



УДК 574.5; 574.2; 574.24

Температурно-зависимые изменения показателей перекисного окисления липидов у эндемичных байкальских и палеарктических амфипод и гастропод

Д. В. Аксенов-Грибанов^{1,2,3}, Ж. М. Шатилина^{2,3}, Ю. А. Лубяга^{2,3},
К. П. Верещагина¹, Д. С. Бедулина^{2,3}, Н. С. Шаханова^{1,2}, А. Н. Гурков^{1,2},
М. В. Протопопова², В. В. Павличенко², М. А. Тимофеев^{1,2,3}

¹ Иркутский государственный университет, Иркутск

² НИИ биологии, Иркутский государственный университет, Иркутск

³ Байкальский исследовательский центр, Иркутск

E-mail: denis.axengri@gmail.com

Аннотация. Целью работы являлась оценка влияния изменений температуры окружающей среды на уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) у эндемичных и палеарктических видов амфипод и гастропод. Проведено сравнение уровня диеновых конъюгатов (ДК), как первичных продуктов ПОЛ, у организмов в условиях постепенного изменения температуры среды. Показано, что в условиях повышения температуры среды происходило увеличение содержания ДК у исследованных амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf) и *Gammarus lacustris* Sars. У гастропод *Maackia herderiana* (Lind.) в условиях повышения температуры среды отмечали снижение, а у *Teratobaikalia ciliata* (Dyb.) – повышение уровня ДК. В условиях понижения температуры среды у обоих видов амфипод не отмечали изменений в уровне ДК, а у гастропод отмечали увеличение уровня ДК.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, диеновые конъюгаты, Байкал, эндемики, амфиподы, гастроподы.

Введение

Изменение температуры среды является стрессовым для большинства организмов. Одним из важных механизмов защиты клеток при воздействии температуры является поддержание гомеостаза биологических мембран. Воздействие стрессовых факторов приводит к изменению состава и нарушению структуры липидов и может способствовать развитию перекисного окисления липидов (ПОЛ) [10; 11]. Первичными продуктами ПОЛ являются диеновые конъюгаты (ДК), являющиеся токсичными метаболитами, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки и нуклеиновые кислоты [4]. Вторичными продуктами ПОЛ являются альдегиды и кетоны (малоновый диальдегид и др.). При взаимодействии диальдегидов со свободными группами мембранных соединений образуются наиболее токсичные конечные продукты ПОЛ – основания Шиффа, накопление которых дестабилизирует биологические мембраны, что приводит к деструкции клеток и тканей [12]. Таким образом, продукты ПОЛ являются общепринятыми

показателями степени стрессового воздействия на организм.

Наиболее подходящими для исследования функционально-биохимических особенностей стресс-адаптации являются организмы, которые миллионы лет эволюционировали в крайне стабильных условиях и не сталкивались с их резкими изменениями. Одним из природных очагов видообразования и стабильности является древнейшее (более 25 млн лет) пресноводное озеро Байкал. Фауна Байкала насчитывает 2 600 видов, 80 % из которых являются эндемиками [1; 2].

Целью настоящей работы являлась оценка влияния изменений температуры окружающей среды на уровень ПОЛ у эндемичных и палеарктических видов амфипод и гастропод.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись представители двух доминантных групп оз. Байкал: амфиподы (Amphipoda, Crustacea) и гастроподы (Gastropoda, Mollusca). Указанные группы организмов составляют основу биоразнообра-

зия Байкала. В озере представлены 148 видов и 24 подвида гастропод (степень эндемизма 80 %) [6] и 272 вида и 76 подвидов амфипод (степень эндемизма 99 %) [8]. Известно, что амфиподы и гастроподы населяют все типы грунтов и все глубины озера.

В работе исследованы следующие виды амфипод: эндемичный байкальский *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) и палеарктический *Gammarus lacustris* (Sars, 1863), представленный в ряде соров и бухт Байкала, а также байкальские эндемичные гастроподы *Maackia (Eubaikalia) herderiana* (Lind., 1909) и *Teratobai-kalia (Trichiobai-kalia) ciliata* (Dyb., 1875) [1].

