

На правах рукописи



ВЕРЕЩАГИНА КСЕНИЯ ПЕТРОВНА

**ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ХОЛОДОВОЙ И ТЕПЛОВОЙ АККЛИМАЦИИ НА
НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ СТРЕСС-ОТВЕТ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ
МЕТАБОЛИЗМ БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ И ГОЛАРКТИЧЕСКИХ
АМФИПОД**

Специальность 03.02.10 – гидробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Борок – 2020

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте биологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Иркутский государственный университет», г. Иркутск.

Научный руководитель:

Тимофеев Максим Анатольевич,
доктор биологических наук, директор научно-исследовательского института биологии ФГБОУ ВО «ИГУ», заведующий лабораторией «Проблемы адаптации биосистем», профессор кафедры гидробиологии и зоологии беспозвоночных Биолого-почвенного факультета (ФГБОУ ВО «ИГУ», г. Иркутск).

Официальные оппоненты:

Березина Надежда Александровна,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории пресноводной и экспериментальной гидробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук (ФГБУН ЗИН РАН, г. Санкт-Петербург).

Кособокова Ксения Николаевна,
доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологии планктона Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт океанологии им. П.П. Ширшова Российской академии наук (ФГБУН ИО РАН, г. Москва).

Ведущая организация:

Институт водных проблем Севера, обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ИВПС КарНЦ РАН, г. Петрозаводск).

Защита состоится « » 2020 года в часов на заседании диссертационного совета Д 002.036.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН по адресу: 152742, Ярославская область, Некоузский район, п. Борок, д. 109. Тел.: +7 (48547)24042, e-mail: dissovet@ibiw.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук по адресу: 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, д. 109 и на сайте <http://www.ibiw.ru>, с авторефератом – в сети Интернет на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru/>) и ИБВВ РАН (<http://www.ibiw.ru/>).

Автореферат разослан « » 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Л. Г. Корнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Температура является одним из важнейших факторов окружающей среды, который влияет на все водные организмы. Изменения температуры среды обитания могут происходить в широких временных рамках – от ежедневных периодических циклов до крупномасштабных флуктуаций в течение многих лет, вызванных климатическими изменениями (Pörtner et al., 2006; Fokina et al., 2015).

Большинство пресноводных организмов являются пойкилотермными. Температура их тела и процессы метаболизма напрямую зависят от температуры окружающей среды. Данная зависимость делает организмы чрезвычайно чувствительными к одному из важнейших эффектов изменения климата – повышенной изменчивости температурного режима (Scheffer et al., 2001; Pörtner et al., 2006).

Виды с более пластичными механизмами адаптации к стрессовым условиям способны вытеснять менее адаптированные виды, и поэтому изменения окружающей среды могут предоставлять для первых дополнительные конкурентные преимущества (Курашов и др., 2012). В связи с этим, инвазивные виды могут активно вытеснять популяции аборигенных видов, особенно в регионах, которые подвержены существенной антропогенной нагрузке (Гладышев, Москвичева, 2002; Grabowski et al., 2007). Это может приводить к значительному сдвигу в соотношении видов и критическим последствиям для водных экосистем (Scheffer et al., 2001). Наиболее распространенная пресноводная фауна обычно представлена космополитными видами с широкими пределами толерантности и высокой фенотипической пластичностью. Напротив, экосистемы древних водоемов в большинстве своем населены высокоспециализированными видами, зачастую являющимися эндемиками (Albrecht et al., 2013). Эндемичные виды узко адаптированы к специфическим условиям окружающей среды обитания. Такие виды особенно чувствительны к негативным эффектам изменений климата (Тимофеев, 2010). Исследования физиологических механизмов формирования устойчивости к температуре критически важны для понимания и предсказания влияния глобальных климатических изменений на экосистемы (Немова и др., 2014; Pörtner, 2008; Sokolova et al., 2012).

Озеро Байкал является одним из ярких примеров древнейших озер с разнообразнейшей и в то же время потенциально уязвимой флорой и фауной, которая может быть подвержена влиянию климатических изменений. Возраст озера насчитывает 25-30 миллионов лет (Romanova et al., 2016). Байкал характеризуется высоким биоразнообразием (около 2595 видов животных), большой долей эндемичных видов (порядка 80%), а также считается одним из самых известных и важных центров видообразования среди пресноводных экосистем (Тимошкин и др., 2004). Байкальские организмы эволюционировали в течение долгого времени в условиях относительно низких температур, высокого уровня кислорода и минимальной антропогенной нагрузки. Благодаря этому в озере сформировалась высокоспециализированная фауна и флора. Сообщество Байкала характеризуется уникальным свойством, названным феноменом несмешиваемости. Несмешиваемость отражает длительную эволюционную историю фауны, изолированной от других водоемов, и характеризуется ограничением проникновения голарктических и

палеарктических видов в озеро Байкал, а также ограничивает распространение байкальских видов за пределы озера (Тимошкин, 2001). Предполагается, что в связи с длительным изолированным процессом эволюции озера у байкальских видов сформировались высокоспециализированные механизмы адаптации к окружающей среде. Такие механизмы позволили им эффективно сдерживать конкуренцию голарктических видов, которые хоть и являются убиквистами, но в то же время менее приспособлены именно к байкальским условиям. Изменения климата могут повлечь за собой изменение температурного режима водоема, и, как следствие, стать причиной размытия барьера несмешиваемости. Это может привести к усилению интродукции голарктических видов в озеро Байкал, особенно обладающих высоким уровнем резистентности к критическим температурам.

Таким образом, *целью* исследования являлось изучение адаптивного потенциала байкальских эндемичных амфипод видов *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstfeld, 1858) и *Eulimnogammarus cyaneus* (Dybowsky, 1874), а также потенциального вида-вселенца *Gammarus lacustris* Sars, 1863 на клеточном уровне в условиях холодной и тепловой акклимации.

Согласно основной гипотезе диссертационного исследования, стенотермные холодолюбивые байкальские эндемичные амфиподы обладают комплексом биохимических адаптаций, которые позволяют им противостоять вселению чужеродных видов благодаря поддержанию высокой физиологической активности в зимние месяцы. Напротив, потенциальные вселенцы в условиях низких температур не способны полноценно функционировать. Изменение температурного режима озера в ходе изменения климата может существенно отразиться на адаптивных способностях байкальских эндемиков, повлиять на их жизненные циклы и структуру сообществ. Это, в свою очередь, может снизить их конкурентные способности, увеличить риск вселения видов-убиквистов и, как следствие, привести к трансформации экосистемы озера.

Для проверки предлагаемой гипотезы были выбраны два байкальских доминантных вида амфипод – *E. verrucosus* и *E. cyaneus*, которые имеют ключевое значение в литоральных сообществах оз. Байкал, а также потенциальный вселенец – голарктический вид *G. lacustris*.

