



УДК 574.24

DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.23.3>

## **Физиологические и биохимические маркеры стресс-ответа эндемичных байкальских амфипод: современное состояние и перспективы исследований**

Д. С. Бедулина, Ж. М. Шатилина, А. Н. Гурков, Ю. А. Лубяга,  
К. П. Верещагина, Е. В. Мадьярова, Д. В. Аксенов-Грибанов,  
М. А. Тимофеев

*Иркутский государственный университет, Иркутск*  
E-mail: [daria.bedulina@gmail.com](mailto:daria.bedulina@gmail.com)

**Аннотация.** Описано современное состояние исследований некоторых физиологических, биохимических, клеточных и молекулярных маркеров стресс-ответа у эндемичных амфипод оз. Байкал и других пресноводных экосистем. Обсуждаются последние достижения в этой области, а также перспективы будущих исследований. Байкальские амфиподы являются важнейшей частью бентосных сообществ озера, которые в последние годы подвержены существенной антропогенной нагрузке и воздействию изменения климата. В ходе проведённых исследований удаётся выявить температурные предпочтения и диапазоны устойчивости ключевых бентосных видов амфипод к температурному фактору и к загрязнению солями тяжёлых металлов. Предварительные данные указывают на возможность применения отдельных видов литоральных амфипод оз. Байкал в качестве индикаторов эвтрофикации. Аутэкологические исследования этих ракообразных позволяют выявить внутривидовую вариацию в устойчивости к температурному фактору, определить физиологические пороги термотолерантности, ограничивающие рост и размножение. Оценка порогов толерантности и диапазонов температурного оптимума у амфипод на биохимическом уровне показала соответствие этих диапазонов зонам предпочитаемых температур. Результаты исследований позволяют сделать прогнозы о воздействии дальнейшего повышения температуры и антропогенного пресса на прибрежную фауну амфипод. Исследуется комплекс неспецифических клеточных и молекулярных механизмов стресс-ответа. Показаны структурно-функциональные особенности системы белков теплового шока, отвечающие за развитие термотолерантности у амфипод *Eulimnogammarus cyaneus*. Изучены особенности активации ферментов антиоксидантной системы при стрессовых воздействиях у разных экологических групп амфипод. Полученные данные демонстрируют высокую степень внутри- и межвидового полиморфизма физиологических и биохимических реакций амфипод на стрессовые воздействия. При помощи методов геномики, транскриптомики и протеомики ведётся поиск таксоно-специфичных молекулярных биомаркеров стрессовых состояний у различных экологических групп амфипод.

**Ключевые слова:** амфиподы, биомаркеры, антиоксиданты, Байкал, БТШ70, стресс, эндемики.

**Для цитирования:** Физиологические и биохимические маркеры стресс-ответа эндемичных байкальских амфипод: современное состояние и перспективы исследований / Д. С. Бедулина, Ж. М. Шатилина, А. Н. Гурков, Ю. А. Лубяга, К. П. Верещагина, Е. В. Мадьярова, Д. В. Аксенов-Грибанов, М. А. Тимофеев // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2018. Т. 23. С. 3–22. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.23.3>

### ***Введение***

Одним из важных критериев мониторинговых исследований водоёмов является оценка состояния ключевых компонентов водных экосистем на разных трофических уровнях. При проведении биомониторинга экосистемы используют биоиндикацию на разных уровнях её организации. На биоценологическом уровне оценивают такие критерии, как общая численность, видовой состав и разнообразие, спектр жизненных форм, спектр биотопических групп. На популяционно-видовом уровне оценивают плотность, половозрастную и экологическую структуру популяции. На организменном уровне у представителей видов-индикаторов определяют физиологические и анатомические параметры и плодовитость, а на биохимическом и молекулярном уровне определяют показатели биохимических и клеточных процессов, а также состояние молекул белков и нуклеиновых кислот [Hamza-Chaffai, 2014].

Для каждого из уровней необходимо проведение исследований, направленных на выявление параметров нормы и критериев-индикаторов стрессового состояния, указывающих на нарушения в функционировании экосистемы. Методы биоиндикации на биохимическом и молекулярно-клеточном уровне стоят на первом месте по чувствительности к наличию неблагоприятных условий, поскольку они позволяют выявить колебания факторов среды, которые ещё затруднительно обнаружить на более высоких уровнях биологической организации.

Тогда как для биоценологического уровня такие критерии уже разработаны, для более глубоких уровней разработка подобных критериев – вопрос будущих исследований. Для Байкала ситуация осложняется уникальностью эндемичной бентосной фауны с множеством неизвестных биотических взаимодействий, а также отсутствием достаточной информации об экологии, физиологии и молекулярной биологии многих бентосных видов.

Одной из уникальных особенностей Байкала является высокое видовое разнообразие бентосных гидробионтов, составляющих значительную часть биоразнообразия озера [Kozhova, Izmet'eva, 1998]. В последние годы растёт число сообщений о признаках развивающегося экологического кризиса в бентосных сообществах прибрежной зоны Байкала [Rapid ecological ... , 2016; Groundwater contamination ... , 2018], который сопровождается ростом температуры прибрежных вод в ходе глобального изменения климата [Potemkina, Potemkin, Fedotov, 2018]. Это акцентирует необходимость разработки методов оценки состояния и мониторинга бентосных сообществ Байкала, особенно в прибрежной зоне.

Значительную часть байкальского макрозообентоса составляют амфиподы (Amphipoda: Crustacea). На сегодняшний день в озере насчитывается 276 видов и 78 подвидов эндемичных байкальских амфипод [Takhteev, Verezhina, Sidorov, 2015], которые часто доминируют по численности и биомассе в бентосных сообществах на всех глубинах озера от литорали до абиссали. Амфиподы представлены большим числом разнообразных жизненных форм и играют важную роль в бентосных пищевых сетях как детритофаги, фитофаги, падальщики, хищники, симбионты губок и паразиты, а

также являются кормовой базой для бентосных рыб [Тахтеев, 2000]. Всё это делает байкальских амфипод важнейшим объектом, указывающим на состояние бентосных сообществ озера.

Целью проводимых авторами настоящего обзора исследований является изучение специфики ответов байкальских эндемичных амфипод на вызванные антропогенным воздействием колебания абиотических параметров среды на различных уровнях структурной организации. Результаты исследований важны для разработки методов и подходов по применению гидробионтов в качестве биоиндикаторов антропогенного воздействия на экосистему Байкала.

***Результаты и перспективы исследований пресноводных амфипод как потенциальных биоиндикаторов антропогенного воздействия на экосистему озёр (на примере оз. Байкал и других экосистем)***

**Биоценотический уровень.** Результаты исследований М. А. Тимофеева свидетельствуют о различной чувствительности наиболее массовых литоральных видов амфипод к абиотическим факторам среды [Тимофеев, 2010]. Так, было выяснено, что по отношению к температурному фактору исследованные литоральные виды формируют следующий ряд термотолератности: *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstfeldt, 1858) = *Eulimnogammarus marituji* Bazikalova, 1945 < *Eulimnogammarus vittatus* (Dybowsky, 1874) < *E. cyaneus* (Dybowsky, 1874) < *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) [Тимофеев, Кириченко, 2004]. По отношению к содержанию растворённого кислорода: *E. verrucosus* = *E. vittatus* < *E. cyaneus* < *G. fasciatus*. По отношению к токсическому воздействию хлорида кадмия (на основе LC50): *E. marituji* < *E. cyaneus* < *E. verrucosus* < *E. vittatus* = *G. fasciatus* [Тимофеев, 2010]. Как видно из результатов, наиболее устойчивым к воздействию абиотических факторов среди байкальских амфипод является *G. fasciatus*.

Результаты наблюдений за составом сообществ амфипод в разных участках побережья бух. Бол. Коты на Южном Байкале (рис. 1) и в других точках южной и северной котловин Байкала указывают на то, что в наиболее эвтрофированных (по естественным или антропогенным причинам) или антропогенно-нарушенных участках побережья обычные доминанты из рода *Eulimnogammarus* сменяются видами *G. fasciatus* и *Micruropus vohlii* (Dybowsky, 1874). Оба вида принадлежат к летнему комплексу по сезону размножения, а также к древней филогенетической кладе *Micrurpodidae* [Transcriptome-based phylogeny ... , 2017], некоторые представители которой могли сохранить адаптации к более тёплому и влажному климату третичного периода. Учитывая известные данные по устойчивости *G. fasciatus* к абиотическим факторам среды, этот вид можно отнести к биоиндикаторам повышенной трофности. Определение устойчивости *M. vohlii* необходимо произвести в будущих исследованиях.

