероксидазы и лактатдегидрогеназы, при λ=240 нм для каталазы и при λ=436 нм для глутатион S-трансферазы.

Все эксперименты проведены в 9 биологических параллелях. Биохимический анализ каждой пробы проведен в 3-х аналитических измерениях. Оценку достоверности проводили, используя двувыборочный u-критерий Манна-Уитни. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 8.0. На диаграммах указаны доверительные интервалы. * - обозначены случаи достоверного отличия значений от контрольного при доверительной вероятности – 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Материалы по оценке изменения активности

ферментов АОС у амфипод, экспонированных в условиях повышения температуры среды, представлены на рис. 1-3. На рис.1. представлены результаты оценки изменения активности пероксидазы. Как следует из представленных материалов, экспозиция всех видов амфипод в условиях повышения температуры среды приводила в увеличению активности фермента. У амфипод *E. maackii* отмечали трехкратное увеличение активности пероксидазы при повышении температуры среды до 30°C. Повышение температуры экспозиции до 25°C приводило к росту активности пероксидазы на 56-73 % у вида *E. marituji* и на 41-62 % у вида *G. fasciatus*.

Результаты оценки изменений активности глутатион S-трансферазы даны на рис. 2. Как следует из представленных материалов, экспозиция *G. fasciatus* в условиях повышения температуры среды приводила к кратковременному статистически значимому увеличению активности глутатион S-трансферазы на 20 % при температуре экспозиции 15°C. Последующее повышение температуры среды не вызывало статистически значимых изменений в активности фермента у *G. fasciatus*. В отличие от *G. fasciatus*, у амфипод *E. maackii* и *E. marituji*, отмечали постепенное снижение активности глутатион S-трансферазы на 13-25% и на 12-45% соответственно при температурах экспозиции выше 20°C.

На рис. 3. представлены результаты по оценке изменения активности каталазы. Как следует из представленных материалов, экспозиция *G. fasciatus* в условиях повышения температуры среды с 15°C до 30°C приводила к

снижению активности каталазы на 15-31 %. Экспозиция амфипод вида *E. maackii* в условиях повышения температуры среды с 15°C до 25°C приводила к постепенному увеличению активности каталазы на 52 % относительно контрольных значений. Повышение температуры до 30°C вызывало снижение активности каталазы до контрольных значений. Экспозиция байкальских амфипод *E. marituji* в условиях повышения температуры среды приводила как к незначительному, но статистически значимому увеличению активности каталазы при 15°C, так и к снижению активности при температуре экспозиции 30°C. При этом, изменения активности каталазы у *E. marituji* не превышали 15 % относительно контрольных значений.

Материалы оценки изменений активности фермента анаэробного гликолиза - лактатдегидрогеназы - у амфипод, экспонированных в условиях повышения температуры среды, даны на рис. 4. Как следует из представленных материалов, экспозиция амфипод видов *E. maackii* и *E. marituji* в условиях повышения температуры среды приводила к повышению активности лактатдегидрогеназы. Увеличение активности фермента у *E. marituji* отмечали на 75 - 145% в ходе всего эксперимента, тогда как у *E. maackii* увеличение активности лактатдегидрогеназы отмечали на 60 % при повышении температуры экспозиции до 30°C. У *G. fasciatus*, в отличие от других исследуемых видов, отмечали снижение активности лактатдегидрогеназы на 15 - 42 % при повышении температуры среды с 15°C до 30°C.