Задачи исследования:

1. Оценить выживаемость байкальских эндемичных амфипод видов *E. verrucosus* и *E. cyaneus*, а также потенциального вида-вселенца голарктического *G. lacustris*, в условиях различных температур (отличных от предпочитаемых, а также отличных от среднегодовой температуры литорали оз. Байкал);
2. Выявить влияние длительной акклимации к повышенным и пониженным температурам (относительно предпочитаемых для каждого вида, а также относительно среднегодовой температуры литорали оз. Байкал) на активность ферментов антиоксидантной системы (каталазы, пероксидазы и глутатион S-трансферазы) у байкальских эндемичных видов амфипод *E. verrucosus*, *E. cyaneus* и голарктического *G. lacustris*;
3. Выявить влияние длительной акклимации к повышенным и пониженным температурам (относительно предпочитаемой для каждого вида) на эффективность энергетического обмена у байкальских эндемичных видов амфипод *E. verrucosus*, *E. cyaneus* и голарктического *G. lacustris* по изменению содержания глюкозы,

гликогена, аденозинтрифосфорной кислоты и лактата, а также активности лактатдегидрогеназы, цитохромоксидазы и цитратсинтазы;

4. Оценить влияние длительной акклимации к повышенным и пониженным температурам (относительно среднегодовой температуры литорали оз. Байкал) на эффективность энергетического обмена у байкальских эндемичных видов амфипод *E. verrucosus*, *E. cyaneus* и голарктического *G. lacustris* по изменению содержания лактата, а также активности лактатдегидрогеназы, цитохромоксидазы и цитратсинтазы;

5. Оценить потенциальные акклимационные возможности байкальских эндемичных *E. verrucosus* и *E. cyaneus*, а также голарктического *G. lacustris* в условиях изменения температуры среды на основе различий в биохимических адаптациях;

6. Выявить межвидовые вариации адаптивных стратегий биохимической холодной адаптации для подтверждения или опровержения гипотезы о преимуществах байкальских холодолюбивых видов и возможности вытеснения байкальских эндемиков голарктическим видом в случае повышения температуры среды.

Научная новизна. Впервые получены данные об особенностях функционирования механизмов неспецифического стресс-ответа и энергетического метаболизма в условиях длительной тепловой и холодной акклимации байкальских эндемичных видов амфипод *E. verrucosus* и *E. cyaneus*, а также потенциального вида-вселенца – голарктического *G. lacustris*. В рамках диссертационного исследования разработана и впервые применена новая экспериментальная модель для оценки механизмов стресс-адаптации у байкальских эндемичных и голарктических видов амфипод. Впервые установлено наличие специфических биохимических адаптаций байкальских эндемичных амфипод вида *E. verrucosus* к низким температурам. Показано, что низкие температуры оказывают значимый эффект на механизмы неспецифического стресс-ответа и энергетического метаболизма у потенциального инвазивного вида *G. lacustris*.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые данные о биохимических механизмах стресс-адаптации и связанных с ними экологических стратегиях доминантных байкальских видов амфипод и их потенциального голарктического конкурента. Результаты исследования имеют как теоретическую значимость (особенно для понимания главных направлений адаптаций и метаболической компенсации водных организмов в изменяющихся условиях окружающей среды), так и практическую (для прогнозирования влияния изменения температуры на водные экосистемы). Полученные данные позволяют предположить, что пониженная температура может увеличить конкурентные способности байкальских эндемичных видов по сравнению с их предполагаемым голарктическим конкурентом. Данные результаты имеют важное значение для будущих исследований как отдельных, так и комбинированных эффектов глобальных климатических изменений на другие древние озера планеты. Материалы биохимических исследований, полученные в рамках данной работы, могут способствовать выявлению новых молекул и биологических катализаторов, повышающих холодоустойчивость организмов, с перспективами практического применения результатов в различных областях биотехнологии и биомедицины.

Результаты работы имеют большое практическое значение в связи с возможностью разработки новых эффективных методов биомониторинга экосистемы озера Байкал. Полученные результаты могут быть включены в программы университетов и соответствующие учебные курсы.

Положения, выносимые на защиту

1. Существуют межвидовые различия в протекании процессов энергетического обмена и механизмов антиоксидантной системы при акклимации к температурам, отличным от предпочитаемых, у байкальских амфипод видов *E. verrucosus* и *E. cyaneus*.

2. Байкальский эндемичный вид *E. verrucosus* обладает высоким адаптивным потенциалом в условиях низких температур по сравнению с теплолюбивым байкальским *E. cyaneus* и голарктическим *G. lacustris*.

3. Ограничение вселения голарктического *G. lacustris* в открытый Байкал обусловлено неспособностью данного вида поддерживать физиологическую активность и гомеостаз организма при низких температурах.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа по содержанию и форме представления полностью соответствует паспорту специальности 03.02.10 – «Гидробиология», а именно разделам: «Исследование влияния факторов водной среды на гидробионтов в природных и лабораторных условиях с целью установления пределов толерантности и оценки устойчивости водных организмов в условиях изменяющихся физико-химических свойств природных вод (в частности, при антропогенном воздействии)» и «Исследование экологических основ жизнедеятельности гидробионтов – их питания, водно-солевого и энергетического обмена, закономерностей роста и развития, особенностей жизненных циклов».

Личный вклад автора. Верещагина Ксения Петровна принимала непосредственное участие на всех стадиях выполнения работы. Личный вклад соискателя состоит в определении целей и задач исследования, поиске источников информации, выборе объекта и предмета исследования. Сбор теоретического материала, поиск и применение методик, организация полевых работ по сбору биологического материала, выполнение экспериментов, проведение биохимических анализов, а также обработка и анализ полученных данных были проведены Ксенией Петровной. Все содержащиеся в работе выводы и основные положения, выносимые на защиту, принадлежат автору. Личное участие автора в получении изложенных в диссертации результатов подтверждено соавторами и отражено в совместных публикациях.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования были представлены на 18-ом Международном коллоквиуме по амфиподам (Дижон, Франция, 2019 г.), Европейском симпозиуме по большим озерам «Большие озера, маленький Мир» (Эвиан, Франция, 2018 г.), Международной конференции «Пресноводные экосистемы – современные вызовы» (Иркутск, Россия, 2018 г.), Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2018» (Москва, Россия, 2018 г.), 22-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2018 г.), Международной конференции «Научная неделя молодых ученых и специалистов в области биологических наук - 2017» (Петрозаводск, Россия, 2017 г.), Всероссийском конгрессе