**Популяционный уровень. Перспективы исследований на байкальских амфиподах.** Биоиндикаторов на популяционном уровне среди байкальских амфипод в настоящее время не выявлено. Однако множество исследований

проведено на амфиподах из других пресноводных экосистем. Присутствие определённых загрязнителей, в основном нарушающих функционирование эндокринной системы, может оказывать эффект на рост и размножение амфипод, вызывать изменение поведенческих реакций, а также их феминизацию [Rodríguez, Medesani, Fingerman, 2007]. Показано, что влияние ряда паразитов также может приводить к изменению поведенческих реакций и пола у амфипод. Так, скрэбни могут вызывать существенные изменения в поведении, как показано на амфиподах рода *Gammarus* [Grilo, Rosa, 2017]. При этом теряется способность к избеганию хищников [Perrot-Minnot, Kaldonski, Cézilly, 2007]. Микроспоридии родов *Nosema* и *Dictyocoela* могут вызывать феминизацию амфипод, что было подтверждено на *G. duebeni* Lilljeborg, 1852 [Ironsides, Alexander, 2015]. Микроспоридии, принадлежащие к этим двум родам, также обнаружены в гемолимфе байкальских видов амфипод, в том числе литоральных [Microsporidian parasites ... , 2015], что указывает на возможное значение этого эффекта и для бентосных сообществ Байкала.

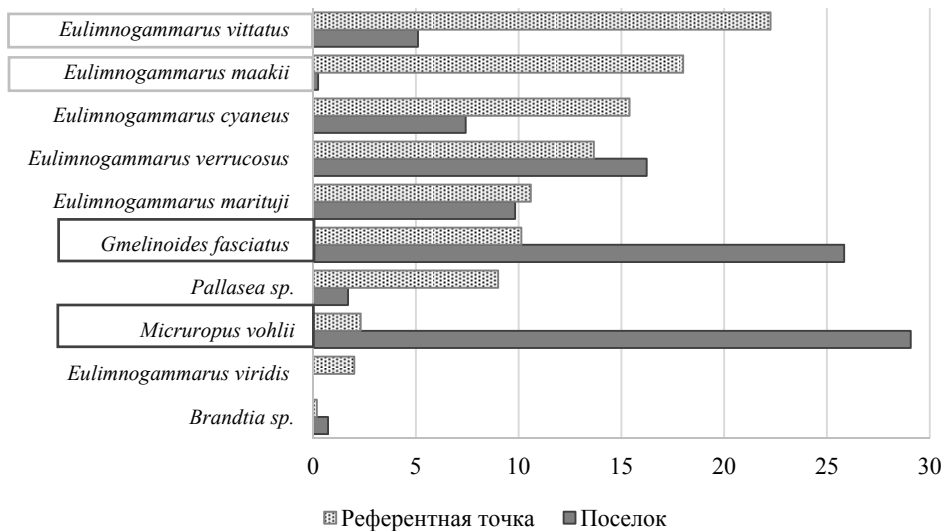


Рис. 1. Процентное соотношение численности амфипод в верхней литорали (глубина 0–0,5 м) юго-западного побережья оз. Байкал в бух. Бол. Коты. Рамкой выделены виды, доминирующие в каждой точке сбора. Сбор амфипод производили 1–5 августа 2015, 2016 гг. на побережье в центральной части пос. Бол. Коты (район старого пирса, севернее устья р. Бол. Коты, 51°54'12.96" N, 105° 4'32.15" E). В качестве референтной точки был выбран пляж в бух. Варначка (51°54'13.10" N, 105°6'6.96" E).

Результаты недавних исследований демонстрируют разную чувствительность самцов и самок двух наиболее массовых видов амфипод в литорали оз. Байкал – *E. cyaneus* и *E. verrucosus*. Для проведения исследований использовали самок на третьей стадии личиночного цикла, которые уже образовали прекопулы с самцами. Поскольку оба вида различаются по сезону размножения, *E. cyaneus* собирали в июне, а *E. verrucosus* – в конце октября. Самок и самцов акклиматизировали отдельно по полу и подвергали острому

температурному воздействию. Оба вида продемонстрировали более высокую чувствительность самок к такому воздействию, чем самцы [Intersexual differences ... , 2017]. Данные результаты могут свидетельствовать о возможных негативных последствиях для изучаемых видов на популяционном уровне при повышении температуры среды обитания. Особенно это актуально для комплекса видов с размножением в зимний сезон, который доминирует в литорали Байкала.

*Физиологический уровень. Выявление физиологических порогов толерантности ключевых литоральных видов амфипод.* По мнению Н.-О. Pörtner и соавторов, важнейшим критерием оценки влияния климата на состояние водных экосистем является концепция кислородно-ёмкостных порогов термотолерантности (*oxygen- and capacity-limited thermal tolerance OCLTT*) ключевых видов [Pörtner, Bock, Mark, 2017]. Эта концепция заключается в неспособности организма к дальнейшему росту и размножению при достижении видоспецифических субкритических температурных порогов, ограничивающих температурную зону аэробного метаболизма («аэробное окно»). Повышение температуры среды обитания выше верхних физиологических порогов организмов может приводить к резкому падению численности ключевых видов, их миграциям, снижению темпов роста, устойчивости к колебанию других факторов и к токсическому воздействию загрязнителей [Lake Baikal ... , 2016]. При достижении этих порогов возникает дефицит метаболической энергии, сопровождаемый комплексом физиологических реакций: снижением частоты двигательных движений, частоты сердечных сокращений. В тканях нарастает содержание лактата и других конечных продуктов анаэробного метаболизма, изменяется активность важнейших метаболических ферментов [Pörtner, Bock, Mark, 2017]. Все эти показатели можно использовать для определения температурных физиологических порогов ключевых видов.

В исследовании на байкальских амфиподах [Lake Baikal ... , 2016] оценивали верхние температурные пороги байкальских литоральных амфипод *E. cyaneus* и *E. verrucosus* и голарктического вида *G. lacustris* Sars, 1864. Результаты исследования показали, что частота дыхательных движений плеопод в покое с повышением температуры (0,8 °C в сутки) возрастает до определённой температуры, а потом резко падает по параболической траектории. Эти температуры предшествуют точкам максимального скачка температурного коэффициента  $Q_{10}$  по потреблению кислорода [Lake Baikal ... , 2016], в связи с чем было предположено, что температурные диапазоны пиков частот дыхательных движений в покое характеризуют субкритические температурные пороги для исследованных видов. Было показано, что эти пороги у термочувствительного *E. verrucosus*, размножающегося в зимний сезон, и термоустойчивого *E. cyaneus* из летнего комплекса существенно отличаются и составляют 10,6 °C и 19,1 °C соответственно. Субкритический температурный порог у голарктического *G. lacustris* лишь незначительно выше (21,1 °C), чем у байкальского *E. cyaneus*. Это может означать отсутствие связанных с температурным режимом адаптивных преимуществ у этого вида при возможном вселении его в Байкал [Lake Baikal ... , 2016].

Данные проведённого исследования указывают на очевидные риски для литоральных сообществ амфипод при повышении температуры среды. Согласно результатам наших наблюдений, температуры в зоне обитания исследованных видов уже могут периодически превышать их субкритические пороги (рис. 2).

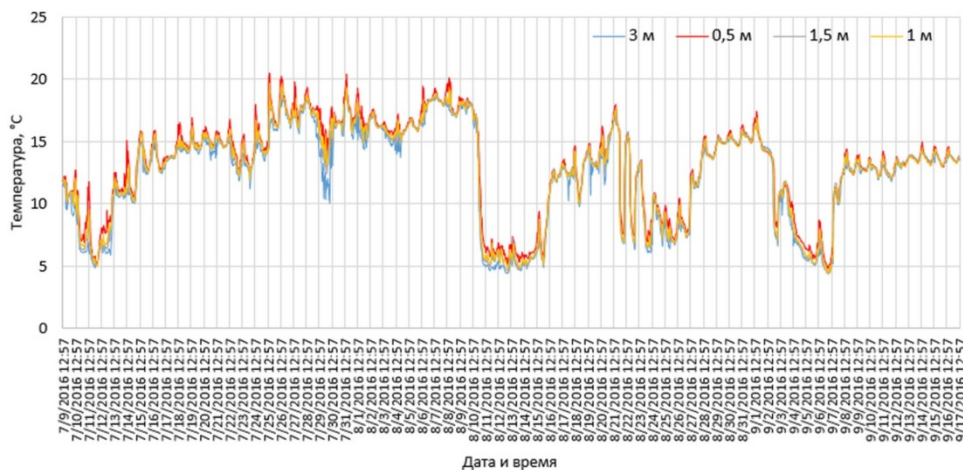


Рис. 2. Динамика температуры в литорали южной котловины оз. Байкал (бух. Бол. Коты) в июле-сентябре 2016 г. Данные получены с помощью автономных регистраторов iButton (Maxim Integrated, США).

