

ORIGINAL ARTICLE

**The Particularities of Nonspecific Stress Resistance
Mechanism Activation in Baikalian Endemic
Amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebb, 1899)
under Thermal Stress**

Vereshchagina K.P.^{1,2*}, Lubyaga Y.A.^{1,2}, Axenov-Gribanov D.V.^{1,2},
Gurkov A.N.^{1,2}, Kondratieva E.S.^{1,2}, Shchapova E.P.^{1,2},
Prokosov S.O.^{1,2}, Shatilina Z.M.²

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

² Institute of Biology at Irkutsk State University. 664003 Irkutsk, Lenin str., 3, Russia

*Tel.: +7(3952) 243077

*E-Mail: k.p.vereshagina@gmail.com

Received November 24, 2014

The aim of the current study was to determine the characteristics of the stress response in endemic species *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) in comparison with other Baikal amphipods under short term thermal stress. It were shown the changes in activity of antioxidant enzymes, and lactate dehydrogenase correlated with content of lactate under the influence of gradual temperature increase.

While the changes of cellular stress - markers content or their activity in other Baikal species occurred beyond the thermal preference zone, the cellular stress - markers content or their activity in *G. fasciatus* associated with entrance into the thermal preference zone. Thus we concluded that the relict endemic species *G. fasciatus* has a different stress resistance mechanism to elevated temperature than other Baikal amphipods species.

Key words: Amphipods, Baikal, stress, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase, lactate

ORIGINAL ARTICLE

**Особенности активации неспецифических механизмов
стресс-резистентности у байкальского эндемичного
вида амфипод *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) в
условиях постепенного температурного стресса**

Верещагина К.П.^{1,2*}, Лубяга Ю.А.^{1,2}, Аксенов-Грибанов Д.В.^{1,2},

Гурков А.Н.^{1,2}, Кондратьева Е.С.^{1,2}, Шапова Е.П.^{1,2},

Прокосов С.О.^{1,2}, Шатилина Ж.М.²

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

² НИИ биологии ФГБОУ ВПО «ИГУ» 664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3

*Тел.: +7(3952) 243077

*E-Mail: k.p.vereshagina@gmail.com

Поступила в редакцию 24 Ноября 2014 г.

Целью данного исследования являлось выявление особенностей стресс-ответа у эндемичного вида *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) в сравнении с другими байкальскими видами амфипод в условиях повышения температуры среды обитания. Показано, что при воздействии постепенного повышения температуры среды происходит изменение активности ферментов антиоксидантной системы и лактатдегидрогеназы, а также изменение содержания лактата. Изменение содержания клеточных стресс-маркеров и их активности у литоральных и глубоководных байкальских видов амфипод наблюдали за пределами зоны термопреференции, напротив изменение содержания (активности) клеточных стресс-маркеров у *G. fasciatus* происходило одновременно со входом в данную зону. Таким образом, по результатам анализа полученных данных сделан вывод, что реликтовый эндемичный вид *G. fasciatus* обладает иными активирующимися механизмами стресс-резистентности в ответ на воздействие повышенных температур среды, чем другие эндемичные байкальские виды.

Key words: амфиподы, Байкал, стресс, ферменты антиоксидантной системы, лактатдегидрогеназа, лактат

В последнее время приобретают актуальность исследования, направленные на изучение влияния климатических изменений и повышенной антропогенной нагрузки на состояние водных экосистем (Kerr, 2005; Pörtner, 2008). Изменение температурного режима водоема приводит к смене ключевых параметров среды обитания, таких как газовый режим и растворимость веществ, в том числе и токсичных компонентов, поступающих в водоем с грунтовыми и сточными водами. Повышенная температура воды может усилить негативное влияние различных компонентов (например, ксенобиотиков) на организмы, населяющие водные экосистемы. Поэтому представляется актуальным изучение механизмов стресс-реакции водных организмов в условиях изменения температуры среды.

Экологические и эволюционные характеристики видов, в частности показатели терморезистентности и термопреференции, могут играть решающую роль в их способности противостоять различным стрессовым факторам и антропогенным нагрузкам (Hofmann, Parsons, 1991; Imshaeva, 1999; Evgen'ev 2007).

