



УДК 574.5; 591,05; 592

Вестерн-иммуоблоттинг белков теплового шока у пресноводных гастропод и амфипод, экспонированных в растворах нефти

М. А. Тимофеев^{1,2}, Д. В. Лозовой¹, Д. С. Потапов¹, Ж. М. Шатилина^{1,2},
Е. А. Сапожникова², Д. В. Аксенов-Грибанов¹, В. В. Павличенко¹

¹Иркутский государственный университет, Иркутск

²Байкальский исследовательский центр, Иркутск

E-mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Аннотация. Целью настоящего исследования являлась оценка степени влияния водорастворимых компонентов нефти на синтез белков теплового шока семейства БТШ70 у видов, типичных представителей водоемов Байкальской Сибири, с использованием метода вестерн-иммуоблоттинга. В качестве объектов исследования были выбраны пресноводные амфиподы (Amphipoda, Crustacea): палеарктический *Gammarus lacustris* Sars, и байкальский эндемик *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf), а также гастроподы (Gastropoda, Mollusca): палеарктический вид *Limnea auricularia* (Lin) и байкальский *Maakia herderiana* (Lind). Показано, что водорастворимые фракции нефти оказывают существенное влияние на содержание БТШ70 у исследованных организмов. При этом у амфипод отмечено снижение, а у моллюсков увеличение уровня содержания БТШ70.

Ключевые слова: Байкал, нефтепродукты, загрязнение, углеводороды, БТШ, амфиподы, моллюски.

Углеводородное загрязнение стало ведущим фактором антропогенного воздействия на водные экосистемы. Нефть и нефтепродукты являются одними из основных веществ, загрязняющих водоемы. Они поступают в водоемы, как естественным путем, так и в результате промышленной переработки нефти. Повышенное содержание углеводородов природного и антропогенного происхождения в водной среде может оказывать значительное влияние на гидробионтов.

Известно, что накопление устойчивых к биологическому разложению компонентов нефтяных углеводородов в наибольшей степени концентрируется в донных отложениях [2]. Низкая температура воды существенно снижает скорость деградации углеводородов и снижает уровень биохимических процессов, связанных с деструкцией и трансформацией токсикантов, что способствует накоплению в донных отложениях и придонном слое токсичных для гидробионтов веществ. Видовое разнообразие, численность, биомасса донных организмов зависят от физического и химического состава донных отложений. Поэтому именно донные сообщества, имеющие длительный цикл развития, являются индикаторами качест-

ва среды обитания, и наиболее всесторонне отражают изменения, происходящие в водоеме при нефтяном загрязнении.

К сожалению, на сегодняшний день работы о влиянии углеводородов на видах, обитателей водоемов Байкальской Сибири, носят единичный характер. Имеются материалы о сравнительной токсикорезистентности байкальской эпишуры и дафний к некоторым нефтепродуктам в острых опытах [6] и рассмотрена возможность использования байкальской эпишуры в качестве биологического индикатора нефтяного загрязнения [5]. Полученные данные касаются только планктонных организмов и не затрагивают бентосные сообщества, которые сталкиваются с накоплением токсичных веществ в первую очередь.

Таким образом, вопрос о взаимодействии видов водоемов Байкальской Сибири и нефтяных углеводородов остается практически неизученным. Не известны ни степень чувствительности и устойчивости организмов к углеводородам, ни характер влияния этих изменений на физиологические и биохимические процессы в организмах эндемиков. Не оценены возможные последствия функциональных сдвигов в механизмах стресс-адаптации и рези-

стентности. Отсутствуют данные и о функциональных показателях у гидробионтов, с помощью которых можно получить ответную реакцию при минимальном изменении качества воды в результате наличия нефтяных углеводородов.

Важно изучать токсическое воздействие нефти с помощью биохимических методов, так как они позволяют заметить изменения клеточных реакций уже на ранних стадиях воздействия, наступающие, как правило, до появления физиологических, морфологических и других изменений. В отечественной и мировой науке проводятся работы по оценке влияния нефти и нефтепродуктов на устойчивость водорастворимых сывороточных и тканевых белков [3], активность различных ферментов [1; 7; 8], а также нарушение ДНК [9; 10].