Последние опубликованные данные свидетельствуют о наличии позитивного тренда изменения температуры в верхних отделах литорали оз. Байкал, в частности, температура в зоне литорали с мая по октябрь с 1976 г. возросла со средней скоростью  $+0,39^{\circ}\text{C}$  в 10 лет [Potemkina, Potemkin, Fedotov, 2018]. Дальнейшее повышение температуры может отразиться на структуре популяций и вызвать массовые миграции термочувствительных видов в более глубокие зоны литорали. Помимо этого, дальнейшее повышение температуры негативно скажется на популяциях массового вида *E. suaneus*, который обитает в верхней зоне литорали на урезе воды и не мигрирует в более глубокие слои при прогреве в летние месяцы. По мнению J. H. Stillman, виды, обитающие в верхних отделах литорали, наиболее подвержены негативным последствиям изменения климата, так как температурный режим в этих зонах уже находится близко к границе субкритических для них температур, и дальнейшее повышение может привести к массовым вымираниям таких видов [Stillman, 2002; Halpin, Menge, Hofmann, 2004].

В другом исследовании [Jakob, Bedulina, Aхenov-Gribanov, 2017] приводятся данные о физиологических реакциях байкальских амфипод *E. suaneus* и *E. verrucosus* на интоксикацию хлоридом кадмия. Оба вида отличаются по показателям смертности при длительной инкубации в сублетальных концентрациях (LC10, LC1 и LC0,1) растворов хлорида кадмия, при этом 50%-ный порог смертности у *E. suaneus* достигается намного быстрее, чем у *E. verrucosus*, что на первый взгляд может свидетельствовать о мень-

шей чувствительности последнего к хлориду кадмия. Однако при оценке параметров кислородного метаболизма и физиологических реакций (двигательной активности, частоты дыхательных движений и потребления кислорода) было выявлено, что инкубация в растворах хлорида кадмия ведёт к быстрой и существенной (15–38 %) редукции потребления кислорода и частоты дыхательных движений в покое у *E. verrucosus*, но не у *E. cyaneus* даже при очень низких концентрациях токсиканта (LC1). Это свидетельствует о развитии метаболической депрессии у *E. verrucosus*, которая является известной стресс-реакцией для снижения энергетических затрат при развитии неблагоприятной ситуации [Guppy, Withers, 1999]. Поскольку *E. verrucosus* замедляет метаболизм намного быстрее, чем начинается гибель *E. cyaneus*, загрязнение тяжёлыми металлами для первого вида будет иметь более выраженные негативные последствия, проявляющиеся на уровне популяции и биоценоза. Данное исследование иллюстрирует, что оценка физиологических реакций организма на стрессовое воздействие является более информативным методом, чем только учёт смертности, для прогнозирования состояния экосистем.

Таким образом, определение физиологических порогов толерантности ключевых видов является важным критерием при прогнозировании устойчивости экосистемы водоёма.

*Клеточный, биохимический и молекулярный уровни. Ранний сигнал стрессового состояния.* Наиболее ранним ответом на воздействие критического фактора среды является реакция на молекулярном и клеточном уровне. При этом меняется регуляция экспрессии и синтеза генов и белков, изменяется активность ферментов, запускаются каскады клеточных сигнальных процессов и система клеточного стресс-ответа. Выявление видоспецифических особенностей этих реакций и определение биомаркеров клеточного стресса важно для развития методов ранней диагностики состояния экосистем. Универсальная система клеточного стресс-ответа схожа у всех организмов и включает в себя системы регуляции клеточного цикла, молекулярные шапероны, системы антиоксидантной защиты и репарации нуклеиновых кислот [Kültz, 2003]. Однако, несмотря на высокую консервативность, внутри каждой из систем обнаруживается существенное разнообразие, связанное с эволюционными и экологическими особенностями видов. Например, может измениться число генов белков стресс-ответа, регуляция их экспрессии и синтеза (в том числе, за счёт эпигенетических факторов), сигнальные пути стресс-ответа [Next-generation proteomics ... , 2014]. Особенно эти процессы могут быть активны в экосистемах, в которых наблюдаются ускоренные темпы видообразования, эволюции и адаптивной радиации таксонов, что характерно для фауны Байкала [Transcriptome-based phylogeny ... , 2017]. Таким образом, для использования этих систем при мониторинге требуется изучить разнообразие и особенности функционирования клеточных и молекулярных механизмов стресс-ответа у предполагаемых тест-объектов.

Исследование клеточных, биохимических и молекулярно-биологических механизмов стресс-ответа у байкальских амфипод началось с работ М. А. Тимофеева и соавторов с начала первого десятилетия XXI в. Были проведены исследования по изучению системы белков теплового шока, антиоксидантной системы, системы множественной устойчивости к ксенобиотикам и системы энергетического метаболизма [Тимофеев, 2010].

*Белки теплового шока у байкальских амфипод.* Белки теплового шока (БТШ) отвечают за правильную укладку вновь синтезированных полипептидных цепей, а также обеспечивают повторную укладку частично повреждённых белковых глобул. Экспрессия и синтез этих белков запускается при кратковременном воздействии летальных температур («тепловом шоке») и других протеотоксических воздействиях [Lindquist, Craig, 1988]. Функции БТШ на клеточном, тканевом и организменном уровне разнообразны и непосредственно связаны с адаптацией организма к условиям среды и с реакцией на резкие изменения абиотических параметров («стрессовые условия»). При этом в клетке останавливается синтез практически всех белков и запускается стресс-индуцируемый синтез БТШ, содержание которых за короткое время возрастает в геометрической прогрессии [Hendrick, Hartl, 1993]. Благодаря данной функции БТШ широко используются в качестве биоиндикаторов клеточного стресса в биомедицинских и экологических исследованиях [Feder, Hofmann, 1999].

Известно множество семейств БТШ, различающихся по молекулярной массе. Наиболее изученным является семейство БТШ70. В классических работах, проводимых на мухах-дрозофилах, содержание стресс-индуцируемых форм БТШ70 после воздействия стрессового фактора многократно возрастает по сравнению с контролем. Благодаря этому БТШ70 долгое время считали идеальным маркером клеточного стресса. Однако расширение спектра немодельных организмов выявило существенный эволюционный полиморфизм функционирования механизма экспрессии и синтеза БТШ70 [Garbuz, Evgen'ev, 2017]. Было обнаружено, что у разных видов степень увеличения содержания БТШ70 существенно варьирует и зависит как от количества генов этих белков в геноме, так и от степени их синтеза и регуляции экспрессии их генов [Garbuz, Evgen'ev, 2017].

На амфиподах, в частности, было продемонстрировано, что базовый уровень БТШ70 коррелирует с термотолерантностью видов [Bedulina, Zimmer, Timofeyev, 2010; Contrasting cellular ... , 2014; Expression patterns ... , 2013; Intersexual differences ... , 2017]. Был выявлен молекулярный механизм, обеспечивающий подобные различия у байкальских амфипод. Так, у более термотолерантного *E. cyaneus* происходило увеличение числа копий генов БТШ70 в геноме по сравнению с термочувствительным *E. verrucosus*. Это обеспечило в пять раз более высокий «базальный уровень» БТШ70 у термотолерантного вида. Кроме того, у этих двух близкородственных видов были выявлены отличия в регуляции экспрессии БТШ70: у термотолерантного вида регуляторные факторы теплового шока дольше оставались связанными с находящимися в промоторе элементами теплового шока, а сам



промотор имеет более компактную структуру для усиления экспрессионного сигнала по сравнению с термочувствительным видом [Expression patterns ... , 2013]. Такая высокая степень диверсификации в функционировании механизма стресс-индуцибельной экспрессии и синтеза БТШ70 накладывает определённые ограничения для возможности использования БТШ70 при проведении биомониторинга. Необходимо учитывать экологический статус вида и характерный для него эволюционно-обусловленный базовый уровень БТШ70.