Одной из проблем, проявляющихся в условиях климатических изменений и повышенной антропогенной нагрузки, являются инвазии видов и вытеснение ими аборигенной фауны. Вероятные причины способности вселенцев к успешному освоению водоемов за пределами естественного ареала и внедрению в нехарактерные экосистемы могут быть связаны с физиолого-биохимическими особенностями видов, обеспечивающими высокий

уровень их экологической пластичности и возможность адаптации к новым условиям обитания. Одним из наиболее вероятных объяснений этих характеристик может быть способность видов к эффективному энергообеспечению стресс-реакций. Можно предположить, что именно способности к эффективному поддержанию повышенных уровней реакции стресс-систем в широком диапазоне изменений характеристик среды обитания определяют конкурентные преимущества успешных видов-вселенцев, по сравнению с аборигенными видами.

Целью данного исследования являлось выявление особенностей стресс-ответа эндемичного вида *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899) в сравнении с другими байкальскими видами амфипод в условиях повышения температуры среды обитания.

MATERIALS AND METHODS

В качестве объекта исследования был выбран эндемичный вид амфипод озера Байкал *G. fasciatus* (Stebb., 1899). Для сравнительной оценки был использован другой байкальский вид, близкий по своим экологическим и терморезистентным характеристикам - *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb., 1874) (Timofeyev, 2010).

Байкальский вид амфипод *Gmelinoides fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) представляет собой уникальный объект для исследований адаптивных способностей гидробионтов в аспекте проблемы биологических инвазий и изменений климатических условий. По оценкам ряда

исследователей, возраст вида превышает возраст Байкала и составляет более 30 млн. лет. Таким образом, *G. fasciatus* - реликтовый вид, представляющий фауну добайкальского происхождения. В естественном ареале распространение вида ограничено литоралью Байкала. В байкальском регионе за пределами Байкала *G. fasciatus* встречается в ограниченном числе водоемов (чаще всего с антропогенно-нарушенными условиями), в которых вид испытывает жесткую конкуренцию со стороны широкораспространенного *Gammarus lacustris* Sars (Berezina, 2009). В середине XX века *G. fasciatus* был интродуцирован в европейские водоемы, где после первичной интродукции приспособился к обитанию в новых условиях и в дальнейшем широко распространился в водоемах европейской части России, став массовым видом-вселенцем.

В ходе исследования проведены эксперименты по экспонированию рачков в условиях постепенного повышения температуры с 6°C (средняя температура среды обитания, температура акклимации) до температуры, при которой ранее отмечали гибель 100% особей более термочувствительного *E. cyaneus* (30°C). Скорость изменения температуры составила 1°C·ч⁻¹.

Оценку изменения активности ферментов антиоксидантной системы (пероксидазы, каталазы, глутатион S - трансферазы) производили методами спектрофотометрического анализа, согласно методикам Drotar (1985), Aebi (1984) и Habig (1974) соответственно (Timofeyev, 2010).

Определение активности лактатдегидрогеназы и содержания лактата проводили энзиматическими спектрофотометрическими методами с применением стандарт-наборов «ЛДГ-витал» и «Лактат-витал» (Vital-Diagnostics Spb) (Timofeyev, 2010; Axenov-Gribanov, 2013). Измерения проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США) при $\lambda=340$ нм для пероксидазы и лактатдегидрогеназы, при $\lambda=240$ нм для каталазы и при $\lambda=436$ нм для глутатион S- трансферазы. Определение содержания лактата проводили при $\lambda=505$ нм. Все эксперименты проведены в 5 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.

RESULTS AND DISCUSSION

При экспозиции в условиях постепенной гипертермии, у амфипод наблюдали видоспецифическое изменение активности ферментов антиоксидантной системы и лактатдегидрогеназы, а также изменение содержания лактата. В условиях постепенного повышения температуры среды, у амфипод вида *E. cyaneus* не наблюдали изменения активности ферментов антиоксидантной системы на протяжении всего эксперимента (Рис.1, - 3), не смотря на то, что данный вид считается немного менее терморезистентным в сравнении с *G. fasciatus* (Timofeyev, 2010). При экспозиции *G. fasciatus* в данных условиях, при достижении

температуры среды выше 24°C отмечали увеличение активности пероксидазы (Рис. 1). Активность глутатион S-трансферазы кратковременно увеличивалась при достижении температуры среды 14-16°C (Рис. 2), после чего снижалась до контрольных значений. В то же время в изменении активности каталазы наблюдали кратковременное снижение при достижении температур 9-11 и 24-30°C (Рис. 3).

При экспозиции амфипод в условиях постепенного повышения температуры наблюдали увеличение содержания лактата у обоих видов (Рис. 4). При этом увеличение содержания лактата у *G. fasciatus* происходило раньше и при меньших

температурах, чем у *E. cyaneus*. Повышение содержания лактата у *G. fasciatus* отмечали при достижении температуры выше 9°C, тогда как у *E. cyaneus* изменение содержания лактата наблюдали только при достижении температур экспозиции выше 24°C.