молодых ученых «Симбиоз – Россия» (Казань, Россия, 2017 г.), 17-ом Международном коллоквиуме по амфиподам (Трапани, Италия, 2017 г.) и др.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ в изданиях из перечня ВАК, в том числе 7 – в научных изданиях, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus (в двух из которых соискатель является первым автором).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 150 страницах, содержит 19 таблиц и 19 рисунков. Список литературы включает 248 источников, из которых 168 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. М. А. Тимофееву за помощь и поддержку на всех этапах работы. Большая благодарность всем сотрудникам лаборатории «Проблемы адаптации биосистем», особенно к.б.н. Д. В. Аксенову-Грибанову, к.б.н. Ж. М. Шатилиной, к.б.н. Д. С. Бедулиной, Е. С. Кондратьевой, В. А. Емшановой, Е. П. Щаповой, А. Н. Гуркову, Е. В. Мадьяровой за помощь в сборе материала, освоении методов анализа, работе над текстом, а также за конструктивную критику и поддержку на всех этапах работы. Автор выражает благодарность профессору Гансу Портнеру и доктору Магнусу Люкассену за предоставленную возможность освоить методы биохимического анализа в отделе интегративной экофизиологии Института Морских и Полярных Исследований имени Альфреда Вегенера Объединения имени Гельмгольца (г. Бремерхафен, Германия). Выражается признательность Инне Михайловне Соколовой за обучение методам статистического анализа в университете Северной Каролины, г. Шарлотт (США), а также советы и рекомендации по решению поставленных задач.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлен анализ российских и зарубежных источников литературы о температуре и ее влиянии на водные организмы. Рассмотрены ключевые механизмы неспецифических механизмов стресс-адаптации и энергетического метаболизма беспозвоночных к изменению температуры, а также уделено внимание вопросу холодоустойчивости беспозвоночных. Приведен краткий обзор об оз. Байкал и феномене несмешиваемости фаун.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта диссертационного исследования были выбраны амфиподы (Amphipoda, Crustacea). Это один из процветающих отрядов высших ракообразных (Malacostraca), объединяющий свыше 6 400 морских, пресноводных, подземных и даже наземных видов (Тахтеев и др., 2000). В рамках диссертационного исследования были использованы байкальские эндемичные амфиподы, относящиеся к роду *Eulimnogammarus* (Базикалова, 1945): *E. verrucosus* (Gerstfeld, 1858) и *E. cyaneus* (Dybowsky, 1874). Голарктические виды амфипод в исследовании представлял вид *Gammarus lacustris* Sars, 1863.

Отбор проб проводили в летне-осенний сезон 2016-2017 гг. Байкальские виды *E. cyaneus* и *E. verrucosus* отлавливали с помощью стандартного гидробиологического метода – сачком, в литоральной зоне озера на глубине 1–1,5 метра рядом с поселком Большие Коты (51°54'11.67" N, 105°4'7.61" E). Данное место отбора проб является частью пляжной зоны, которая характеризуется каменистым ландшафтом, покрытым водорослями, а также присутствием интенсивной гидродинамики (волновых движений). Голарктический вид *G. lacustris* отлавливали в «Озере №14» в черте того же поселка (51°55'14.39" N, 105°4'19.48" E), которое является небольшим эвтрофным водоемом антропогенного происхождения и расположено примерно в 2 километрах от оз. Байкал.

Методы проведения экспериментов. В ходе исследования проводили два типа экспериментов: (1) длительная акклимация амфипод при температурах, отличных от предпочитаемых температур у исследуемых видов, (2) длительная акклимация амфипод при температурах, отличных от среднегодовой температуры литорали оз. Байкал. Для облегчения восприятия схем экспериментов они обозначены – эксперимент №1 (основная группа) и эксперимент №2 (дополнительная группа). Дополнительная группа была необходима для обеспечения референтного (единого для всех, объединяющего) контроля. В связи с тем, что для байкальского эндемичного *E. verrucosus* предпочитаемая температура составляет 6 °С (как и среднегодовая температура литорали оз. Байкал), для дополнительной группы использовали только виды *E. cyaneus* и *G. lacustris*.

Схема эксперимента №1 (основная группа) — длительная акклимация амфипод при температурах, отличных от предпочитаемых. Для проведения данного эксперимента отлов амфипод производили в течение двух недель. В ходе сбора необходимого количества материала животных содержали при температурах вылова: для байкальских видов $7 \pm 0,5$ °С, для голарктического – $13 \pm 0,5$ °С.

Для проведения эксперимента №1 температуру акклимации постепенно доводили до предпочитаемой температуры исследуемых видов амфипод (6 °С для *E. verrucosus*, 12 °С для *E. cyaneus* и 15 °С для *G. lacustris*) (Тимофеев, 2010; Ахенов-Gribanov et al., 2016). Скорость изменения температуры при этом составляла 1-1,5 °С в сутки. Затем проводили преакклимацию амфипод при предпочитаемых температурах в течение двух недель (для стабилизации гомеостаза амфипод после вылова и транспортировки) перед основной частью эксперимента. После двухнедельной преакклимации одну часть амфипод фиксировали в жидком азоте для последующих биохимических анализов. Данная группа была взята за контроль (НК - начальный контроль).

Остальных особей каждого вида амфипод разделяли на 4 равные группы. Затем производили постепенное понижение/повышение температур со скоростью 1-1,5 °С в сутки до температур 1,5 °С, 6 °С, 12 °С и 15 °С. Таким образом, каждый из трех видов был экспонирован при четырех разных температурах – предпочитаемых для каждого из видов и температуре, приближенной к средней по зимнему сезону (декабрь-февраль) в верхней литорали оз. Байкал. Длительную акклимацию амфипод к температурам, отличным от предпочитаемых, проводили в течение месяца. Группы амфипод, экспонированные в условиях предпочитаемых температур, были взяты за контроль относительно фактора времени (ВК – временной контроль).

По окончании эксперимента животных фиксировали в жидком азоте для дальнейшей биохимической обработки. Количество биологических повторностей составило 6-10, а количество технических повторностей для каждой точки фиксации и вида составило 3 (каждая повторность включала 3-15 животных).

Схема эксперимента №2 (дополнительная группа) — длительная акклимация амфипод при температурах, отличных от среднегодовой температуры литорали оз. Байкал. Второй тип эксперимента был организован по такому же принципу, как и первый, с тем отличием, что после вылова амфипод акклимировали к температуре 6 °С в течение двух недель (так как данная температура является среднегодовой для литоральной зоны оз. Байкал), а не к их предпочитаемым температурам, как описано выше. Далее течение эксперимента проходило идентично схеме эксперимента №1.

В ходе всех экспериментальных работ аквариумы с животными располагали в инкубаторе (Sanyo MIR-254 (238 л), Osaka, Japan). Необходимое постепенное повышение/понижение температуры проводили с помощью термостата (WiseCircu, Witeg GmbH, Wertheim, Germany). Образцы фиксировали в жидком азоте.