Так, содержание БТШ70 у термоустойчивого *E. cyaneus*, выловленного при разных температурах, никак не коррелировало с температурой вылова. Экспериментальные исследования, проведённые с этим видом, свидетельствуют о способности к незначительному (2–5 кратному) повышению уровня БТШ70 при остром воздействии температур от 25 °С и выше [Тимофеев, 2010; Expression patterns ..., 2013]. При постепенном повышении температуры со скоростью 1 °С/ч двукратное повышение содержания БТШ70 начинают фиксировать при достижении температур 27 °С [Expression patterns ..., 2013]. Высокая термотолерантность этого вида обеспечивает буферность системы БТШ70 и высокий конститутивный уровень его экспрессии, однако следует учитывать множественность изоформ этого белка, часть из которых могут снижать содержание при воздействии стрессовых факторов, что может отразиться на общем уровне стресс-индуцированной экспрессии. Подобные результаты были также показаны для морского вида амфипод из семейства Talitridae – *Orchestia gammarellus* (Pallas, 1766), который обитает в зоне заплеска и ведёт полуназемный образ жизни. Адаптация к широкому диапазону температурных флуктуаций в зоне обитания обеспечивает этому виду повышенный конститутивный уровень БТШ70 и слабовыраженную реакцию на последующее повышение температуры [Bedulina, Zimmer, Timofeyev, 2010].

Иная картина наблюдается у других массовых видов литоральных амфипод. Так, содержание БТШ70 у особей *E. verrucosus*, выловленных в районе г. Северобайкальска (западное побережье северной котловины Байкала) было в 2–3 раза ниже содержания этих белков у гаммарусов из популяции того же вида из Южного Байкала (бух. Бол. Коты), что коррелировало с суммами температур на разных широтах точек вылова [Сравнительный анализ ... , 2013]. При проведении экспериментов у этого вида была обнаружена достаточно выраженная реакция БТШ70 на температурное воздействие. Температура 25 °С вызывала существенное повышение содержания БТШ70, вплоть до 10-кратного, а постепенное повышение температуры приводило к заметному повышению содержания этих белков уже при достижении 11 °С [Bedulina, Zimmer, Timofeyev, 2010]. Таким образом, использование БТШ70 в качестве биомаркера клеточного стресса для данного вида является вполне обоснованным.

Несмотря на высокую термотолерантность ещё одного массового литорального вида, *G. fasciatus*, содержание БТШ70 у животных из популяций, обитающих в разных температурных условиях, коррелировало с температу-

рой воды, при которой вылавливали амфипод. Кроме того, этот вид также способен к многократному накоплению БТШ70 в экспериментальных условиях. Этот интересный факт до сих пор не находит объяснений, поскольку «базовый уровень» БТШ70 у этого вида такой же, как и у *E. cyaneus*. Вероятно, причина кроется в эволюционных особенностях *G. fasciatus*, который считается третичным реликтом добайкальского происхождения [Transcriptome-based phylogeny ... , 2017], сохранившимся в эпоху оледенений в рефугиумах вокруг горячих источников. Данный вид до сих пор можно встретить вокруг горячих источников, где он способен обитать в градиенте температур от 3 до 29 °С. Вероятно, молекулярный механизм регуляции экспрессии БТШ70 у этого вида имеет свои особенности, обуславливающие многократное усиление синтеза БТШ70 даже при наличии высокого базового уровня. Изучение этих особенностей требует дополнительных исследований.

Базовые уровни БТШ70 являются важнейшим экологическим признаком и отражают уровень термотолерантности вида. Так, согласно результатам М. А. Тимофеева, исследуемые виды амфипод распределились по базовым уровням содержания БТШ70 следующим образом: *E. verrucosus* < *E. vittatus* < *E. cyaneus* < *G. fasciatus*. Этот ряд совпадает с рядом термотолерантности изучаемых видов [Тимофеев, 2010].

Говоря о возможностях применения БТШ70 в биомониторинге, следует также учитывать внутривидовой полиморфизм. Так, последнее исследование показало существенный половой диморфизм БТШ70 у *E. cyaneus* и *E. verrucosus* [Intersexual differences ... , 2017]. Самки последнего характеризовались сниженным уровнем БТШ70 по сравнению с самцами, а также слабовыраженной реакцией на острое температурное воздействие. С другой стороны, самки *E. cyaneus* обладали несколько более завышенным уровнем БТШ70, чем самцы, за счёт дополнительной группы изоформ БТШ70, присутствующих в виде дополнительного бэнда на вестерн-блот мембранах только у самок этого вида. Содержание БТШ70 у разных полов напрямую коррелировало с термотолерантностью, и, вероятно, связано с эволюционно-обусловленными адаптациями к температурным условиям сезона размножения, как описывалось в предыдущем разделе.

В целом следует отметить, что применение БТШ70 в качестве биомаркера для мониторинга состояния прибрежной экосистемы Байкала возможно только при учёте экологических особенностей потенциальных видов-биоиндикаторов. Для полноты оценки необходимы данные о молекулярных особенностях экспрессии и синтеза БТШ70 у других наиболее массовых видов со схожей с *E. verrucosus* термотолерантностью: *E. vittatus*, *E. maritiji*, *E. maackii*).

*Система антиоксидантной защиты у байкальских амфипод.* Ещё одной важнейшей системой неспецифического стресс-ответа является система антиоксидантной защиты (АОС). Эта система представляет комплекс ферментных систем и низкомолекулярных соединений, способных нейтрализовать активные формы кислорода и продукты перекисного окисления органических молекул, которые вырабатываются в результате нарушения рабо-

ты электрон-транспортной цепи во внутренней мембране митохондрий и других метаболических процессов [Янковский, 2000].

Благодаря своей универсальности, активность отдельных компонентов АОС широко используется при биоиндикации. В частности, повышенная активность супероксид-дизмутаз, пероксидаз, каталаз и других ферментов АОС у гидробионтов считается признаком развивающегося под воздействием ухудшения экологической ситуации окислительного клеточного стресса [Horion, Thomé, Gismondi, 2015]. Как показали исследования, проводимые на байкальских амфиподах и родственных им видах, как и в случае с БТШ70, наблюдается существенное разнообразие базовых уровней активности таких ферментов АОС, как каталаза, пероксидаза и глутатион-S-трансфераза. Наибольшей активностью у исследованных байкальских и других пресноводных амфипод обладает каталаза (200–600 нКат/мг белка), после неё из изученных АОС ферментов следует глутатион-S-трансфераза (6–13 нКат/мг белка), наименьшей активностью обладает пероксидаза (0,05–0,3 нКат/мг белка). В отличие от БТШ70, базовые уровни активности этих ферментов не были взаимосвязаны с известными данными по термо- и токсикотолерантности видов, а также их размерными характеристиками [Тимофеев, 2010]. Причину разной активности ферментов АОС у разных видов амфипод ещё предстоит выяснить в будущем. Помимо этого, была обнаружена разная активность ферментов АОС у различных размерно-возрастных групп амфипод *E. verrucosus*, *Pallasea cancelloides* Sars, 1867 и *G. lacustris*. Показано, что у обоих байкальских видов активность пероксидазы с возрастом увеличивается, а у *G. lacustris* – снижается [Specific antioxidant ... , 2006].

В экспериментальных условиях отмечали разнонаправленную реакцию изменения активности ферментов АОС при кратковременном воздействии летальных температур на амфипод. Для каталазы отмечали тенденцию к повышению активности, либо отсутствие выраженных изменений в активности. Активность пероксидазы не менялась или снижалась у всех исследуемых видов амфипод. Реакция глутатион-S-трансферазы различалась у исследуемых видов в ответ на острое температурное воздействие – активность фермента возрастала у термотолерантных видов и падала у термочувствительных [Тимофеев, 2010].

Исследование, проведённое Д. В. Аксёновым-Грибановым с соавторами [Thermal preference ... , 2016], демонстрирует, что повышение или снижение активности ферментов АОС в условиях градиента температур начинается, когда температура выходит за пределы видоспецифичного «аэробного окна». Это показывает, что у исследуемых видов имеются микроэволюционные адаптации сигнальных систем активации стресс-ответа с участием АОС, либо же направленная изменчивость аминокислотных последовательностей самих ферментов.