Целью настоящего исследования являлась оценка степени влияния водорастворимых компонентов нефти на синтез белков теплового шока семейства БТШ70 у видов, типичных представителей водоемов Байкальской Сибири, с использованием метода вестерн-иммуноблоттинга.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны пресноводные амфиподы (Amphipoda, Crustacea): обитатель большинства прибайкальских водоемов, палеарктический вид *Gammarus lacustris* Sars, и байкальский эндемик *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf), а также гастроподы (Gastropoda, Mollusca): палеарктический вид *Limnea auricularia* (Lin) и байкальский *Maakia herderiana* (Lind).

Палеарктический *G. lacustris* является типичным обитателем мелководных континентальных водоемов с широким спектром условий среды. *E. verrucosus* – представитель эндемичной фауны амфипод оз. Байкал, проникший в реки Ангара, Енисей. *L. auricularia* – европейско-сибирский вид, обитает в прибрежной зоне, как в проточной воде, так и в заболоченных участках, *M. herderiana* – эндемик оз. Байкал, обитает на каменистых грунтах.

Животных предварительно акклимировали раздельно по видам, *E. verrucosus*, *G. lacustris* и *M. herderiana* при температуре 6–8 °С, *L. auricularia* при температуре 22–23 °С в течение 3 суток перед экспериментом. У животных отмечали высокую двигательную активность, таким образом, по нашему мнению, данные условия содержания не являлись для них стрессовыми.

Экспонирование (длительностью до двух суток) проводили при температурах, соответствующих температурам акклимации, в растворах нефти (месторождение Марковское, Иркутская область) с концентрацией 10 мл/л. После экспериментов рачки и моллюски были заморожены жидким азотом. Отбор образцов для биохимического анализа проводили из недифференцированных тканей.

В работе оценивали уровень синтеза белка теплового шока БТШ70. Суммарный белок выделяли в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 7,6). Гомогенат центрифугировали 15 мин при 7000 g, осадок растворяли в буфере для образца (рН 6,8), содержащем 1 мМ ЭДТА, 1 % ДДС-Na, 20 % глицерин, 5 % β-меркаптоэтанол, 0,001 % бромфеноловый синий. Полученные белковые пробы хранили при температуре 20 °С. Количество белка в пробах определяли по методу Лоури при длине волны 750 нм. Определение характера синтеза БТШ70 проводили, используя стандартный метод денатурирующего электрофореза с ДДС-Na в 12,5 % полиакриламидном геле, с последующим Вестерн-блоттингом с антителами к БТШ70 (monoclonal anti-heat shock protein 70 clone BRM-22, Sigma Chemical Co). Полуколичественный анализ содержания белка на мембранах проводили с помощью программы Gel Explorer.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования у палеарктических амфипод *G. lacustris* обнаружен конститутивный синтез белка семейства БТШ70 с молекулярной массой 66,2 кДа. Уже через 1 ч экспозиции наблюдали снижение уровня данного белка. Далее, по ходу эксперимента, отмечали увеличение содержания исследуемого белка, которое, однако, оставалось ниже контрольного уровня. К окончанию эксперимента (2-е сут.) содержание БТШ70 находилось на минимальном уровне. У байкальских амфипод *E. verrucosus* обнаружен конститутивный синтез белка семейства БТШ70 с молекулярной массой 70 кДа. Снижение уровня БТШ70 относительно контрольного уровня, так же как и у предыдущего вида, наблюдали уже через 1 ч экспозиции. Минимального значения содержание исследуемого белка достигло к окончанию эксперимента (2-е сут.). У европейско-сибирских моллюсков *L. auricularia* отмечен конститутивный синтез белков семейства БТШ70 с молекулярной массой около 75 кДа. Уже через 1 ч экспозиции наблюдали многократное увеличение содержания БТШ70, по-

вышенный уровень содержания исследуемого белка отмечали и через 1 с эксперимента. К концу эксперимента (2-е сут.) происходило многократное снижение содержания БТШ70, до показателей близких к контрольному содержанию. У эндемичных байкальских моллюсков *M. herderiana* обнаружен конститутивный синтез белков семейства БТШ70 с молекулярной массой около 75 кДа. При экспозиции моллюсков в растворах с водорастворимой фракцией нефти происходило незначительное увеличение БТШ70.