Биохимические методы анализа. Оценку изменения содержания энергетических метаболитов проводили энзиматическими спектрофотометрическими методами с применением стандарт-набора «Лактат-витал» и согласно методикам Bergeymer (1985), Morris et al. (2005) с модификациями Ivanina et al. (2010), Sokolova et al. (2012). Оценку изменения активности ферментов антиоксидантной системы – пероксидазы, каталазы и глутатион S-трансферазы – проводили согласно модифицированным (Тимофеев, 2010) спектрофотометрическим методикам Drotar et al. (1985), Aebi (1984) и Nabis et al. (1974), соответственно. Оценку изменения активности ферментов аэробного метаболизма – цитохромоксидазы и цитратсинтазы – проводили согласно модифицированным (Jakob et al., 2016) спектрофотометрическим методикам Moyes et al. (1997) и Sidell et al. (1987), соответственно.

Обсчет и статистическая обработка данных. Статистический анализ полученных данных проводили в программе Sigma Plot (версия 12, Systat Software Inc., San Jose, CA, США). Наличие статистически значимых отличий от контроля проверяли с помощью метода Данна ($\alpha < 0,05$). Попарное сравнение в группах производили при помощи метода Шидака-Холма. В случае ненормального распределения использовали непараметрический дисперсионный анализ. Достоверными считали результаты при $p < 0,05$. Подготовку иллюстративного материала проводили на сайте <https://plot.ly> (Plotly Technologies Inc, Canada) с последующей коррекцией в программе Paint.net (Microsoft, USA).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка выживаемости байкальских и голарктических амфипод в условиях длительной акклимации к температурам, отличным от предпочитаемых

В ходе экспериментальной длительной акклимации к пониженным и повышенным температурам (относительно предпочитаемой для каждого вида) байкальских и голарктических амфипод, показано возрастание смертности всех видов исследуемых амфипод. Для байкальского *E. verrucosus* температура 15 °С являлась наиболее стрессовой, так как за месяц экспонирования погибло 6,3% особей, в то

время как при температуре 12 °С – только 0,3%. При температурах 6 °С (предпочитаемая температура данного вида) и 1,5 °С гибели животных не наблюдали. Во время отлова в течение двух недель, а также лабораторной преакклимации (также две недели) перед экспериментальным холодовым/тепловым воздействием, смертность *E. verrucosus* составила 6,3%.

Для второго байкальского вида, *E. cyaneus*, наблюдали иную картину. В течение длительной акклимации при 15 °С смертность амфипод составила 0,4%. В то время как при предпочитаемой температуре (12 °С) и при пониженных температурах (6 °С и 1,5 °С) гибели амфипод не наблюдали. Согласно ранее проведенным исследованиям, данный вид является более термоустойчивым, чем *E. verrucosus* (Bedulina et al., 2013).

Для голарктического *G. lacustris* было сложнее отследить показатели смертности, так как для данного вида присуще явление каннибализма (Yemelyanova et al., 2002; Verezhina, 2009). Первоначально было отмечено, что в ходе экспозиции количество животных уменьшалось, в то время как погибших особей не наблюдали. При дальнейшем наблюдении фиксировали так же случаи поедания еще живых особей (ослабленных или после смены хитинового покрова). Наибольшие потери от каннибализма – 38,4% – наблюдали в течение двух недель отлова и лабораторной преакклимации. В связи с этим в рацион *G. lacustris* был включен сушеный гаммарус (коммерческий корм для рыб), состоящий из *Gammarus* sp. – предположительно *G. lacustris* (Варгом, Барнаул, Россия). В ходе долговременной акклимации в течение месяца при 15 °С (предпочитаемая температура данного вида) наблюдали значительный спад каннибализма – с 38,4% до 4,9%. При температуре 12 °С количество съеденных амфипод было значительно ниже и не превышало 3%. При пониженной температуре 6 °С насчитывали 1,5 % особей, погибших от каннибализма. При длительной холодной акклимации при температуре 1,5 °С наблюдали уже не каннибализм, а естественную смертность – 0,8%.

В ходе исследования оценивали межвидовые различия механизмов стресс-резистентности и показателей энергетического метаболизма байкальских (*E. verrucosus* и *E. cyaneus*) и голарктического (*G. lacustris*) видов амфипод после длительной акклимации к температурам, отличным от предпочитаемых и отличным от среднегодовой температуры литорали оз. Байкал. В качестве маркеров стресс-ответа использовали показатели активации ключевых систем резистентности организма, таких как компоненты энергетического обмена и ферменты антиоксидантной системы.

Оценка неспецифического стресс-ответа по показателям изменения активности ферментов антиоксидантной системы у амфипод в условиях длительной акклимации к температурам, отличным от предпочитаемых

По результатам длительной экспериментальной акклимации амфипод к предпочитаемым температурам показано, что базовые уровни активности пероксидазы и глутатион S-трансферазы байкальского *E. cyaneus* ($0,0305 \pm 0,006$ и $9,194 \pm 0,729$ нКат/мг белка соответственно) выше, чем у голарктического *G. lacustris* ($0,0123 \pm 0,003$ и $6,743 \pm 0,387$ нКат/мг белка соответственно). Также базовые уровни активности пероксидазы ($0,0230 \pm 0,005$ нКат/мг белка) и каталазы ($1588,626 \pm 210,613$ нКат/мг белка) у байкальского *E. verrucosus* выше, чем у голарктического *G. lacustris*.

Акклимация к температурам ниже предпочитаемых приводила к изменению активности ферментов антиоксидантной системы (АОС) (Рис. 1, 2) у *G. lacustris* и *E. cyaneus*, тогда как у холодостойкого *E. verrucosus* изменений не отмечали. Акклимация к температурам выше предпочитаемых приводила к изменению активности ферментов АОС у байкальских эндемичных амфипод (Рис. 1).

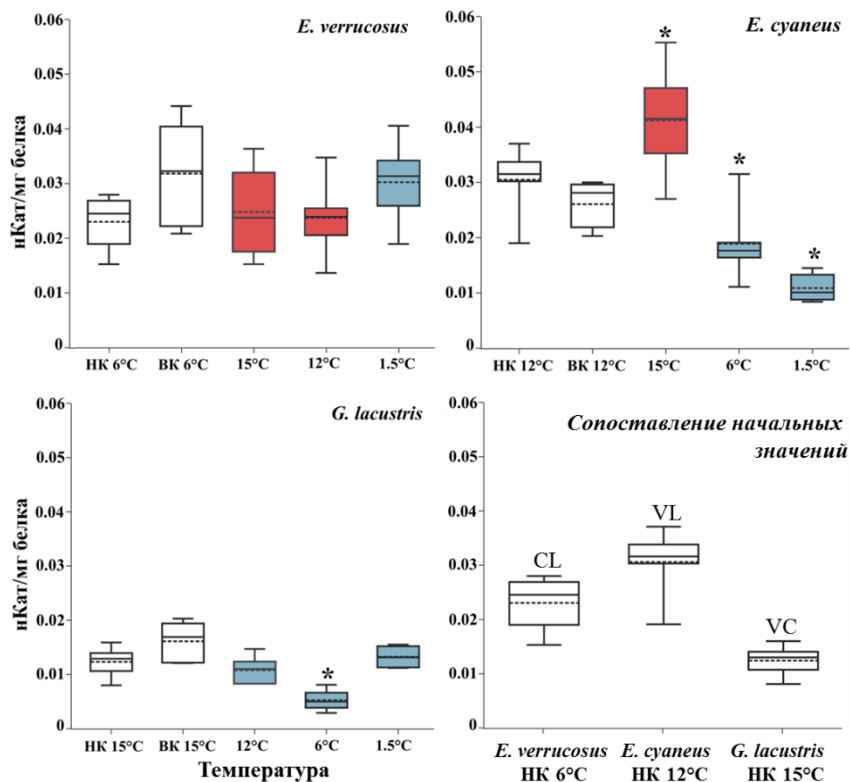


Рисунок 1. Изменение активности пероксидазы у байкальских эндемичных и голарктического видов амфипод в условиях длительной акклимации к температурам, отличным от предпочитаемых (в нКат/мг белка). За контроль принята предпочитаемая температура.