Результаты исследований [Тимофеев, 2010] демонстрируют, помимо температурного фактора, реакцию АОС на токсическое воздействие хлорида кадмия [Evaluation of biochemical ... , 2008] и прооксидативное воздействие гуминовых веществ [Specific antioxidant ... , 2006]. Таким образом, измене-

ние активности ферментов АОС является чувствительным биомаркером стрессовых состояний амфипод, и, зная видоспецифические особенности, возможно использовать активность ферментов АОС при мониторинге состояния бентосных экосистем.

*Биохимическая оценка активности энергетического метаболизма.* Обеспечение клеток и тканей энергией является центральным звеном метаболических путей. Как уже упоминалось выше, концепция кислородно-ёмкостных порогов термотолерантности предусматривает оптимальное протекание метаболических реакций только в пределах «аэробного окна» [Röttinger, Vosk, Mark, 2017]. За его пределами окислительное фосфорилирование ограничено, и клетки переходят на генерацию энергии посредством анаэробно-биолиза, конечным продуктом которого является лактат. Анаэробно-биолиз развивается также за счёт повреждения компонентов мембран митохондрий в результате развития окислительного стресса и сопутствующего ему перекисного окисления липидов, токсического воздействия на белки, либо как итог воздействия некоторых стрессовых факторов (например, гидростатического давления). В исследовании [Thermal preference ... , 2016] оценивали скорость перехода на анаэробно-биолиз у байкальских амфипод *E. verrucosus*, *Omatogammarus flavus* (Dybowski, 1874) и голарктического *G. lacustris* при постепенном понижении и повышении температуры. Было показано, что зона стабильности содержания лактата и активности фермента лактатдегидрогеназы, ответственного за реакцию превращения лактата в пируват и обратно, совпадает с зоной предпочитаемых температур для всех исследуемых видов. Таким образом, содержание лактата и активность лактатдегидрогеназы могут являться хорошим маркером для оценки влияния повышения температуры на литоральных байкальских амфипод. Помимо этого, были проведены исследования, демонстрирующие повышение содержания лактата у байкальских амфипод при токсическом воздействии хлорида кадмия [Протопопова, 2011], что позволяет использовать этот маркер также в экотоксикологических исследованиях с применением байкальских амфипод.

### **Заключение**

Применение современных методов оценки стрессовых состояний байкальских амфипод является перспективным направлением в экофизиологических исследованиях на Байкале, позволяющим выявлять высокочувствительные стресс-маркеры. На данный момент проведён значительный объём исследований по оценке возможности применения наиболее распространённых биомаркеров на физиологическом, клеточном и биохимическом уровнях на байкальских амфиподах в ответ на температурное и токсическое воздействие. Полученные данные уже позволяют делать прогнозы состояния макрозообентоса литорали Байкала при дальнейшем потеплении вод и усилении антропогенной нагрузки, однако для получения более полной картины требуются дополнительные исследования.

Следует отметить, что амфиподы представляют собой достаточно слабо изученный таксон в аспекте протекания биохимических реакций и клеточ-

ных процессов. Это накладывает определённые ограничения на использование молекулярно-биохимических маркеров стрессовых состояний, поскольку многие метаболические и сигнальные пути стресс-ответа у амфипод неизвестны. Для поиска таксон-специфичных механизмов стресс-ответа применяют глобальные методы анализа, охватывающие совокупность генов (геном), мРНК (транскриптом), белков (протеом) и метаболитов (метаболом). На байкальских амфиподах исследования в этой области только начались. Так, прочитан геном байкальского вида амфипод *E. verrucosus* [A first glimpse ... , 2014], однако его сборка и расшифровка затруднены большим размером генома (9 Гб) и наличием коротких повторов, составляющих до 80 % генома.

Недавнее исследование [Intersexual differences ... , 2017] демонстрирует возможность применения протеомного подхода для оценки стресс-ответа байкальских амфипод. При помощи этого подхода впервые удалось выявить новые потенциальные биомаркеры, специфичные для самок и самцов исследованных видов. Исследования в этой области позволят существенно расширить спектр применяемых маркеров, а также внесут вклад в изучение эволюции адаптаций байкальской фауны к абиотическим параметрам среды.

#### Список литературы

Протопопова М. В. Механизмы неспецифической резистентности у байкальских и палеарктических амфипод в условиях интоксикации хлоридом кадмия : дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, СФУ, 2011. 144 с.

Сравнительный анализ экспрессии генов и накопления БТШ70 у представителей двух разных популяций байкальского вида *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) / Е. В. Мадьярова, Ю. А. Лубяга, А. Н. Гурков, К. П. Верещагина, Е. М. Кондратьева, Е. П. Щапова, М. А. Тимофеев, Т. Люкенбах, Д. С. Бедулина // J. of Stress Physiology & Biochemistry. 2013. Т. 9, № 4. С. 345–351.

Тахтеев В. В. Очерки о бокоплавах озера Байкал: Систематика, сравнительная экология, эволюция. Иркутск : Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2000. 355 с.

Тимофеев М. А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод : дис. ... д-ра биол. наук. Томск : ТГУ, 2010. 384 с.

Тимофеев М. А., Кириченко К. А. Экспериментальная оценка роли абиотических факторов в ограничении распространения эндемиков за пределы оз. Байкал, на примере амфипод // Сиб. экол. журн. 2004. № 1. С 41–50.

Янковский О. Я. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты). СПб. : ИГРА, 2000. 294 с.

A first glimpse at the genome of the Baikalian amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* / L. Rivarola-Duarte, C. Otto, F. Jühling, S. Schreiber, D. Bedulina, L. Jakob, A. Gurkov, D. Axenov-Gribanov, A. H. Sahyoun, M. Lucassen, J. Hackermüller, S. Hoffmann, F. Sartoris, H.-O. Pörtner, M. Timofeyev, T. Luckenbach, P. F. Stadler // J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 2014. Vol. 322, N 3. P. 177–189. DOI: 10.1002/jez.b.22560.

Bedulina D. S., Zimmer M., Timofeyev M. A. Sub-littoral and supra-littoral amphipods respond differently to acute thermal stress // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol., 2010. Vol. 155, N 4. P. 413–418. DOI: 10.1016/j.cbpb.2010.01.004.

Contrasting cellular stress responses of Baikalian and Palearctic amphipods upon exposure to humic substances: environmental implications / M. V. Protopopova, V. V. Pavlichenko, R. Menzel, A. Putschew, T. Luckenbach, C. E. Steinberg // Environ. Sci. Pollut. Res. 2014. Vol. 21, N 24. P. 14124–14137. DOI: 10.1007/s1135.

Evaluation of biochemical responses in Palearctic and Lake Baikal endemic amphipod species exposed to CdCl<sub>2</sub> / M. A. Timofeyev, Z. M. Shatilina, D. S. Bedulina, M. V. Protopopova, V. V. Pavlichenko, O. I. Grabelnykh, A. V. Kolesnichenko // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008. Vol. 70, N 1. P. 99–105. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.06.014.

Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal / D. S. Bedulina, M. B. Evgen'ev, M. A. Timofeyev, M. V. Protopopova, D. G. Garbuz, V. V. Pavlichenko, T. Luckenbach, Z. M. Shatilina, D. V. Axenov-Gribanov, A. N. Gurkov, I. M. Sokolova, O. G. Zatsepina // *Mol. Ecol.* 2013. Vol. 22, N 5. P. 1416–1430. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.12136>.

Feder M. E., Hofmann G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology // *Annu. Rev. Physiol.*, 1999. Vol. 61, N 1. P. 243–282. DOI: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243.

Garbuz D. G., Evgen'ev M. B. The evolution of heat shock genes and expression patterns of heat shock proteins in the species from temperature contrasting habitats // *Russian Journal of Genetics*, 2017. Vol. 53, N 1, P. 21–38. DOI: 10.1134/S1022.

Grilo T. F., Rosa R. Intersexuality in aquatic invertebrates: Prevalence and causes // *Sci. Total Environ.*, 2017. Vol. 592, No. 15. P. 714–728. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.099.

Groundwater contamination by sewage causes benthic algal outbreaks in the littoral zone of Lake Baikal (East Siberia) / O. A. Timoshkin, M. V. Moore, N. N. Kulikova, I. V. Tomberg, V. V. Malnik, M. N. Shimaraev, E. S. Troitskaya, A. A. Shirokaya, V. N. Sinyukovich, E. P. Zaitseva, V. M. Domysheva, M. Yamamuro, A. E. Poberezhnaya, E. M. Timoshkina // *J. Great Lakes Res.* 2018. Vol. 44, N 2. P. 230–244. DOI: 10.1016/j.jglr.2018.01.008.