Эндемичные байкальские амфиподы и гастроподы в большинстве стенотермны и негативно переносят изменения температуры среды обитания [7; 9], поскольку характеризуются узким диапазоном толерантности по отношению к температуре как фактору среды. Палеарктические же виды, напротив, являются

обычно эвритермными и характеризуются широкими диапазонами толерантности. Материалы, характеризующие отношение байкальских и палеарктических амфипод к температуре, представлены в работах М. А. Тимофеева [7; 9]. Согласно экспериментальным данным, для байкальских амфипод *E. verrucosus* летальное время 50 LT₅₀ при температуре 25 °С составляло 2 ч, а LT₁₀₀ – 10 ч, в то время, как для *G. lacustris* в условиях экспозиции при данной температуре LT₅₀ не была отмечена и при достижении 48 ч [9]. Отношение байкальских гастропод к повышенной температуре, как к фактору среды, исследовано в меньшей степени. По нашим экспериментальным данным, для гастропод *M. herderiana* при 25 °С LT₅₀ составляло 3 ч, а LT₁₀₀ – 36 ч. Для *T. ciliata* показатели LT₅₀ и LT₁₀₀ составляли 30 и 48 ч соответственно (рис. 1). Таким образом, исследованные виды амфипод и гастропод различаются по экологическим характеристикам.

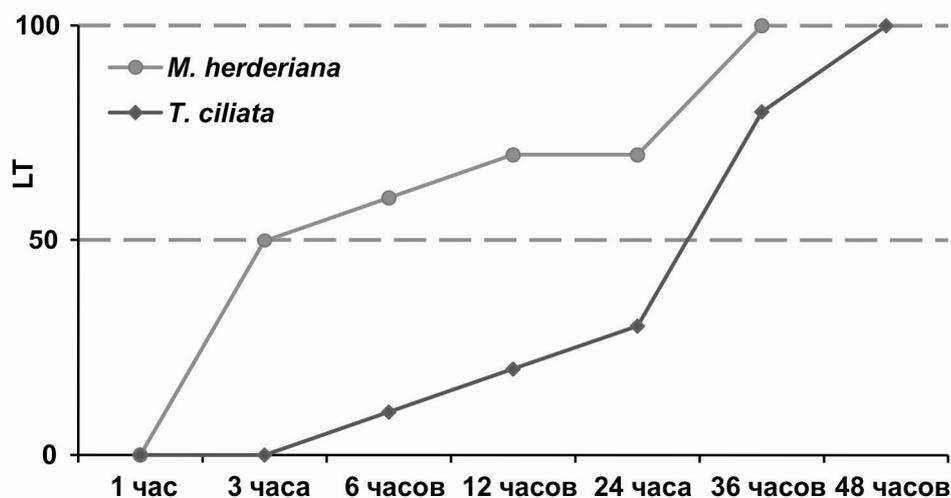


Рис. 1. Динамика гибели байкальских гастропод в условиях температурного стресса 25 °С (в %)

Байкальские амфиподы были собраны в литоральной зоне озера в районе пос. Листвянка с глубин 0–2 м с использованием гидробиологического сачка, гастроподы – с глубин 5–10 м с использованием снаряжения для глубоководных погружений. Палеарктические амфиподы и гастроподы были собраны в безымянном озере, расположенном на о. Юность в черте города Иркутска. Организмы содержались отдельно по видам в аэрируемых термостатах при температуре +6 °С в течение 3–4 суток до проведения экспериментов. До эксперимента животных кормили коммерческим кормом Tetra-min (Германия). Высокая двигательная актив-

ность, активное питание и отсутствие гибели организмов в акклимационный период позволяют предположить, что содержание в лабораторных условиях не являлось для них стрессовым. Во всех экспериментах использовали здоровых и активных особей.

Были проведены два типа экспериментов: 1) экспозиция организмов в условиях постепенного повышения температуры с 6 °С (средняя температура среды обитания, температура акклимации) до температуры, при которой отмечали гибель 100 % особей (29–31 °С); 2) экспозиция организмов в условиях постепенного понижения температуры с 6 °С до 0,5 °С. Из-

менение температуры проводили в термостате WiseCircu Wcr6 (Германия) со скоростью $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{ч}^{-1}$. В условиях постепенного понижения температуры гибели амфипод и гастропод не наблюдали. Фиксацию материалов в жидком азоте проводили при экспозиции гидробионтов в условиях постепенного повышения температуры через каждые $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 ч), а при экспозиции в условиях постепенного понижения температуры – через $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 ч). Контрольные образцы фиксировали непосредственно перед экспериментом при температуре акклимации ($6\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Определение содержания ДК проводили согласно методике И. Д. Стальной с модификациями М. А. Тимофеева [9]. Содержание ДК пересчитывали на сырой вес организмов. Измерение содержания ДК проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США) при $\lambda = 232\text{ нм}$. При расчёте содержания ДК использовали молярный коэффициент экстинкции сопряжённых двойных связей $2,2\cdot 10^{-5}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.