□ – предпочитаемая температура вида;
 ■ – температура выше предпочитаемой;
 ■ – температура ниже предпочитаемой.

НК – начальный контроль (фиксация образцов контрольной группы непосредственно перед началом экспозиционной акклимации);
 ВК – временной контроль (фиксация образцов контрольной группы после проведения длительной экспозиционной акклимации);
 С, V, L – *E. cyaneus*, *E. verrucosus* и *G. lacustris* соответственно, указывают на значимое отличие активности фермента от обозначенного данным символом вида, при $p < 0,05$.

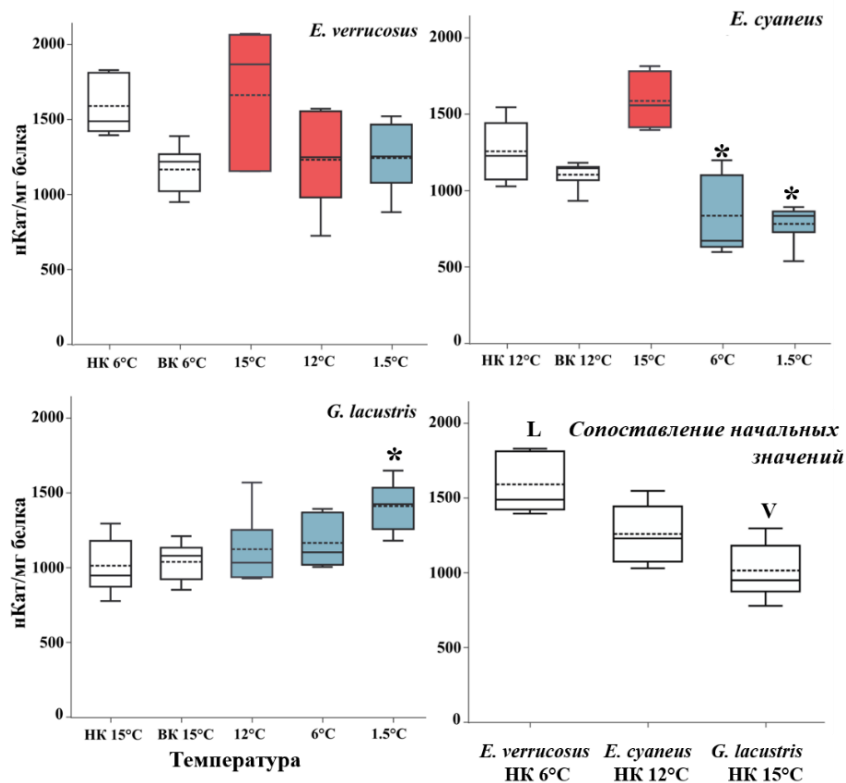
* – статистически достоверное отклонение от начального контроля при $p < 0,05$.

Рисунок 2. Изменение активности каталазы у байкальских эндемичных и голарктического видов амфипод в условиях длительной акклимации к температурам, отличным от предпочитаемых (в нКат/мг белка). За контроль принята предпочитаемая температура.

□ – предпочитаемая температура вида;
 ■ – температура выше предпочитаемой;
 ■ – температура ниже предпочитаемой.

НК – начальный контроль (фиксация образцов контрольной группы непосредственно перед началом экспозиционной акклимации);
 ВК – временной контроль (фиксация образцов контрольной группы после проведения длительной экспозиционной акклимации);
 С, V, L – *E. cyaneus*, *E. verrucosus* и *G. lacustris* соответственно, указывают на значимое отличие активности фермента от обозначенного данным символом вида, при $p < 0,05$.

* – статистически достоверное отклонение от начального контроля при $p < 0,05$.



Оценка неспецифического стресс-ответа по показателям изменения активности ферментов антиоксидантной системы у амфипод в условиях длительной акклимации к температурам, отличным от среднегодовой температуры литорали оз. Байкал

По результатам длительной экспериментальной акклимации амфипод к среднегодовой температуре литорали оз. Байкал (6 °С) базовые уровни активности пероксидазы и каталазы (после акклимации) выше у байкальского холодолюбивого *E. verrucosus* ($0,0230 \pm 0,005$ и $1588,626 \pm 210,613$ нКат/мг белка соответственно), чем у голарктического *G. lacustris* ($0,0142 \pm 0,0031$ и $1042,060 \pm 285,679$ нКат/мг белка соответственно). Длительная акклимация к температуре выше среднегодовой температуры литорали оз. Байкал приводила к изменению активности глутатион S-трансферазы у байкальских эндемичных *E. verrucosus* и *E. cyaneus*, а также каталазы у *E. cyaneus*. Напротив, длительная акклимация голарктического *G. lacustris* к температурам, отличным от среднегодовой температуры литорали оз. Байкал, не приводила к изменению активности ферментов АОС.