Guppy M., Withers P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 1999. Vol. 74, N 1. P. 1–40. DOI: 10.1017/S0006323198005258.

Halpin P. M., Menge B. A., Hofmann G. E. Experimental demonstration of plasticity in the heat shock response of the intertidal mussel *Mytilus californianus* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2004. Vol. 276. P. 137–145. DOI: 10.3354/meps276137.

Hamza-Chaffai A. Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring / *Int. J. Biotech. Well. Indus.* 2014. Vol. 3, N 1. P. 19–26. DOI: 10.6000/1927-3037.2014.03.01.4.

Hendrick J.P. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. Vol. 62, N 1. P. 349–384. DOI: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002025.

Horion S., Thomé J. P., Gismondi E. Changes in antitoxic defense systems of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* exposed to BDE-47 and BDE-99 // *Ecotoxicol.* 2015. Vol. 24, N 4. P. 959–966. DOI: 10.1007/s10646-015-1438-4.

Intersexual differences of heat shock response between two amphipods (*Eulimnogammarus verrucosus* and *Eulimnogammarus cyaneus*) in Lake Baikal / D. Bedulina, M. F. Meyer, A. Gurkov, E. Kondratjeva, B. Baduev, R. Gusdorf, M. A. Timofeyev // *Peer J.* 2017. Vol. 5. P. e2864, DOI: 10.7717/peerj.2864.

Ironside J. E., Alexander J. Microsporidian parasites feminise hosts without paramyxean co-infection: support for convergent evolution of parasitic feminization // *Int. J. Parasitol.* 2015. Vol. 45. P. 427–433. DOI: 10.1016/j.ijpara.2015.02.001.

Jakob L., Bedulina D. S., Axenov-Gribanov D. V. Uptake kinetics and subcellular compartmentalization explain lethal but not sublethal effects of cadmium in two closely related amphipod species // *Environ. Sci. Technol.* 2017. Vol. 51, N 12. P. 7208–7218. DOI: 10.1021/acs.est.6b06613.

Kozhova O. M., Izmet'seva L. R. Lake Baikal: Evolution and Biodiversity. Leiden : Blackhuys Publishers, 1998. 447 p.

Kültz D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function // *J. Exp. Biol.* 2003. Vol. 206, N 18. P. 3119–3124/ DOI: 10.1242/jeb.00549.

Lake Baikal amphipods under climate change: thermal constraints and ecological consequences / L. Jakob, D. V. Axenov-Gribanov, A. N. Gurkov, M. Ginzburg, D. S. Bedulina, M. A. Timofeyev, T. Luckenbach, M. Lucassen, F. J. Sartoris, H.-O. Pörtner // *Ecosphere.* 2016. Vol. 7, N 3. P. e01308. DOI: 10.1002/ecs2.1308.

Lindquist S., Craig E. A. The heat-shock proteins // *Annu. Rev. Gen.*, 1988. Vol. 22, N 1. P. 631–677. DOI: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.

Microsporidian parasites found in the hemolymph of four Baikalian endemic amphipods / E. V. Madyarova, R. V. Adelshin, M. D. Dimova, D. V. Axenov-Gribanov, Y. A. Lubyaga, M. A. Timofeyev // *PLoS one*. 2015. Vol. 10, N 6. P. e0130311. DOI: 10.1371/journal.pone.0130311.

Next-generation proteomics: toward customized biomarkers for environmental biomonitoring / J. Trapp, J. Armengaud, A. Salvador, A. Chaumot, O. Geffard // *Environ. Sci. Technol.* 2014. Vol. 48, N 23. P. 13560–13572. DOI: 10.1021/es501673s.

Perrot-Minnot M. J., Kaldonski N., Cézilly F. Increased susceptibility to predation and altered anti-predator behavior in an acanthocephalan-infected amphipod // *Int. J. Parasitol.* 2007. Vol. 37, N 6. P. 645–651. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.12.005.

Pörtner H. O., Bock C., Mark F. C. Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology // *J. Exp. Biol.* 2017. Vol. 220, N 15. P. 2685–2696. DOI: 10.1242/jeb.134585.

Potemkina T. G., Potemkin V. L., Fedotov A. P. Climatic factors as risks of recent ecological changes in the shallow zone of Lake Baikal // *Russian Geology and Geophysics*, 2018. Vol. 59, N 5. P. 556–565. DOI: 10.1016/j.rgg.2018.04.008.

Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? / O. A. Timoshkin, D. P. Samsonov, M. Yamamuro, M. V. Moore, O. I. Belykh, V. V. Malnik, M. V. Sakirko, A. A. Shirokaya, N. A. Bondarenko, V. M. Domysheva, G. A. Fedorova, A. I. Kochetkov, A. V. Kuzmina, A. G. Lukhnev, O. V. Medvezhonkova, A. V. Nepokrytykh, E. M. Pasyukova, A. E. Poberezhnaya, N. A. Bukshuk // *J. Great Lakes Res.* 2016. Vol. 42, N 3. P. 487–497. DOI: 10.1016/j.jglr.2016.02.011.

Rodríguez E. M., Medesani D. A., Fingerman M. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2007. Vol. 146, N 4. P. 661–671. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.04.030.

Specific antioxidant reactions to oxidative stress promoted by natural organic matter in two amphipod species from Lake Baikal / M. A. Timofeyev, Z. M. Shatilina, A. V. Kolesnichenko, V. V. Kolesnichenko, C. E. Steinberg // *Environ. Toxicol.* 2006. Vol. 21, N 2. P. 104–110. DOI: 10.1002/tox.20161.

Stillman J. H. Causes and consequences of thermal tolerance limits in rocky intertidal porcelain crabs, genus *Petrolisthes* // *Integr. Comp. Biol.* 2002. Vol. 42, N 4. P. 790–796. DOI: 10.1093/icb/42.4.790.

Takhteev V. V., Berezina N. A., Sidorov D. A. Checklist of the Amphipoda (Crustacea) from continental waters of Russia, with data on alien species // *Arthropoda Selecta*. 2015. Vol. 24, N 3. P. 335–370.

Thermal preference ranges correlate with stable signals of universal stress markers in Lake Baikal endemic and Holarctic amphipods / D. Axenov-Gribanov, D. Bedulina, Z. Shatilina, L. Jakob, K. Vereshchagina, Y. Lubyaga, A. Gurkov, E. Shchapova, T. Luckenbach, M. Lucassen, F. J. Sartoris, H. O. Pörtner, M. Timofeyev // *PLoS one*. 2016. Vol. 11, N 10. P. e0164226. DOI: 10.1371/journal.pone.0164226.

Transcriptome-based phylogeny of endemic Lake Baikal amphipod species flock: fast speciation accompanied by frequent episodes of positive selection / S. A. Naumenko, M. D. Logacheva, N. V. Popova, A. V. Klepikova, A. A. Penin, G. A. Bazykin, A. E. Etingova, N. S. Mugue, A. S. Kondrashov, L. Y. Yampolsky // *Mol. Ecol.* 2017. Vol. 26, N 2. P. 536–553. DOI: 10.1111/mec.13927.

## Physiological and Biochemical Markers of Stress Response of Endemic Amphipods from Lake Baikal: Current State and Perspectives

D. S. Bedulina, Z. M. Shatilina, A. N. Gurkov, Y. A. Lubyaga, K. P. Vereshchagina, E. V. Madyarova, D. V. Axenov-Gribanov, M. A. Timofeyev

*Irkutsk State University, Irkutsk*

**Abstract.** The review summarizes the state of the art of researches of physiological, cellular, molecular and biochemical stress markers in Baikal endemic and other freshwater amphipods. The last achievements and future perspectives in this area are discussed. Baikal amphipods are the important part of littoral benthic communities, which undergo the significant anthropogenic pressure and the impact of climate change. Thermal preferences, temperature tolerance borders, and a sensitivity to heavy metals of key benthic amphipod species are studied. Preliminary data indicate the possibility of using some species of littoral amphipods as bioindicators of eutrophication. Autecological studies allow us to identify intraspecies variation in resistances to the temperature, to determine the physiological thresholds of thermotolerance, that limits amphipods growth and reproduction. Obtained results demonstrate the correlation of preferred temperatures to the physiological thermal optimum of different amphipod species. The results allow us to forecast the effects of warming and anthropogenic impact on the coastal fauna of amphipods in Lake Baikal. The complex of nonspecific cellular and molecular stress-response mechanisms in amphipods is investigated. The role of the structural and functional rearrangements of heat shock proteins expression and synthesis system in the thermotolerance development of amphipods is shown. Species-specific peculiarities of antioxidant enzymes activities under various stress condition are studied in the key Baikal amphipod species. The obtained results demonstrate a high degree of interspecific variability of physiological and biochemical stress-response mechanisms in Baikal amphipods. With the help of genomics, transcriptomics and proteomics, other taxon-specific molecular biomarkers of stress-response in different ecological groups of amphipods are studied.