Все эксперименты проведены в девяти биологических параллелях. Биохимический анализ каждой пробы проведён в трёх аналитических измерениях. Проверку нормальности распреде-

ления осуществляли при помощи критерия Шапиро – Уилка. Оценку достоверности проверяли, используя двухвыборочный t -критерий Стьюдента. Статистический анализ проводили с использованием пакета Statistica 7.0. На диаграммах указаны доверительные интервалы. * – обозначены случаи достоверного отличия значений от контрольного при доверительной вероятности 0,95.

Результаты и обсуждение

Повышение температуры. Материалы по оценке изменения содержания ДК при экспозиции амфипод и гастропод в условиях постепенного повышения температуры представлены на рис. 2 и 3. Как следует из представленных материалов, у байкальского вида амфипод *E. verrucosus* было отмечено достоверное увеличение содержания ДК при повышении температуры экспозиции с 9 до $13\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего содержание ДК снижалось до контрольных значений и оставалось на этом уровне до конца эксперимента.

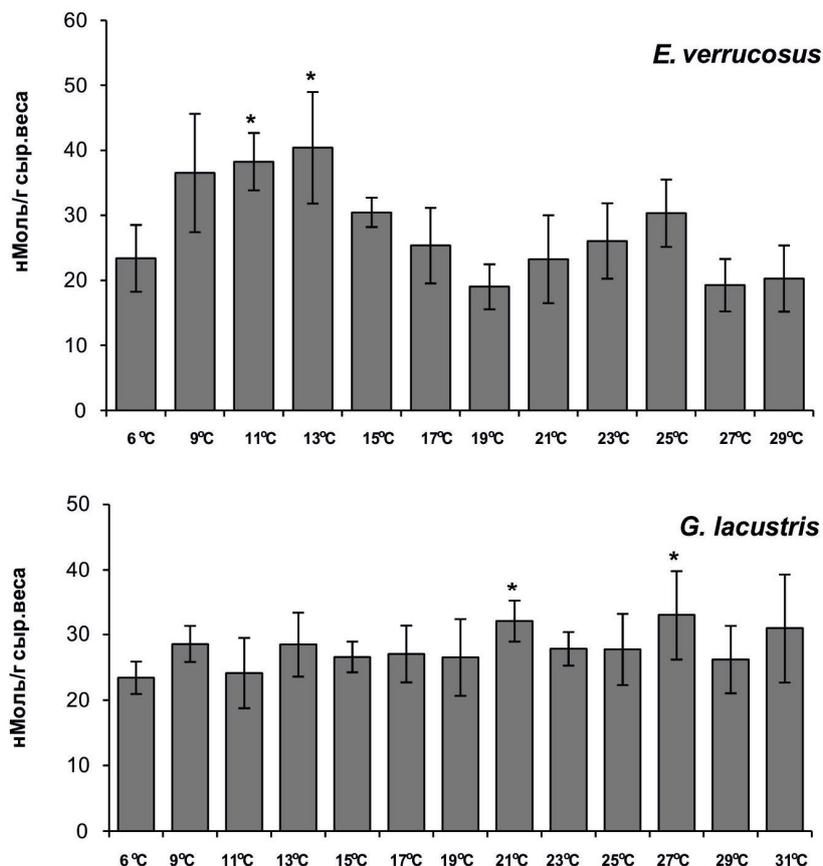


Рис. 2. Изменение содержания ДК у байкальских и палеарктических амфипод в условиях постепенного повышения температуры среды (нМоль/г с.в.)