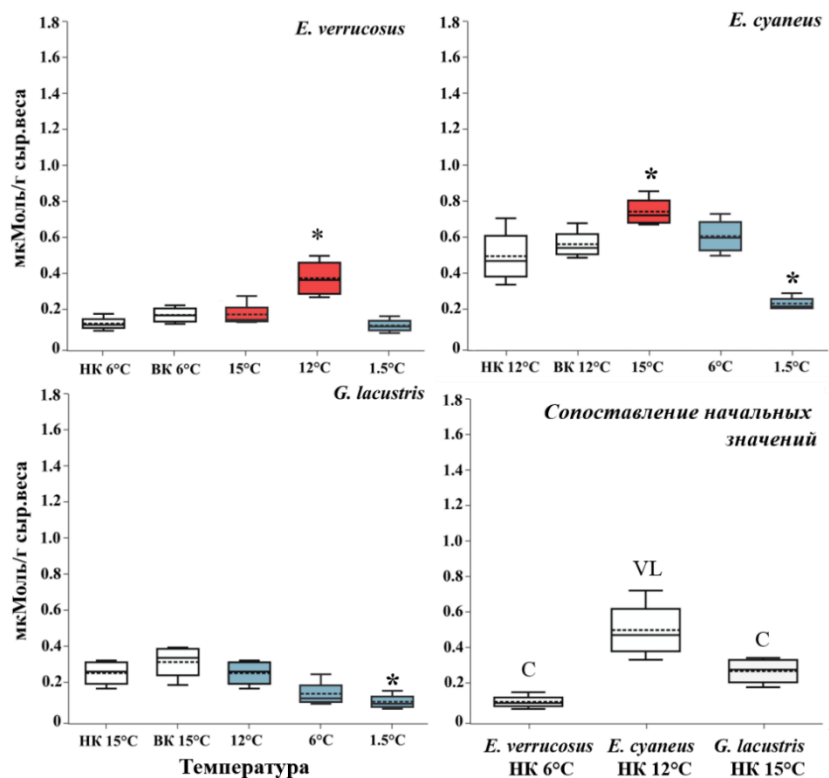
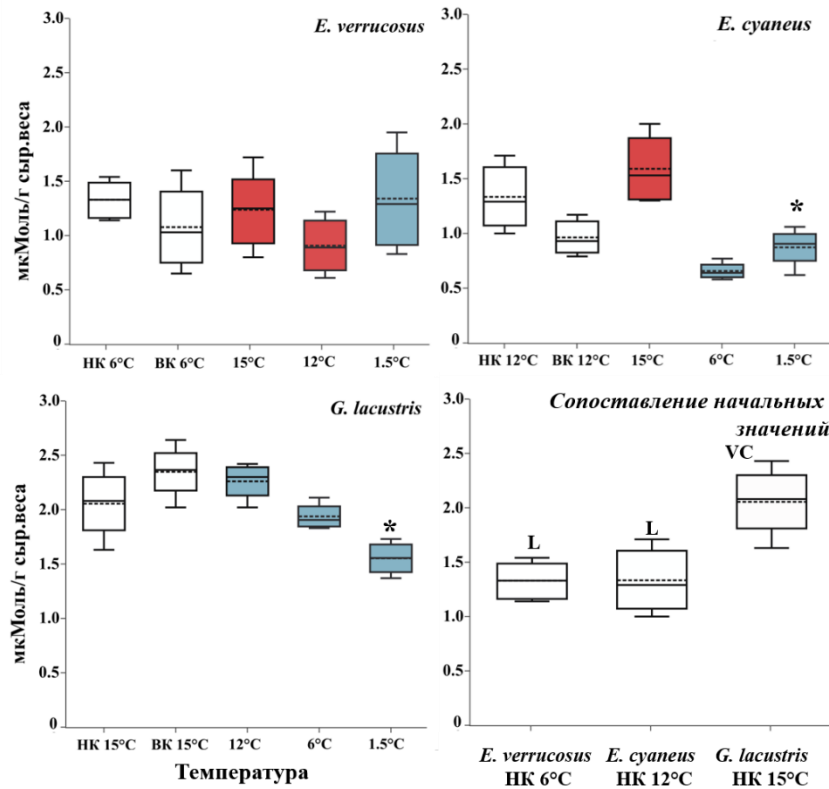
Показатели аэробного и анаэробного энергетического метаболизма у амфипод в условиях длительной акклимации к температурам, отличным от предпочитаемых

По результатам экспериментальной длительной акклимации амфипод к предпочитаемым температурам показано, что базовые уровни содержания АТФ ($1,926 \pm 0,275$ мкМоль/г сыр. веса) и гликогена ($7,535 \pm 0,702$ мкМоль/г сыр. веса) голарктического *G. lacustris* выше, в сравнении с байкальским эндемичным *E. verrucosus* ($1,330 \pm 0,174$ и $1,704 \pm 0,175$ мкМоль/г сыр. веса соответственно) и *E. cyaneus* ($1,334 \pm 0,361$ и $4,114 \pm 1,451$ мкМоль/г сыр. веса соответственно). Акклимация к температурам ниже предпочитаемых приводила к снижению содержания АТФ у *G. lacustris* и *E. cyaneus*, тогда как у холодолюбивого *E. verrucosus* изменений не отмечали (Рис. 3). Акклимация к температурам ниже предпочитаемых приводила к повышению содержания гликогена у *G. lacustris* и *E. cyaneus*, тогда как у холодолюбивого *E. verrucosus*, напротив, происходило снижение.

Базовые уровни активности цитохромоксидазы и цитратсинтазы выше у голарктического *G. lacustris* ($1,017 \pm 0,157$ и $1,212 \pm 0,130$ мкМоль/мг белка соответственно) в сравнении с байкальским холодолюбивым *E. verrucosus* ($0,540 \pm 0,145$ и $0,653 \pm 0,168$ мкМоль/мг белка соответственно) при акклимации к предпочитаемым температурам. Базовый уровень активности цитохромоксидазы также выше у *G. lacustris*, чем у байкальского *E. cyaneus* ($0,353 \pm 0,112$ мкМоль/мг белка). Акклимация к температурам, отличным от предпочитаемых, приводила к повышению активности цитохромоксидазы у голарктического *G. lacustris* и термоустойчивого *E. cyaneus*, тогда как у холодолюбивого *E. verrucosus* изменений не отмечали.

Базовый уровень содержания лактата был выше у байкальского *E. cyaneus* ($0,525 \pm 0,167$ мкМоль/г сыр. веса) по сравнению с голарктическим *G. lacustris* ($0,294 \pm 0,077$ мкМоль/г сыр. веса) и байкальским *E. verrucosus* ($0,121 \pm 0,035$ мкМоль/г сыр. веса). Акклимация к температурам ниже предпочитаемых приводила к снижению содержания лактата у *G. lacustris* и *E. cyaneus*, тогда как у холодолюбивого

E. verrucosus изменений не наблюдали (Рис. 4). Акклимация к температурам выше предпочитаемых приводила к накоплению лактата у байкальских эндемичных *E. verrucosus* и *E. cyaneus* (Рис. 4). Акклимация к температурам, отличным от предпочитаемых, приводила к повышению активности лактатдегидрогеназы у байкальских эндемичных *E. verrucosus* и *E. cyaneus*. У голарктического *G. lacustris*, напротив, наблюдали снижение ее активности при акклимации к температуре ниже предпочитаемой.



Оценка аэробного и анаэробного энергетического метаболизма у амфипод в условиях длительной акклимации к температурам, отличным от среднегодовой температуры литорали оз. Байкал

По результатам длительной экспериментальной акклимации амфипод к среднегодовой температуре литорали оз. Байкал (6 °С), базовые уровни активности цитохромоксидазы и цитратсинтазы выше у голарктического *G. lacustris* (1,221±0,267 и 1,288±0,142 мкМоль/мг белка соответственно) по сравнению с байкальским холодолюбивым *E. verrucosus* (0,540±0,145 и 0,653±0,168 мкМоль/мг белка соответственно). Базовый уровень активности цитохромоксидазы также был выше у *G. lacustris*, чем у байкальского *E. cyaneus* (0,325±0,056 и 1,123±0,222 мкМоль/мг белка соответственно). Показано, что акклимация всех исследованных видов амфипод в условиях пониженных и повышенных температур (относительно среднегодовой температуры литорали оз. Байкал) не приводила к изменению активности цитохромоксидазы и цитратсинтазы.