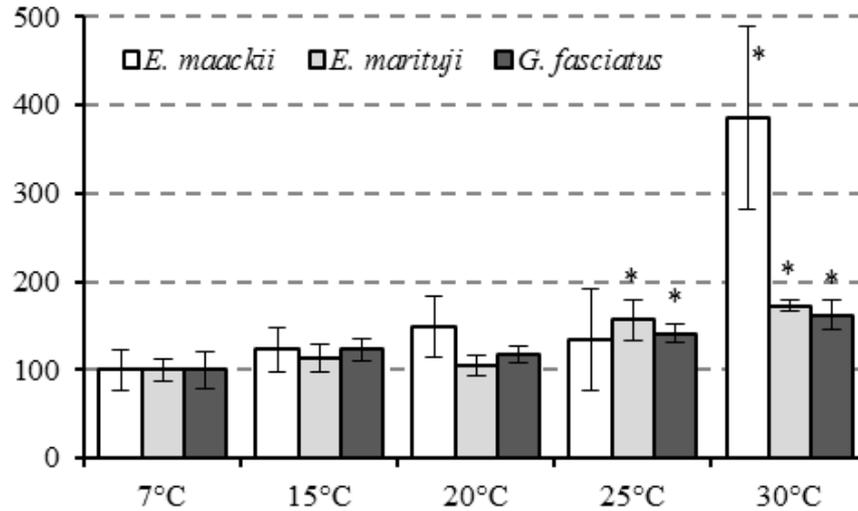


Рисунок 1 Изменение активности пероксидазы у байкальских эндемичных амфипод, экспонированных в условиях повышения температуры среды (в процентах)

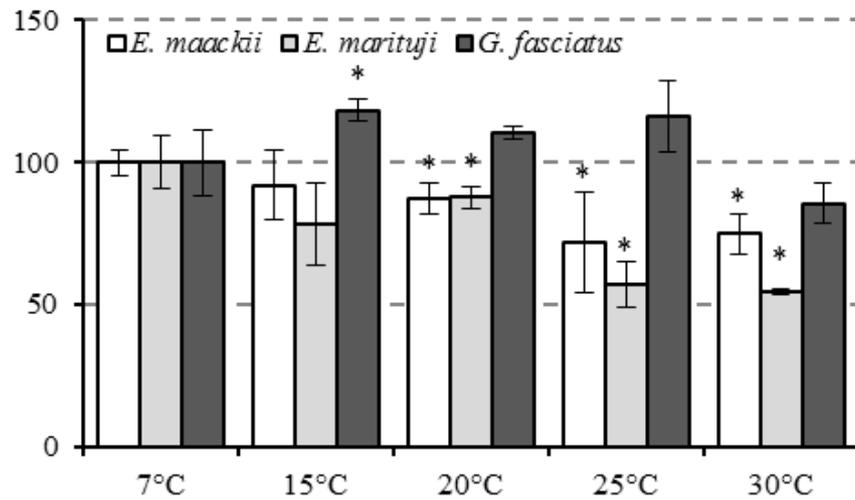


Рисунок 2. Изменение активности глутатион S-трансферазы у байкальских эндемичных амфипод, экспонированных в условиях повышения температуры среды (в процентах)

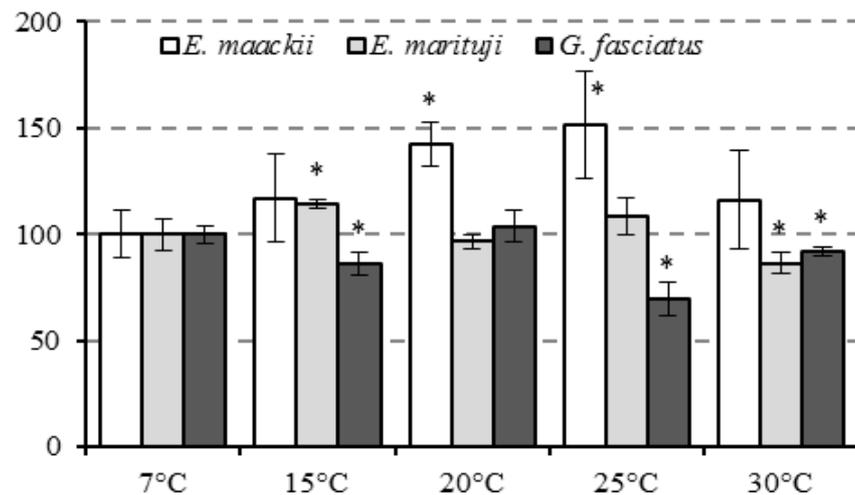


Рисунок 3. Изменение активности каталазы у байкальских эндемичных амфипод, экспонированных в условиях повышения температуры среды (в процентах)