Таким образом, показано, что водорастворимые фракции нефти оказывают существенное влияние на содержание БТШ70 у исследованных организмов. При этом у амфипод отмечено снижение, а у моллюсков увеличение уровня содержания БТШ70.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (проект РНП 2.2.1.1.7334), и грантами РФФИ №№ 06-04-48099-а, 08-04-00928-а, 08-04-10065-к.

Литература

1. Бабаев Х. Ф. Влияние сырой нефти на накопление продуктов перекисного окисления липидов и изменения активности АТФазных ферментов в тканях мышц карпа (*Cyprinus carpio* L.) / Х. Ф. Бабаев, М. И. Джабаров // Современные проблемы биологических ресурсов Каспийского моря. – 2003. – С. 104–108.
2. Воробьев Д. С. Влияние нефти и нефтепродуктов на макрозообентос / Д. С. Воробьев // Изв. Томск. политехн. ун-та. – 2006. – Т. 309, № 3. – С. 42–45.
3. Каниева Н. А. Оценка влияния каспийской нефти на метаболизм карповых рыб / Н. А. Каниева // Успехи соврем. естествознания. – 2003. – № 3. – С. 68–69.
4. Саксонов М. Н. Гидробионты как индикаторы нефтяного загрязнения / М. Н. Саксонов [и др.] // Экосистемы и природные ресурсы горных стран. – Новосибирск: Наука, 2004. – С. 315–319.
5. Саксонов М. Н. Метод люминесцентной микроскопии в определении накопления нефтепродуктов эпишурой и биоиндикации загрязнения / М. Н. Саксонов, А. Э. Балаян, Д. И. Стом // Водные ресурсы. – 2001. – Т. 28, № 6. – С. 752–755.
6. Стом Д. И. Поглощение эпишурой водонерастворимых ксенобиотиков / Д. И. Стом [и др.] // Водные ресурсы. – 1999. – Т. 26, № 2. – С. 202–205.
7. Cohen A. Alterations of metabolic enzymes in Australian bass, *Macquaria novemaculeata*, after exposure to petroleum hydrocarbons / A. Cohen, M. M. Gagnon, D. Nugegoda // Arch. Environ. Contam. and Toxicol. – 2005. – № 2, Vol. 49. – P. 200–205.
8. King S. C. Summary results from a pilot study conducted around an oil production platform on the Northwest Shelf of Australia / S. C. King [et al.] // Mar. Pollut. Bull. – 2005. – № 11, Vol. 50. – P. 1163–1172.
9. Lemiere S. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill / S. Lemiere [et al.] // Mutat. Res. Genet. Toxicol. and Environ. Mutagen. – 2005. – № 1–2. – Vol. 581. – P. 11–21.
10. Nagy E. DNA adduct formation and physiological effects from crude oil distillate and its derived base oil in isolated, perfused rat liver / E. Nagy [et al.] // Arch. Toxicol. – 2004. – № 2, Vol. 78. – P. 114–121.

Western-blotting of heat shock proteins at fresh-water gastropods and amphipods exposed at the oil solutions

М. А. Timofeyev^{1,2}, D. V. Lozovoy¹, D. S. Potapov¹, Z. M. Shatilina^{1,2},
E. A. Sapozhnikova², D. V. Aksenov-Gribanov¹, V. V. Pavlichenko¹

¹ Irkutsk State University, Irkutsk

² Baikalian Research Centre, Irkutsk

Abstract. The purpose of the present research was the estimation of a degree of influence of water-soluble components of oil on HSP synthesis from the HSP70 family at the species which are typical representative in the Baikal Siberia, with use of a method a western-blotting. As objects of research have been chosen fresh-water amphipods (Amphipoda, Crustacea): paleartic *Gammarus lacustris* Sars, and the endemic of Lake Baikal *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf), and also gastropods (Gastropoda, Mollusca): paleartic species *Limnea auricularia* (Lin) and Baikal endemic *Maakia herderiana* (Lind). It is shown, that water-soluble fractions of oil render essential influence on maintenance of HSP70 at the investigated organisms. Thus in amphipods decrease, and in molluscs increase in a level of maintenance of HSP70 is noted.