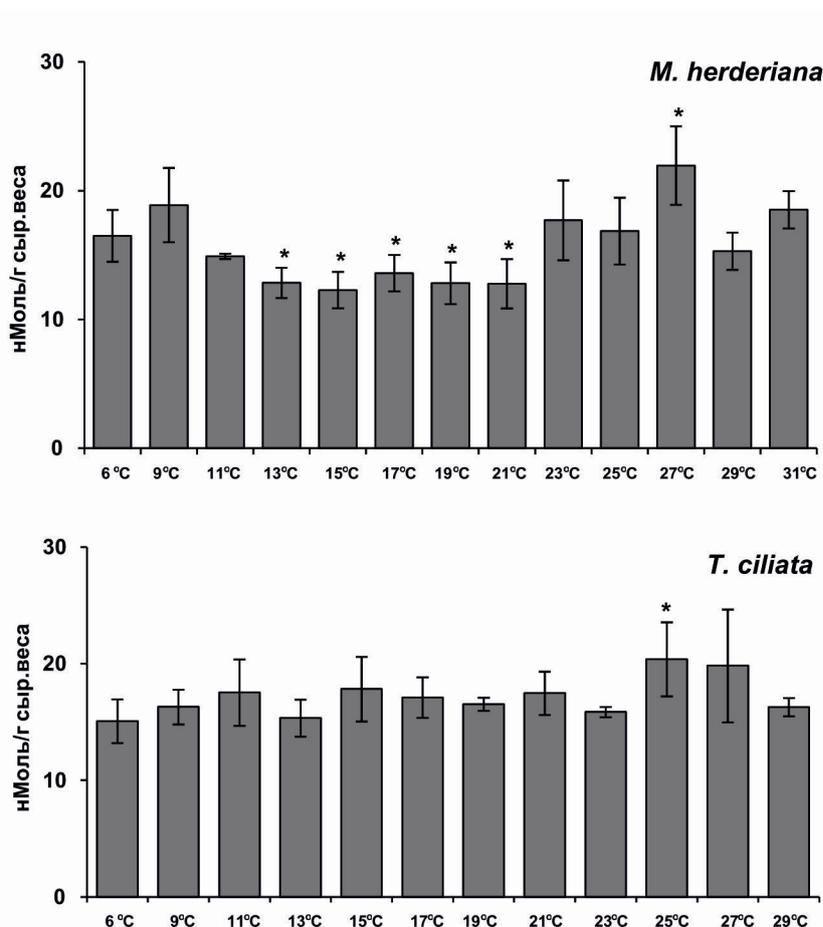


Рис. 3. Изменение содержания ДК у байкальских гастропод в условиях повышения температуры среды (нМоль/г с.в.)

Усиление ПОЛ было отмечено и у палеарктического вида амфипод *G. lacustris*, у которого достоверное увеличение содержания ДК было зафиксировано при повышении температуры экспозиции с 21–27 °С. Для гастропод, подверженных влиянию повышения температуры среды, была характерна иная картина. Так, у гастропод вида *M. herderiana* было отмечено достоверное снижение содержания ДК относительно контроля при повышении температуры экспозиции с 13 °С до 21 °С с последующим восстановлением уровня ДК до контрольных значений. У *T. ciliata*, как и у обоих исследованных видов амфипод, было показано достоверное увеличение уровня ДК относительно контроля, начинающееся с повышения температуры экспозиции выше 17 °С.

Понижение температуры. Материалы по оценке уровней ДК при экспозиции амфипод и гастропод в условиях понижения температуры среды представлены на рис. 4 и 5. Как следует

из представленных материалов, при экспозиции амфипод *E. verrucosus* и *G. lacustris* содержание ДК не отличалось от контрольного уровня в течение всего эксперимента.

У обоих видов гастропод при экспозиции в условиях понижения температуры среды наблюдали увеличение уровня ДК. При этом у *M. herderiana* данное повышение фиксировали при температуре экспозиции 5–2 °С, а у *T. ciliata* – при температуре экспозиции 5–4 °С.

Таким образом, в условиях повышения температуры среды у обоих видов амфипод было выявлено увеличение содержания ДК относительно контрольных значений. При этом степень и время начала изменения содержания ДК у видов различны. Так, у *E. verrucosus* увеличение содержания ДК отмечали уже в первые часы экспозиции, тогда как у палеарктического *G. lacustris* увеличение содержания ДК происходило на более поздних этапах эксперимента.