Изменение активности лактатдегидрогеназы также отмечали у обоих видов (Рис. 5). При этом, наблюдали снижение активности фермента, отрицательно коррелирующее с повышением содержания лактата. Снижение активности лактатдегидрогеназы у *E. cyaneus* отмечали при температурах экспозиции выше 19°C, и при температурах экспозиции выше 9°C у *G. fasciatus*.

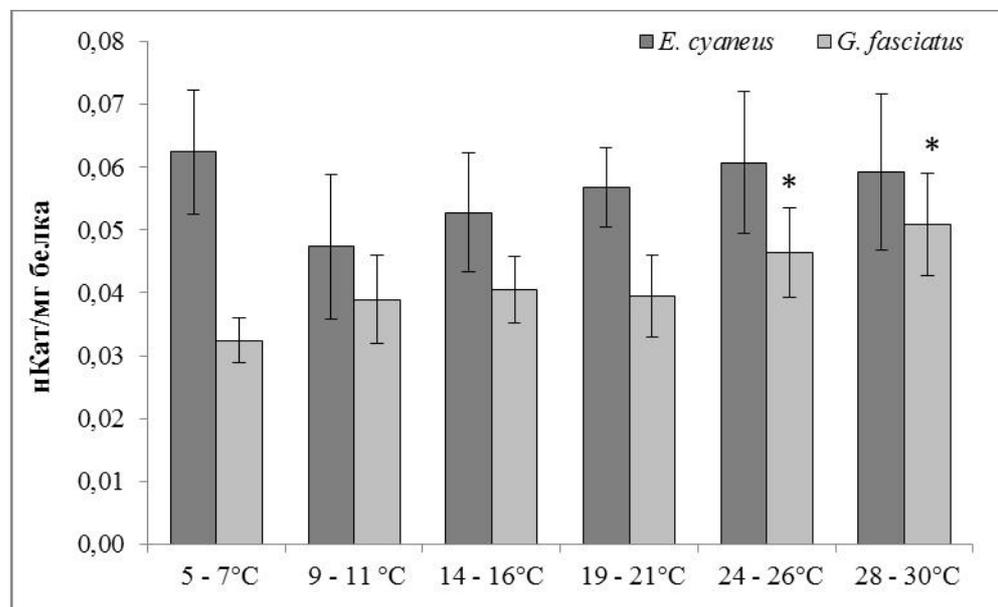


Рисунок 1. Изменение активности пероксидазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды.

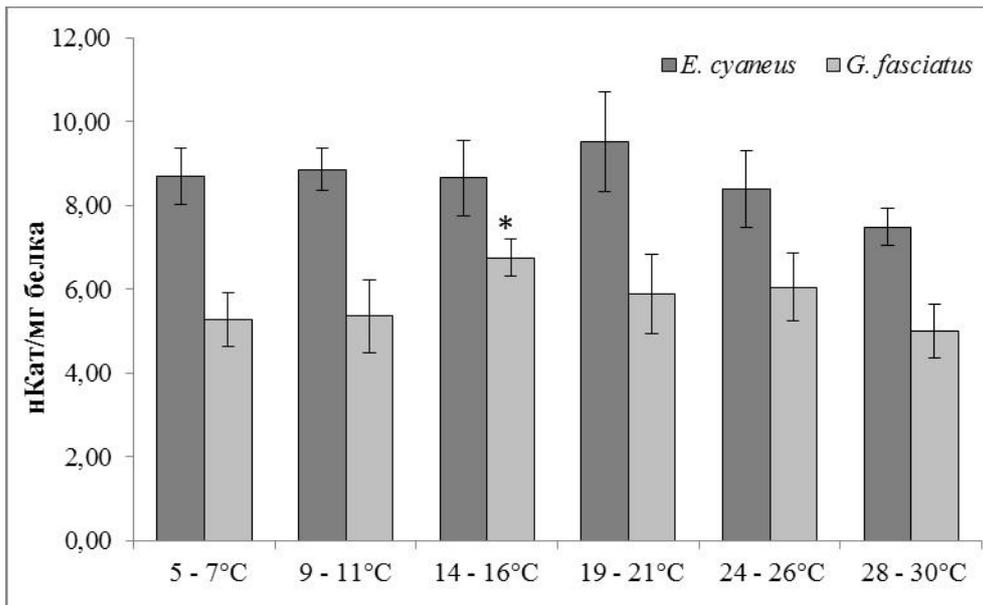


Рисунок 2. Изменение активности глутатион S-трансферазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды.