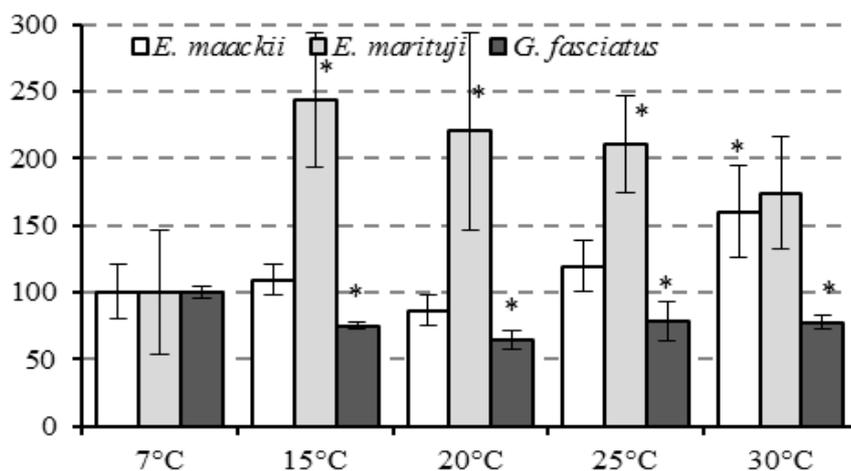


Рисунок 4. Изменение активности лактатдегидрогеназы у байкальских эндемичных амфипод, экспонированных в условиях повышения температуры среды (в процентах)

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования с представителями эндемичной байкальской фауны, выявлены как сходства, так и различия в направленности изменений активности ферментов АОС и анаэробного гликолиза при увеличении температуры среды. При экспозиции в условиях повышенных температур у всех видов амфипод отмечали рост активности пероксидазы. У видов *E. maackii* и *E. marituji* было отмечено снижение активности глутатион S-трансферазы, напротив, у *G. fasciatus* наблюдали кратковременное повышение активности фермента. При оценке активности каталазы было установлено, что у *G. fasciatus* отмечается снижение активности фермента в ходе всей экспозиции, тогда как у других видов амфипод отмечали повышение активности. Установлено, что активность лактатдегидрогеназы у экспонированных *E. maackii* и *E. marituji* повышается, а у *G. fasciatus* – снижается.

Изменения активности ферментов АОС указывают на нарушение системы контроля за эндогенно образованными активными формами

кислорода (АФК). Так, повышение активности пероксидазы и каталазы у всех исследуемых видов в условиях повышения температуры среды указывает на активацию антиоксидантной системы (АОС) и элиминацию активных форм кислорода (АФК) и свободно-радикального окисления (Хочачка, Сомеро, 1977, 1988). Важно отметить, что увеличение активности каталазы происходит раньше и при меньших температурах экспозиции, чем увеличение активности пероксидазы. Это вероятно указывает на то, что в механизмах антиоксидантной защиты байкальских организмов каталаза играет большую роль, чем пероксидаза. Для восполнения энергетических потребностей в условиях образующегося энергодефицита, амфиподы, по-видимому, переключают энергетический метаболизм с аэробного на анаэробный. Наблюдаемое снижение активности каталазы у *G. fasciatus* может осуществляться с целью сохранения энергетического гомеостаза. В пользу этого также свидетельствует и снижение активности лактатдегидрогеназы.

Глутатион S-трансфераза играет важную роль

в механизмах выведения токсичных метаболитов из организма и элиминации вторичных продуктов перекисного окисления липидов (триеновые основания, альдегиды, кетоны) (Хочачка, Сомеро, 1977). У амфипод видов *E. maackii* и *E. marituji* было отмечено снижение активности глутатион S-трансферазы, что может быть связано с инактивацией фермента вследствие высокой физиологической температуры и замедлением метаболизма. У *G. fasciatus* – кратковременное повышение активности глутатион S-трансферазы с последующей флуктуацией около контрольных значений, возможно, указывает как на накопление вторичных продуктов ПОЛ, так и на усиление их выведения, что обеспечивает внутриклеточную защиту от эндогенного повреждения мембран (Тимофеев, 2010; Хочачка, 1988).