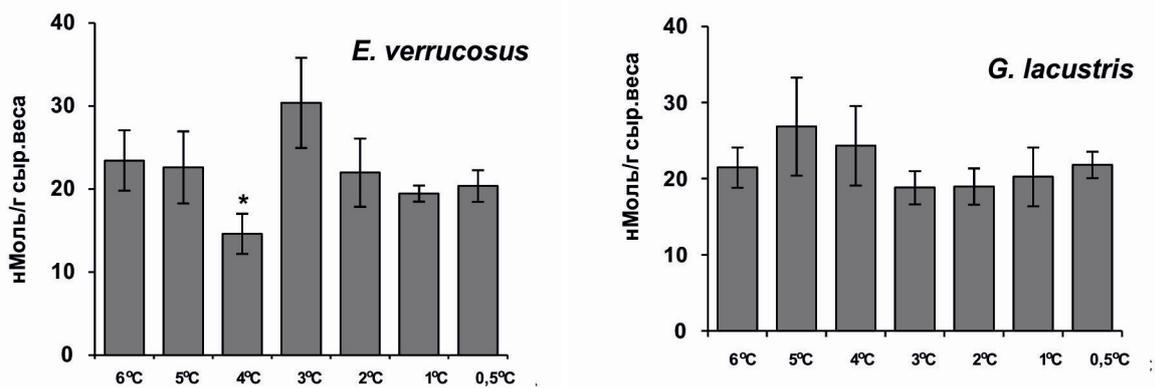


Рис. 4. Изменение содержания ДК у амфипод в условиях понижения температуры среды (нМоль/г с.в.)

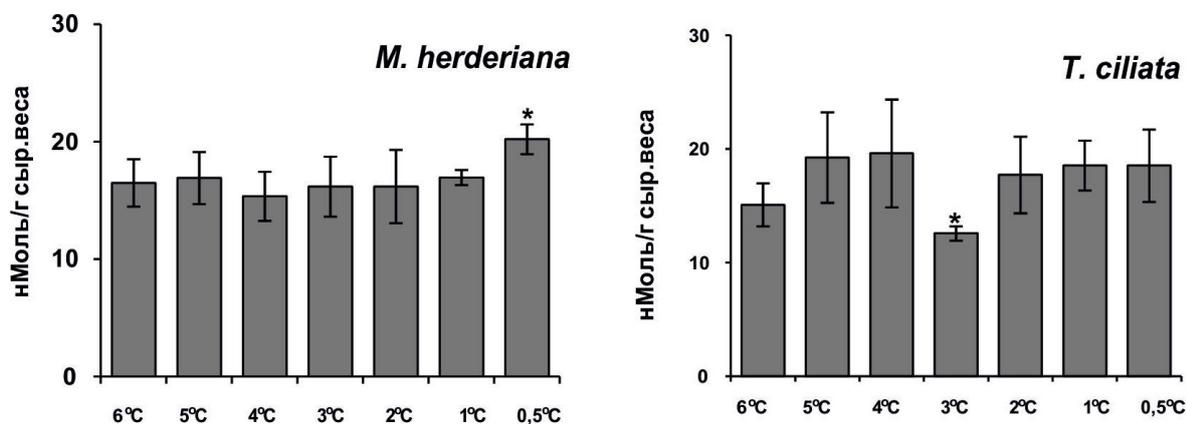


Рис. 5. Изменение содержания ДК у байкальских гастропод в условиях постепенного понижения температуры (нМоль/г с.в.)

Данные по периоду температурно-индуцированных изменений в процессах ПОЛ согласуются с известными характеристиками видов [9]. Нарастание уровня ПОЛ у термочувствительного вида *E. verrucosus* происходит раньше, чем у терморезистентного *G. lacustris*. Отсутствие изменений в уровне ПОЛ у представленных видов амфипод, экспонированных в условиях понижения температуры среды, вероятно, также связано с экологическими характеристиками видов, в частности, со способностью обоих видов к обитанию в низкотемпературном подлёдном слое [3; 5].

Реакции байкальских гастропод на изменения температуры среды различались своей направленностью. Вероятные причины данных различий связаны с разной степенью терморезистентности видов. Так, у более термочувствительного *M. herderiana* в условиях повышения температуры среды наблюдали снижение уровня ПОЛ уже около 13 °С. Вероятно, это отражает снижение общего метаболизма гастропод как первоначальную реакцию на темпе-

ратурный стресс. У более терморезистентного *T. ciliata* температурный стресс индуцировал изменение уровня ПОЛ только при температурах экспозиции выше 17° С. Повышение уровня ПОЛ при этом наблюдали до окончания эксперимента.