Акклимация всех исследованных видов амфипод к температурам *выше* среднегодовой температуры литорали оз. Байкал приводила к накоплению лактата. Акклимация теплолюбивого байкальского вида *E. cyaneus* и голарктического вида-убиквиста *G. lacustris* к температурам *ниже* среднегодовой температуры литорали оз. Байкал приводила к снижению активности лактатдегидрогеназы, тогда как у холодолюбивого байкальского *E. verrucosus* изменений не наблюдали.

Акклимация теплолюбивого байкальского вида *E. cyaneus* и голарктического вида-убиквиста *G. lacustris* к температурам *выше* среднегодовой температуры литорали оз. Байкал приводила к снижению активности лактатдегидрогеназы, тогда как у холодолюбивого байкальского *E. verrucosus*, напротив, происходило повышение активности данного фермента.

Полученные данные подтверждают наличие метаболической компенсации у холодолюбивого вида *E. verrucosus* в условиях низких температур, что выражается в отсутствии реакции лактатдегидрогеназы. Многократное повышение активности фермента при температуре 15 °С свидетельствует о выходе за пределы метаболического кислородного окна и активизации процессов анаэробного метаболизма, что соответствует полученным нами ранее данным (Ахенов-Грибанов et al., 2016; Jakob et al., 2016). Реакция фермента на низкие температуры у теплолюбивых видов свидетельствует о предполагаемых нижних границах метаболического кислородного окна.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно сравнительному анализу базовых уровней активности ферментов АОС, при предварительной акклимации к предпочитаемым температурам у голарктического *G. lacustris* активность ферментов ниже, чем у байкальских эндемиков. Обитание байкальских эндемичных видов при постоянных низких температурах и высоком содержании кислорода может объяснять данный факт. Так, в работе Abele и Puntarulo (2004) показано, что базовые уровни активности супероксиддисмутазы полярных моллюсков выше, чем у обитающих в умеренных широтах (Regoli et al., 1997). Повышенная генерация АФК в клетках эктотермов может происходить из-за более

высокой растворимости кислорода в холодной воде и биологических жидкостях (Wells, 1986; Viarengo et al., 1995, 1998; Ansaldo et al., 2000; Camus, 2005).

Если сравнивать между собой два исследованных байкальских вида, можно отметить более высокую активность пероксидазы и глутатион S-трансферазы у термоустойчивого *E. cyaneus*, что может являться адаптацией к большей частоте температурных колебаний в зоне обитания данного вида (верхняя литораль). Ранее было показано, что *E. cyaneus* обладает повышенной емкостью систем неспецифического стресс-ответа, выражающейся в более высоком уровне белков теплового шока в клетках по сравнению с *E. verrucosus* (Bedulina et al., 2017).

Таким образом, результаты экспериментального исследования согласуются с нашей гипотезой о наличии специфических адаптаций байкальских эндемиков к повышенному содержанию растворенного кислорода в воде Байкала, что может вызывать усиленное образование АФК (Ахенов-Gribanov et al., 2016).

По результатам исследования следует, что длительная акклимация к повышенным и пониженным температурам (относительно предпочитаемой для каждого вида) приводила к изменению активности ферментов АОС у всех исследованных видов амфипод. Согласно результатам исследования, у байкальского *E. cyaneus* происходило значимое снижение активности пероксидазы и каталазы в условиях длительной акклимации при температурах ниже предпочитаемых – 6 и 1,5 °С. Уменьшение активности данных двух ферментов может служить индикатором воздействия высоких уровней АФК на организм, приводящего к окислительным повреждениям основных клеточных компонентов, таких как липиды, белки и ДНК (Halliwell, 2007). Напротив, длительная акклимация при 15 °С приводила к повышению активности пероксидазы у *E. cyaneus*. Повышение активности пероксидазы и каталазы направлено на предотвращение свободнорадикального окисления в условиях повышенной температуры (Lushchak, 2011), что неоднократно показано в исследованиях с байкальскими эндемичными амфиподами (Timofeyev, 2009; Shatilina et al., 2011).

У голарктического *G. lacustris* также наблюдали снижение активности пероксидазы при акклимации к 6 °С и повышение активности каталазы при 1,5 °С. Снижение активности ферментов может также указывать на снижение скорости протекания реакций на фоне общего угнетения метаболизма в условиях низких температур, так как оптимальной для данных видов является температура 12 °С и 15 °С соответственно. Напротив, у *E. verrucosus* изменений активности пероксидазы и каталазы не наблюдали. *E. verrucosus* является холодолюбивым видом, который мигрирует на глубину при повышении температуры среды (Jakob et al., 2016). Вероятно, поддержание высокой активности ферментов АОС является частью биохимической адаптации данного вида к низким температурам.

Результаты проведенного исследования указывают на то, что длительная акклимация к повышенным и пониженным температурам приводила к повышению активности глутатион S-трансферазы у *E. cyaneus* и *G. lacustris*. Напротив, у *E. verrucosus* при акклимации к температуре 12 °С происходило понижение активности данного фермента. Глутатион S-трансфераза играет важную роль в предотвращении повреждений от окислительного стресса и является показателем их развития. Данный фермент катализирует конъюгацию глутатиона с ксенобиотиками, включая фосфорорганические пестициды, и цитотоксические альдегиды,

продуцируемые в процессе перекисного окисления липидов (Booth, O'Halloran, 2001). Помимо функции детоксикации, глутатион S-трансфераза вовлечена в транспорт различных гормонов и эндогенных метаболитов (Listowsky et al., 1988). Также на дрожжах показано, что глутатион S-трансфераза чувствительна к тепловому шоку (Choi et al., 1998). Согласно Moreira и Guilhermino (2005), у моллюсков *Mytilus galloprovincialis* происходит изменение активности глутатион S-трансферазы в зависимости от температуры. Таким образом, данные по активности глутатион S-трансферазы подтверждают результаты по другим исследованным в работе антиоксидантным ферментам.

Так, акклимация амфипод к температурам ниже предпочитаемых не вела к существенному изменению в активности антиоксидантных ферментов у байкальского холодолюбивого вида *E. verrucosus*, размножающегося в зимние месяцы, что согласуется с нашей гипотезой о наличии у этого вида особых биохимических и клеточных адаптаций к температурам, близким к нулю. При этом температуры выше предпочитаемых оказывали эффект на активность глутатион S-трансферазы у данного вида, что свидетельствует о развитии клеточного стресса.