**Keywords:** amphipods, biomarkers, antioxidants, Baikal Lake, Hsp70, stress, endemics.

**For citation:** Bedulina D.S., Shatilina Z.M., Gurkov A.N., Lubyaga Y.A., Vereshchagina K.P., Madyarova E.V., Axenov-Gribanov D.V., Timofeyev M.A. Physiological and Biochemical Markers of Stress Response of Endemic Amphipods from Lake Baikal: Current State and Perspectives. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2018, vol. 23, pp. 3-22. DOI: <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2018.23.3> (in Russian)

### References

Mad'yarova E.V., Lubyaga Yu.A., Gurkov A.N., Vereshchagina K.P., Kondrat'eva E.M., Shchapova E.P., Timofeev M.A., Luckenbach T., Bedulina D.S. Sravnitelnyi analiz ekspressii genov i nakopleniya Hsp70 u predstavitelei dvukh raznykh populyatsii baikal'skogo vida *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) [Comparative Analysis of Gene Expression and Accumulation of Hsp70 in Representatives of Two Different Populations of Baikal Species *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858)]. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2013, vol. 9, no. 4, pp. 345-351. (in Russian).

Protopopova M.V. *Mekhanizmy nespetsificheskoi rezistentnosti u baikal'skikh i palearkticheskikh amfipod v usloviyakh intoksikatsii khloridom kadmiya* [Mechanisms of Unspecific Resistance of Baikal and Palearctic Amphipods to Cadmium Chloride Intoxication: Candidate in Biology Dissertation]. Krasnoyarsk, Siberian Fed. Univ. Publ., 2011, 144 p. (in Russian)

Takhteev V.V. *Ocherki o bokoplavakh ozera Baikal: Sistematika, sravnitel'naya ekologiya, evolyutsiya* [Essays on the Amphipods of Lake Baikal: Systematics, Comparative Ecology, Evolution]. Irkutsk, Irkutsk St. Univ. Publ., 2000, 355 p. (in Russian).

Timofeev M.A. *Ekologicheskie i fiziologicheskie aspekty adaptatsii k abioticheskim faktoram sredi endemichnykh baikal'skikh i palearkticheskikh amfipod* [Ecological and Physiological Aspects



of Adaptation to Abiotic Factors of the Environment of Endemic Baikal and Palearctic Amphipods: Doctor in Biology Dissertation]. Tomsk, Tomsk State University, 2010, 384 p. (in Russian)

Timofeev M.A., Kirichenko K.A. Eksperimental'naya otsenka roli abioticheskikh faktorov v ogranichenii rasprostraneniya endemikov za predely oz. Baikal, na primere amfipod [Experimental Estimation of the Role of Abiotic Factors in Distribution of Endemics beyond Lake Baikal on Example of Amphipods]. *Sibirskiy ekologicheskiy zhurnal* [Contemporary Problems of Ecology], 2004, no. 1, pp. 41-50. (in Russian)

Yankovskii O.Ya. *Toksichnost' kisloroda i biologicheskie sistemy (evolyutsionnye, ekologicheskie i mediko-biologicheskie aspekty)* [Toxicity of Oxygen and Biological Systems (Evolutionary, Ecological and Biomedical Aspects)]. St.-Petersburg, Igra Publ., 2000, 294 p. (in Russian).

Axenov-Gribanov D., Bedulina D., Shatilina Z., Jakob L., Vereshchagina K., Lubyaga Y., Gurkov A., Shchapova E., Luckenbach T., Lucassen M., Sartoris F.J., Pörtner H.O., Timofeyev M. Thermal preference ranges correlate with stable signals of universal stress markers in Lake Baikal endemic and Holarctic amphipods. *PLoS one*, 2016, vol. 11, no. 10, pp. e0164226. DOI: 10.1371/journal.pone.0164226.

Bedulina D.S., Zimmer M., Timofeyev M.A. Sub-littoral and supra-littoral amphipods respond differently to acute thermal stress. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 2010, vol. 155, no. 4, pp. 413-418. DOI: 10.1016/j.cbpb.2010.01.004.

Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Menzel R., Putschew A., Luckenbach T., Steinberg C.E. Contrasting cellular stress responses of Baikalian and Palearctic amphipods upon exposure to humic substances: environmental implications. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2014, vol. 21, no. 24, pp. 14124-14137. DOI: 10.1007/s1135.

Timofeyev M.A., Shatilina Z.M., Bedulina D.S., Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Grabelnykh O.I., Kolesnichenko A.V. Evaluation of biochemical responses in Palearctic and Lake Baikal endemic amphipod species exposed to CdCl<sub>2</sub>. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2008, vol. 70, no. 1, pp. 99-105. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.06.014.

Bedulina D.S., Evgen'ev M.B., Timofeyev M.A., Protopopova M.V., Garbuz D.G., Pavlichenko V.V., Luckenbach T., Shatilina Z.M., Axenov-Gribanov D.V., Gurkov A.N., Sokolova I.M., Zatssepina O.G. Expression patterns and organization of the hsp70 genes correlate with thermotolerance in two congener endemic amphipod species (*Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*) from Lake Baikal. *Mol. Ecol.*, 2013, vol. 22, no. 5, pp. 1416-1430. DOI: 10.1111/mec.12136.

Bedulina D., Meyer M.F., Gurkov A., Kondratjeva E., Baduev B., Gusdorf R., Timofeyev M.A. Intersexual differences of heat shock response between two amphipods (*Eulimnogammarus verrucosus* and *Eulimnogammarus cyaneus*) in Lake Baikal. *PeerJ.*, 2017, vol. 5, pp. e2864. DOI: 10.7717/peerj.2864.

Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 1999, vol. 61, no. 1, pp. 243-282. DOI: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243.

Garbuz D.G., Evgen'ev M.B. The evolution of heat shock genes and expression patterns of heat shock proteins in the species from temperature contrasting habitats. *Russian Journal of Genetics*, 2017, vol. 53, no. 1. DOI: 10.1134/S1022.

Grilo T.F., Rosa R. Intersexuality in aquatic invertebrates: Prevalence and causes. *Sci. Total Environ.*, 2017, vol. 592, no. 15, pp. 714-728. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.099.

Guppy M., Withers P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 1999, vol. 74, no. 1, pp. 1-40. DOI: 10.1017/S0006323198005258.

Halpin P.M., Menge B.A., Hofmann G.E. Experimental demonstration of plasticity in the heat shock response of the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2004, vol. 276, pp. 137-145. DOI: 10.3354/meps276137.

Hamza-Chaffai A. Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. *Int. J. Biotech. Well. Indus.*, 2014, vol. 3, no. 1, pp. 19-26. DOI: 10.6000/1927-3037.2014.03.01.4.

Hendrick J.P. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, vol. 62, no. 1, pp. 349-384. DOI: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002025.

Horion S., Thomé J.P., Gismondi E. Changes in antitoxic defense systems of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* exposed to BDE-47 and BDE-99. *Ecotoxicol.*, 2015, vol. 24, no. 4, pp. 959-966. DOI: 10.1007/s10646-015-1438-4.

Ironside J.E., Alexander J. Microsporidian parasites feminise hosts without paramyxean co-infection: support for convergent evolution of parasitic feminization. *Int. J. Parasitol.*, 2015, vol. 45, pp. 427-433. DOI: 10.1016/j.ijpara.2015.02.001.

Jakob L., Axenov-Gribanov D.V., Gurkov A.N., Ginzburg M., Bedulina D.S., Timofeyev M.A., Luckenbach T., Lucassen M., Sartoris F.J., Pörtner H.-O. Lake Baikal amphipods under climate change: thermal constraints and ecological consequences. *Ecosphere*, 2016, vol. 7, no. 3, pp. e01308. DOI: 10.1002/ecs2.1308.