В нашем исследовании увеличение содержания продуктов ПОЛ отмечали у обоих видов исследуемых амфипод в условиях повышения, а у обоих видов исследуемых гастропод в условиях понижения температуры окружающей среды. Это свидетельствует о развитии окислительных процессов в клетках в результате генерации активных форм кислорода и свободных радикалов, что приводит к нарушению структурно-функционального состояния мембран [12; 13].

Заключение

Обсуждаемые результаты дают основание полагать, что у амфипод и гастропод имеются различия в характере метаболических реакций в ответ на температурные воздействия, что мо-

жет быть связано с экологическими характеристиками видов.

Исходя из литературных и вышеизложенных данных, можно констатировать, что постепенное изменение температуры среды ведёт к прогрессу процессов ПОЛ, что является свиде-

Авторский коллектив выражает благодарность водолозной группе ЛИИ СО РАН за помощь в сборе глубоководных организмов, Т. Я. Ситниковой за помощь в определении гастропод.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проектов РФФИ 11-04-00174-а, 10-04-00611, 11-04-91321-СИГ_а; CRDF 10-04092505-ИК_а, BRHE New Mini-grant Program; гранта ИГУ для поддержки аспирантов и молодых ученых 091-09-204; грантов Президента РФ МК-5466.2012.4, МД-2063.2012.4, МК-4772.2011.4; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»; DAAD-М. Ломоносов 2012–2013 (10.51.2011).

Литература

1. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна / О. А. Тимошкин [и др.]. – Новосибирск : Наука, 2004. – 1679 с.
2. Байкаловедение : учеб. пособие / Н. С. Беркин [и др.]. – Иркутск : Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2009. – 291 с.
3. Бекман М. Ю. Биология *Gammarus lacustris* Sars в прибайкальских озёрах / М. Ю. Бекман // Тр. Байкал. лимнол. станции АН СССР. – 1954. – Т. 14. – С. 268–311.
4. Бурлакова Е. Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова // Успехи химии. – 1985. – Т. 54, вып. 9. – С. 1540–1558.
5. Лед – хранитель жизни / Н. А. Бондаренко [и др.] // Наука из первых рук. – Новосибирск, 2004. – № 1. – С. 76–83.
6. Ситникова Т. Я. Переднежаберные брюхоногие моллюски (Gastropoda: Prosobranchia) Байкала: морфология, таксономия, биология, формирование фауны : автореф. дис. д-ра биол. наук / Т. Я. Ситникова. – СПб. : ЗИН РАН, 2004. – 47 с.
7. Сравнительная оценка особенностей анаэробного метаболизма у байкальских амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf.), *E. cyaneus* (Dyb.) и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars / М. А. Тимофеев [и др.] // Сиб. экол. журн. – 2006. – № 6. – С. 733–739
8. Тахтеев В. В. Очерки о бокоплавах озера Байкал (систематика, сравнительная экология, эволюция) / В. В. Тахтеев. – Иркутск : ИГУ, 2000. – 355 с.
9. Тимофеев М. А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод : дис. ... д-ра биол. наук : 03.02.08 / М. А. Тимофеев ; ТГУ. – Томск, 2010. – 384 с.
10. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – М. : Мир, 1988. – 568 с.
11. Хочачка П. Стратегия биохимической адаптации / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – М. : Мир, 1977. – 398 с.
12. Crockett E. L. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review / E. L. Crockett // J. Comp Physiol. – 2008. – Vol. 178. – P.795–809.

Temperature induced changes of lipid peroxidation processes in Baikal endemic and Palearctic amphipods and gastropods

D. V. Axenov-Gribanov^{1,2,3}, Zh. M. Shatilina^{1,2,3}, J. A. Lubyaga^{1,2,3},
K. P. Vereshagina^{1,3}, D. S. Bedulina^{1,2,3}, N. S. Shachtanova^{1,2,3}, A. N. Gurkov^{1,2,3},
M. V. Protopopova^{1,3}, V. V. Pavlichenko^{1,3}, M. A. Timofeyev^{1,2,3}