Key words: Baikal, oil products, pollution, hydrocarbons, HSP, amphipods, mollusks.

Тимофеев Максим Анатольевич
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, Ленина, 3
кандидат биологических наук
зав. лабораторией проблем адаптации биосистем
директор АНО «Байкальский исследовательский
центр»
тел. (395 2) 60-08-93, факс (395 2) 20-12-19
E-mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Timofeyev Maksim Anatolyevitch
Irkutsk State University
664003, Irkutsk, 3, Lenin St.
Ph. D. in Biology, Research Institute for Biology,
Head of Laboratory of Biosystem Adaptation
Director of Baikalian Research Centre
phone: (395 2) 60-08-93, fax: (395 2) 20-12-19
E-mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Лозовой Дмитрий Викторович
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, Ленина, 3
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник лаборатории проблем
адаптации биосистем
тел. (395 2) 60-08-93, факс (395 2) 20-12-19

Lozovoy Dmitri Viktorovitch
Irkutsk State University
664003, Irkutsk, 3, Lenin St.
Ph. D. in Biology, Research Institute for Biology,
senior research scientist, Laboratory of Biosystem
Adaptation
phone: (395 2) 60-08-93, fax: (395 2) 20-12-19

Шатилина Жанна Михайловна
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, Ленина, 3
кандидат биологических наук
научный сотрудник лаборатории
проблем адаптации биосистем
тел. (395 2) 60-08-93, факс (395 2) 20-12-19

Shatilina Zhana Mikhailovna
Irkutsk State University
664003, Irkutsk, 3, Lenin St.
Ph. D. in Biology, Research Institute for Biol-
ogy, research scientist, Laboratory
of Biosystem Adaptation
phone: (395 2) 60-08-93, fax: (395 2) 20-12-19

Потапов Денис Сергеевич
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, Ленина, 3
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник лаборатории проблем
адаптации биосистем
тел. (395 2) 60-08-93, факс (395 2) 20-12-19

Potapov Denis Sergeevitch
Irkutsk State University
664003, Irkutsk, 3, Lenin St.
Ph. D. in Biology, Research Institute for Biology,
senior research scientist, Laboratory of Biosystem
Adaptation
phone: (395 2) 60-08-93, fax: (395 2) 20-12-19

Сапожникова Елена Сергеевна
Научно-исследовательский институт биологии при
Иркутском государственном университете
664003, г. Иркутск, Ленина, 3
сотрудник лаборатории проблем адаптации биосистем
тел. (395 2) 60-08-93, факс (395 2) 20-12-19

Sapozhnikova Elena Sergeevna
Irkutsk State University
664003, Irkutsk, 3, Lenin St.
Ph. D. in Biology, Research Institute for Biology,
research scientist, Laboratory of Biosystem Adaptation
phone: (395 2) 60-08-93, fax: (395 2) 20-12-19

Аксенов-Грибанов Денис Викторович
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, Ленина, 3
студент
тел. (395 2) 60-08-93, факс (395 2) 20-12-19

Aksenov-Gribanov Denis Viktorovitch
Irkutsk State University
664003, Irkutsk, 3, Lenin St.
student
phone: (395 2) 60-08-93, fax: (395 2) 20-12-19

Павличенко Василий Валерьевич
Иркутский государственный факультет аспирант
664003, г. Иркутск, Ленина, 3
тел. (395 2) 60-08-93, факс (395 2) 20-12-19

Pavlichenko Vasili Valeryevitch
Irkutsk State University
664003, Irkutsk, 3, Lenin St.
doctoral student
phone: (395 2) 60-08-93, fax: (395 2) 20-12-19