Jakob L., Bedulina D.S., Axenov-Gribanov D.V. Uptake kinetics and subcellular compartmentalization explain lethal but not sublethal effects of cadmium in two closely related amphipod species. *Environ. Sci. Technol.*, 2017, vol. 51, no. 12, pp. 7208–7218. DOI: 10.1021/acs.est.6b06613.

Kozhova O.M., Izmet'seva L. R. *Lake Baikal: Evolution and Biodiversity*. Leiden: Blackhuys Publishers, 1998. 447 p.

Kültz D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J. Exp. Biol.*, 2003, vol. 206, no. 18, pp. 3119-3124. DOI: 10.1242/jeb.00549.

Lindquist S., Craig E.A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Gen.*, 1988, vol. 22, no. 1, pp. 631-677. DOI: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.

Madyarova E.V., Adelshin R.V., Dimova M.D., Axenov-Gribanov D.V., Lubyaga Y.A., Timofeyev M.A. Microsporidian parasites found in the hemolymph of four Baikalian endemic amphipods. *PLoS one*, 2015, vol. 10, no. 6, pp. e0130311. DOI: 10.1371/journal.pone.0130311.

Naumenko S.A., Logacheva M.D., Popova N.V., Klepikova A.V., Penin A.A., Bazykin G.A., Etingova A.E., Mugue N.S., Kondrashov A.S., Yampolsky L.Y. Transcriptome-based phylogeny of endemic Lake Baikal amphipod species flock: fast speciation accompanied by frequent episodes of positive selection. *Mol. Ecol.*, 2017, vol. 26, no. 2, pp. 536-553. DOI: 10.1111/mec.13927.

Perrot-Minnot M.J., Kaldonski N., Cézilly F. Increased susceptibility to predation and altered anti-predator behavior in an acanthocephalan-infected amphipod. *Int. J. Parasitol.*, 2007, vol. 37, no. 6, pp. 645-651. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.12.005.

Pörtner H.O., Bock C., Mark F.C. Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *J. Exp. Biol.*, 2017, vol. 220, no. 15, pp. 2685-2696. DOI: 10.1242/jeb.134585.

Potemkina T.G., Potemkin V.L., Fedotov A.P. Climatic factors as risks of recent ecological changes in the shallow zone of Lake Baikal. *Russian Geology and Geophysics*, 2018, vol. 59, no. 5, pp. 556-565. DOI: 10.1016/j.rgg.2018.04.008.

Rivarola-Duarte L., Otto C., Jühling F., Schreiber S., Bedulina D., Jakob L., Gurkov A., Axenov-Gribanov D., Sahyoun A. H., Lucassen M., Hackermüller J., Hoffmann S., Sartoris F., Pörtner H.-O., Timofeyev M., Luckenbach T., Stadler P. F. A first glimpse at the genome of the Baikalian amphipod *Eulimnogammarus verrucosus*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 2014, vol. 322, no. 3, pp. 177-189. DOI: 10.1002/jez.b.22560.

Rodríguez E. M., Medesani D. A., Fingerman M. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 2007, vol. 146, no. 4, pp. 661–671. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.04.030.

Stillman J.H. Causes and consequences of thermal tolerance limits in rocky intertidal porcelain crabs, genus *Petrolisthes*. *Integr. Comp. Biol.*, 2002, vol. 42, no. 4, pp. 790-796. DOI: 10.1093/icb/42.4.790.

Takhteev V.V., Berezina N.A., Sidorov D.A. Checklist of the Amphipoda (Crustacea) from continental waters of Russia, with data on alien species. *Arthropoda Selecta*, 2015, vol. 24, no. 3, pp. 335-370.

Timofeyev M.A., Shatilina Z.M., Kolesnichenko A.V. et al. Specific antioxidant reactions to oxidative stress promoted by natural organic matter in two amphipod species from Lake Baikal. *Environ. Toxicol.* 2006. vol. 21, no. 2. pp. 104-110. DOI: 10.1002/tox.20161.

Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M., Moore M.V., Belykh O.I., Malnik V.V., Sakirko M.V., Shirokaya A.A., Bondarenko N.A., Domyшева V.M., Fedorova G.A., Kochetkov

A.I., Kuzmina A.V., Likhnev A.G., Medvezhonkova O.V., Nepokrytykh A.V., Pasyukova E.M., Poberezhnaya A.E., Bukshuk N.A. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *J. Great Lakes Res.*, 2016, vol. 42, no. 3, pp. 487-497. DOI: 10.1016/j.jglr.2016.02.011.

Timoshkin O.A., Moore M.V., Kulikova N.N., Tomberg I.V., Malnik V.V., Shimaraev M.N., Troitskaya E.S., Shirokaya A.A., Sinyukovich V.N., Zaitseva E.P., Domysheva V.M., Yamamuro M., Poberezhnaya A.E., Timoshkina E.M. Groundwater contamination by sewage causes benthic algal outbreaks in the littoral zone of Lake Baikal (East Siberia). *J. Great Lakes Res.*, 2018, vol. 44, no. 2, pp. 230-244. DOI: 10.1016/j.jglr.2018.01.008.

Trapp J., Armengaud J., Salvador A., Chaumot A., Geffard O. Next-generation proteomics: toward customized biomarkers for environmental biomonitoring. *Environ. Sci. Technol.*, 2014, vol. 48, no. 23, pp. 13560-13572. DOI: 10.1021/es501673s.

*Бедулина Дарья Сергеевна,*  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник, НИИ биологии  
Иркутский государственный университет,  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–30–77  
e-mail: daria.bedulina@gmail.com

*Bedulina Daria Sergeevna*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Senior Research Scientist,  
Institute of Biology  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel: 7(3952) 24–30–77  
e-mail: daria.bedulina@gmail.com

*Шатилина Жанна Михайловна*  
кандидат биологических наук,  
заведующий лабораторией, НИИ биологии  
Иркутский государственный университет,  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–30–77  
e-mail: zhshatilina@gmail.com

*Shatilina Zhanna Mikhailovna*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Head of Laboratory, Institute of Biology  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel.: 7(3952) 24–30–77  
e-mail: zhshatilina@gmail.com

*Гурков Антон Николаевич*  
научный сотрудник, НИИ биологии  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–30–77  
e-mail: a.n.gurkov@gmail.com

*Gurkov Anton Nikolaevich*  
Research Scientist, Institute of Biology  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
tel.: 7 (3952) 24–30–77  
e-mail: a.n.gurkov@gmail.com

*Лубяга Юлия Андреевна*  
младший научный сотрудник, НИИ биологии  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–30–77  
e-mail: yuliya.a.lubyaga@gmail.com

*Lubyaga Yuliya Andreevna*  
Junior Research Scientist, Institute of Biology  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel.: +7 (3952) 24–30–77  
e-mail: yuliya.a.lubyaga@gmail.com

*Верещагина Ксения Петровна*  
младший научный сотрудник, НИИ биологии  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–30–77  
e-mail: k.p.vereshagina@gmail.com

*Vereshchagina Kseniya Petrovna*  
Junior Research Scientist, Institute of Biology  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel.: 7(3952) 24–30–77  
e-mail: k.p.vereshagina@gmail.com

*Мадьярова Екатерина Валентиновна*  
младший научный сотрудник, НИИ биологии  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–30–77  
e-mail: madyarovae@gmail.com

*Mad'yarova Ekaterina Valentinovna*  
Junior Research Scientist, Institute of Biology  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel.: 7(3952) 24–30–77  
e-mail: madyarovae@gmail.com

*Аксенов-Грибанов Денис Викторович*  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник, НИИ биологии  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–30–77  
e-mail: denis.axengri@gmail.com

*Axenov-Gribanov Denis Viktorovich*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Senior Research Scientist, Institute of Biology  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel.: 7(3952) 24–30–77  
e-mail: denis.axengri@gmail.com

*Тимофеев Максим Анатольевич*  
доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией,  
директор НИИ биологии  
Иркутский государственный университет,  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–30–77  
e-mail: m.a.timofeyev.@gmail.com

*Timofeyev Maxim Anatolyevich*  
Doctor of Sciences (Biology), Head  
of Laboratory, Director of Institute of Biology  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003, Russian  
Federation  
tel.: 7(3952) 24–30–77  
e-mail: m.a.timofeyev.@gmail.com

**Дата поступления:** 14.11.2017

**Received:** 14.11.2017