Представленные межвидовые различия активности ферментов АОС и анаэробного гликолиза тесно связаны с экологическими характеристиками исследованных видов, и, в частности, с их различными терморезистентными характеристиками. Известно, что *G. fasciatus* характеризуется более высокими показателями терморезистентности, чем другие исследованные байкальские виды (Березина, Петрящев, 2012; Тимофеев, 2010).

Таким образом, разнонаправленные изменения активности ферментов АОС и анаэробного гликолиза у исследованных видов амфипод, различающихся по своим терморезистентным способностям, свидетельствуют о различиях в механизмах стресс-адаптации у организмов в условиях изменяющейся температуры среды обитания. *G. fasciatus* характеризуется более широким

диапазоном термотолерантности, чем другие исследованные байкальские виды амфипод, в том числе, вероятно, за счет активации механизмов выведения токсичных метаболитов, поддержания энергетического гомеостаза и увеличения доли анаэробного гликолиза. Другие исследованные виды *E. maackii* и *E. marituji*, обладают узким диапазоном термотолерантности, вследствие чего активация неспецифических механизмов стресс-адаптации происходит раньше и имеет иную направленность, чем у *G. fasciatus*. Изменения активности антиоксидантных ферментов и ферментов анаэробного гликолиза в условиях роста температуры среды могут способствовать повышению эффективности функционирования гликолитических процессов и поддержанию энергетического гомеостаза у байкальских видов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ (12-04-31767 мол_а, 12-04-90039 Бел_а, 12-04-98062-р_сибирь_а, 11-04-00174-а, 11-04-91321-СИГ_а, гранта ИГУ для поддержки аспирантов и молодых ученых, грантов Президента РФ МК-5466.2012.4, МД-2063.2012.4, МК-4772.2011.4, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», и DAAD-M. Ломоносов 2012-2013 (10.51.2011).

Авторы выражают глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н. М.А. Тимофееву за общее руководство, а также коллегам к.б.н. Ж.М. Шатилиной, к.б.н. Д.С. Бедулиной, к.б.н. В.В. Павличенко и к.б.н. Протопоповой М. В. за помощь в проведении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.
- Drotar, A., Phelps, P., and Fall, R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* **42**, 35–40.
- Gerstfeldt G. (1858) Über einige zum Theil neuen Arten von Platoden, Anneliden, Myriapoden und Crustaceen Sibiriens. *Mem. des Savants etrangers de l'Academi St. Peterbourg*, **8**, 261–296.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139.
- Stebbing T. R. R. (1899) Amphipoda from the Copenhagen Museum and other sources. Part. 2. *Transaction of the Linnean society of London.* **7(8)**, 395–432.
- Базикалова А. Я. (1945) Амфиподы оз. Байкал. *Труды Байкальской Лимнологической станции АН СССР*, **11**, 440 с.
- Березина Н. А., Петряшев В. В. (2012) Инвазии высших ракообразных (Crustacea: Malacostraca) в водах Финского залива (Балтийское море). *Российский Журнал Биологических Инвазий*, **1**, 2-18.
- Тимофеев М. А. (2010) Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: Дис. ... Д-р. биол. Наук. ТГУ, Томск, 384с.
- Тимофеев М. А., Кириченко К. А., Бедулина Д. С. (2006) Сравнительная оценка особенностей анаэробного метаболизма у байкальских амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf.), *E. cyaneus* (Dyb.) и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars, *Сибирский экологический журнал*, **6**, 733–739.
- Тимошкин О. А., Провиз В. И., Ситникова Т. Я. (2009) Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. В 2 т. Новосибирск: Наука, 1083 с.
- Хочачка П. Сомеро Дж. (1977) Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 398с.
- Хочачка П. Сомеро Дж. (1988) Биохимическая адаптация. М.: Мир, 568с.