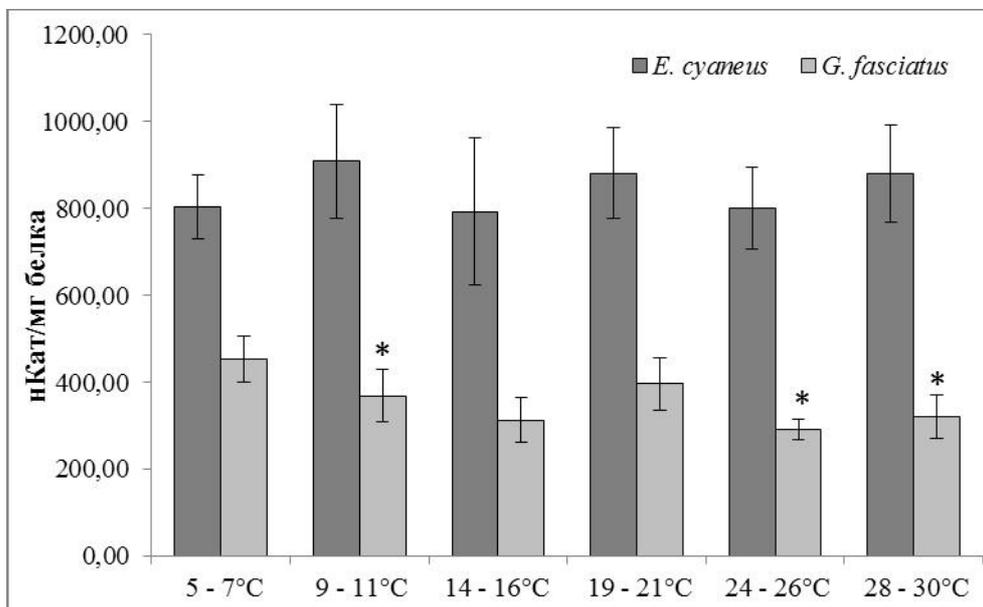


Рисунок 3. Изменение активности каталазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды.

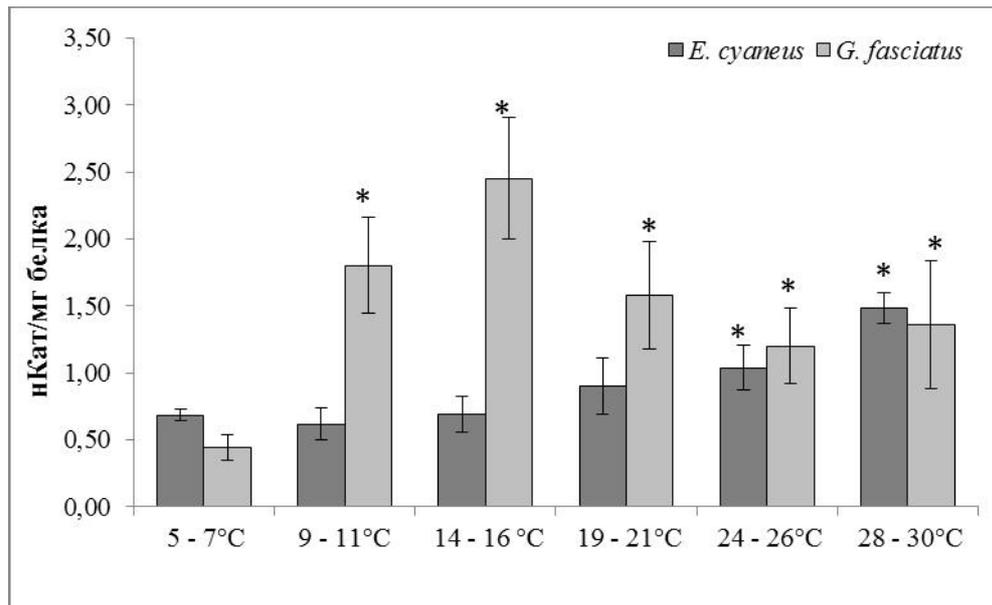


Рисунок 4. Изменение активности лактата (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды.