¹ Irkutsk State University, Irkutsk

² Research institute for Biology, Irkutsk State University, Irkutsk

³ Baikal Research Centre, Irkutsk

Abstract. The aim of present study was an evaluation of lipid peroxidation processes under temperature changes in Baikal endemic and Palearctic amphipods and gastropods species. It was compared diene conjugates level, as primary products of lipid peroxidation in organisms in conditions of gradual increase and decrease temperature. Elevation of diene conjugates level was showed under gradual temperature increase in both amphipods species: *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf), *Gammarus lacustris* Sars. Elevation of diene conjugates level under gradual temperature increase was showed for *Teratobaikalia ciliata* (Dyb.). In other gastropod species – *Maackia herderiana* (Lind.) was observed decrease of diene conjugates content. Under gradual temperature decrease, elevation of diene

conjugates level was increased in both mollusks species. Exposition of amphipods didn't lead to changes in lipid peroxidation.

Key words: lipid peroxidation, diene conjugates, Baikal, endemics, Amphipods, Gastropods.

Аксёнов-Грибанов Денис Викторович
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
аспирант
тел. (395 2) 24–30–77
E-mail: denis.axengri@gmail.com

Axenov-Gribanov Denis Victorovich
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
doctoral student
phone: (3952) 24–30–77
E-mail: denis.axengri@gmail.com

Шатилина Жанна Михайловна
Научно-исследовательский институт биологии
при Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3
кандидат биологических наук
ведущий научный сотрудник
тел. (3952) 24–30–77, факс (3952) 20–12–19
E-mail: zhshatilina@gmail.com

Shatilina Zhanna Mikhailovna
Research Institute for Biology
Irkutsk State University
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
Ph. D. in Biology, leading research scientist
phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 20–12–19
E-mail: zhshatilina@gmail.com

Лубяга Юлия Андреевна
Научно-исследовательский институт биологии
при Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3
младший научный сотрудник
тел. (3952) 24–30–77, факс (3952) 20–12–19
E-mail: yuliya.a.lubyaga@gmail.com

Lubyaga Julia Andreevna
Research Institute for Biology
Irkutsk State University
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
junior research scientist
phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 20–12–19
E-mail: yuliya.a.lubyaga@gmail.com

Верещагина Ксения Петровна
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
студент
тел. (395 2) 24–30–77
E-mail: k.p.vereshagina@gmail.com

Vereshagina Kseniya Petrovna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
student
phone: (3952) 24–30–77
E-mail: k.p.vereshagina@gmail.com

Бедулина Дарья Сергеевна
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3
старший научный сотрудник
тел. (3952) 24–30–77, факс (3952) 20–12–19
E-mail: daria.bedulina@gmail.com

Bedulina Darya Sergeevna
Research Institute for Biology
Irkutsk State University
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
senior research scientist
phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 20–12–19
E-mail: daria.bedulina@gmail.com

Шахтанова Надежда Сергеевна
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
студент
тел. (395 2) 24–30–77
E-mail: n.shahtanova@gmail.com

Shachtanova Nadezhda Sergeevna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
student
phone: (3952) 24–30–77
E-mail: n.shahtanova@gmail.com

Гурков Антон Николаевич
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
студент
тел. (395 2) 24–30–77
E-mail: a.n.gurkov@gmail.com

Gurkov Anton Nicolaevich
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
student
phone: (3952) 24–30–77
E-mail: a.n.gurkov@gmail.com

Протопопова Марина Владимировна
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3
старший научный сотрудник
тел. (3952) 24–30–77, факс (3952) 20–12–19
E-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Protopopova Marina Vladimirovna
Research Institute for Biology
Irkutsk State University
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
senior research scientist
phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 20–12–19
E-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Павличенко Василий Валерьевич
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3
научный сотрудник
тел. (3952) 24–30–77, факс (3952) 20–12–19
E-mail: vpavlichenko@gmail.com

Pavlichenko Vasilij Valerievich
Research Institute for Biology
Irkutsk State University
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
research scientist
phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 20–12–19
E-mail: vpavlichenko@gmail.com

Тимофеев Максим Анатольевич
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3
доктор биологических наук, зав. лабораторией
тел. (395 2) 24–30–77, факс (395 2) 20–12–19
E-mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Timoveyev Maxim Anatolyevich
Research Institute for Biology
Irkutsk State University
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
D. Sc. of Biology, Head of laboratory
phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 20–12–19
E-mail: m.a.timofeyev@gmail.com