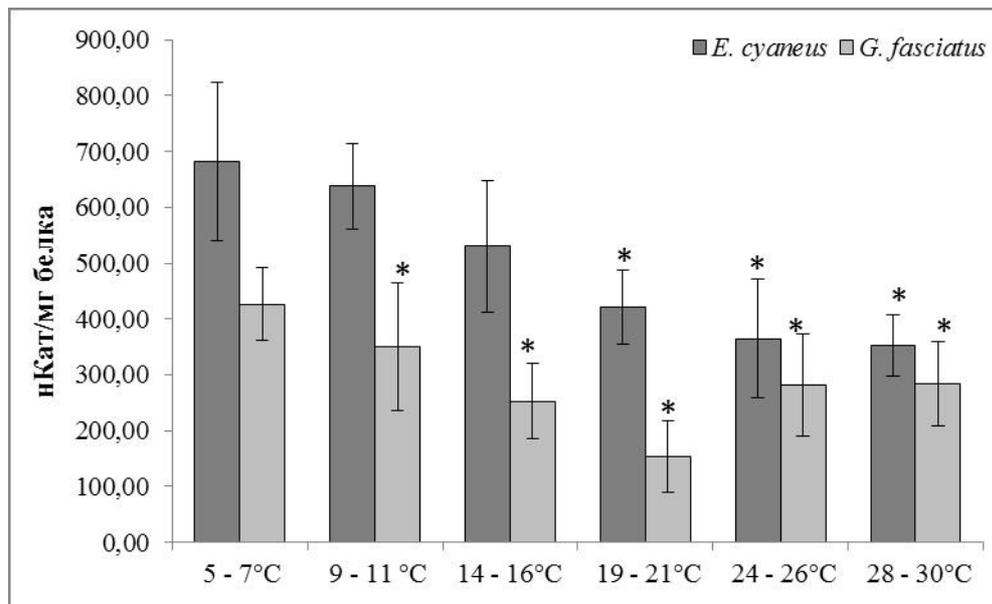


Рисунок 5. Изменение активности лактатдегидрогеназы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *E. cyaneus* и *G. fasciatus* в условиях постепенного повышения температуры среды.

После сравнения результатов, представленных в данном исследовании с ранее проведенными материалами показано, что реликтовый эндемичный вид *G. fasciatus* имеет специфические механизмы стресс-ответа на воздействие повышенных температур среды. При повышении

температуры среды накопление лактата в тканях *G. fasciatus* происходило при меньших температурах, чем у других изученных видов амфипод литорали озера Байкал. В то время как изменение содержания клеточных стресс-маркеров и их активности у *E. cyaneus* и других

байкальских видов (*Ommatogammarus flavus*, *E. verrucosus*) наблюдали за пределами зоны термопреференции (Axenov-Gribanov, 2013), изменение содержания (активности) клеточных стресс-маркеров у *G. fasciatus* связано с входом в данную зону.

Таким образом, в ходе проведенного исследования показана специфика стресс-ответа вида *G. fasciatus* в условиях экспериментально повышенной температуры среды.

ACKNOWLEDGEMENT

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 14-04-00501_а (приобретение расходных материалов), РНФ 14-14-00400 (приобретение расходных материалов), базовой (1354) и проектной (6.382.2014) частей государственного задания, программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «ИГУ» (приобретение расходных материалов), гранта молодых ученых ФГБОУ ВПО «ИГУ» и совместной программы академических обменов DAAD - Минобрнауки РФ М. Ломоносов 2014-2015.

REFERENCES

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.
- Axenov-Gribanov D.V. (2012) Determination of Lake Baikal endemic amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) thermal optima limits by changes in its metabolic markers. *Journal of stress physiology and biochemistry.* **8**, 289-301.
- Axenov-Gribanov D.V. (2013) The comparative assessment of temperature challenge on Baikal and Palearctic organisms by energetic metabolism parameters and nonspecific reactions of stress response. Thesis for Ph.D. degree. Irkutsk, 169.
- Berezina N.A. (2009) Interspecific interactions of amphipods *Gammaris lacustris* and *Gmelinoides fasciatus*. *Ecology.* **2**. 91-95
- Drotar, A., Phelps, P., and Fall, R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* **42**, 35–40.
- Evgen'ev M.B. (2007) Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. *Journal of biosciences.* **32**, 489–499.
- 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.
- Hofmann A. A., Parsons P. (1991) Evolutionary genetics and environmental stress. – Oxford University Press.
- Imshaeva A.G. (1999) Stressful environmental conditions and genetic variability in animal populations. *Genetics.* **35**, 421-431.
- Kerr R. A. (2005) Atlantic climate pacemaker for millennia past, decades hence? *Science.* **309**, 41–42.
- Pörtner H.O. (2008) Ecology. Physiology and climate change. *Science.* **322**, 690–692.
- Timofeyev M.A. (2010) Ecological and physiological aspects of adaptation to abiotic environmental conditions of Baikalian endemic and Palearctic amphipods. Thesis for Dr.Sci. degree. Tomsk, 384.