Показано, что оба термоустойчивых вида – байкальский *E. cyaneus* и голарктический *G. lacustris* – продемонстрировали изменение активности всех трех антиоксидантных ферментов при акклимации при температурах ниже предпочитаемых. Это свидетельствует об активизации клеточных процессов, связанных с усилением генерации активных форм кислорода и развитием клеточного стресса.

Согласно результатам исследования, длительная акклимация байкальских и голарктических амфипод к температурам, отличным от среднегодовой температуры литорали оз. Байкал, не приводила к изменению активности каталазы. Стоит отметить, что по результатам основного эксперимента №1 (основная группа – длительная акклимация амфипод к температурам, отличным от предпочитаемых), у байкальского термоустойчивого *E. cyaneus* и голарктического *G. lacustris* наблюдали изменение активности данного фермента.

Полученные результаты демонстрируют, что акклимация амфипод к их собственным, эволюционно выработанным предпочитаемым температурам позволяет более корректно оценить ёмкость и направление биохимических адаптаций видов, поскольку среднегодовая температура литорали оз. Байкал (6 °C) является температурой ниже оптимума для *E. cyaneus* и *G. lacustris*. Однако данные результаты свидетельствуют, что преакклимация к более низким температурам способна нивелировать некоторые биохимические реакции теплолюбивых видов (кроме реакции глутатион S-трансферазы у *E. cyaneus*), а значит полученные результаты имеют бóльший экологический смысл, поскольку позволяют оценить биохимические реакции видов в зимние месяцы после длительного периода понижения температуры для Байкала (в сентябре – ноябре).

В результате анализа базовых уровней АТФ показано, что при предварительной акклимации к предпочитаемым температурам у голарктического *G. lacustris* уровень АТФ выше по сравнению с байкальскими эндемичными видами *E. verrucosus* и *E. cyaneus*. Решающее значение в адаптации к температуре имеют митохондрии и их способность генерировать метаболическую энергию. Таким образом, генерация АТФ

при повышенных температурах происходит интенсивнее, чем в холодных условиях (Pörtner et al., 1999; Pörtner, Gutt, 2016). В данном контексте стоит отметить, что у холодолюбивого эндемика *E. verrucosus* также отмечали более низкий базовый уровень активности цитратсинтазы и цитохромоксидазы по сравнению с голарктическим *G. lacustris*. У байкальского *E. cyaneus* также базовый уровень активности цитохромоксидазы был ниже по сравнению с *G. lacustris*. Данные ферменты вовлечены в аэробный метаболизм. Цитратсинтаза является консервативным ферментом и обнаружена практически во всех клетках аэробных организмов; она катализирует реакцию конденсации ацетата (ацетил-КоА) и оксалоацетата с образованием цитрата. Данная реакция является лимитирующей на первом этапе цикла Кребса (Северина, 2003). Таким образом, цитратсинтаза является маркером интактных митохондрий и наряду с цитохромоксидазой (финальный фермент дыхательной цепи) отражает максимальную аэробную производительность клетки. Таким образом, полученные нами результаты могут указывать на разницу в протекании энергетических процессов у исследованных видов и отражать более низкий уровень аэробного метаболизма байкальских эндемиков по сравнению с голарктическим видом.

В условиях длительной акклимации байкальского термоустойчивого *E. cyaneus* и голарктического *G. lacustris* к температурам, ниже предпочитаемых (6 и 1,5 °С соответственно), наблюдали значимое снижение содержания АТФ. Напротив, у холодолюбивого *E. verrucosus* изменений не происходило. Примечательно, что уровень гликогена, напротив, возрастал при акклимации к температурам ниже предпочитаемых у *E. cyaneus* (1,5 °С) и *G. lacustris* (12 и 6 °С). В стрессовых условиях потребление АТФ снижается в целях увеличения шансов на выживание в условиях ограниченной генерации энергии. Как результат, так называемый обратный эффект Пастера наблюдается при приостановлении обмена веществ. При этом отмечается сильное снижение скорости катаболизма углеводов и аминокислот. Повышение запасов энергетических метаболитов, особенно гликогена, в сочетании с обратным эффектом Пастера представляют собой основную метаболическую адаптацию к экстремальным стрессовым воздействиям окружающей среды (Nochachka, Guppy, 1987). Это, согласно нашим данным, отражено в снижении уровня гликогена и повышении содержания АТФ у байкальского *E. cyaneus* и голарктического *G. lacustris*.

Повышение уровня гликогена у *E. cyaneus* также сопряжено с понижением содержания лактата при его акклимации к температуре 1,5 °С. У голарктического *G. lacustris* также наблюдали снижение уровня лактата при акклимации к температуре 1,5 °С. Лактат представляет собой активный метаболит, который способен перемещаться между клетками, тканями и органами, где может быть окислен в качестве источника энергии или повторно преобразован в пируват, глюкозу или гликоген. Лактат участвует в регуляции окислительно-восстановительных процессов в клетке и регуляции метаболизма посредством участия в поддержании баланса НАД⁺/НАДН в клетках. Неоднократно показано использование лактата в качестве субстрата для глюконеогенеза (Brooks, 2002, 2016; Von Morze et al., 2017). Совместно с лактатдегидрогеназой, лактат может выполнять роль псевдогормона, регулируя запасы глюкозы и гликогена в разных тканях и поддерживая его на нужном уровне, тем самым поддерживая энергетический баланс организма (Маянский, 1994; Phillips et al., 1977; De Wachter et al., 1997; Mark et al., 2002). На это указывают результаты

настоящего исследования, согласно которым уровень глюкозы не менялся при акклимации ко всем экспериментальным температурам у всех исследованных видов. Это может говорить о поддержании постоянного уровня глюкозы посредством глюконеогенеза из лактата для сохранения гомеостаза клеток в условиях изменения температуры среды.

Точные промежуточные пути вовлечения лактата в метаболизм и их значимость до сих пор дискуссионны: неизвестно, происходит ли его повторное включение в гликоген или глюкозу или же он окисляется в разных тканях (Ellington, 1983; Hill et al., 1991; Lallier, Walsh, 1992; Hervant et al., 1999; Oliveira, da Silva, 2000), происходит его экскреция в окружающую среду (Head, Baldwin, 1986) или же происходит эндогенный глюконеогенез в мышечные волокна (Henry et al., 1994; Hervant et al., 1999).

У холодолюбивого байкальского эндемика *E. verrucosus* выявлена иная картина. Так, у *E. verrucosus* наблюдали снижение содержания гликогена при температуре выше (15 °С) и ниже (1,5 °С) предпочитаемой (6 °С). Истощение запасов гликогена при 15 °С было сопряжено с повышением активности лактатдегидрогеназы. Также для *E. verrucosus* показано повышение содержания лактата при акклимации к повышенной температуре 12 °С. Примечательно, что у термотолерантного байкальского *E. cyaneus* также наблюдали повышение лактата при температуре 15 °С, которая выше оптимальной на 3 °С.

При отклонении температур от оптимальных может происходить увеличение энергодефицита в клетках за счет нарушения работы электронтранспортной цепи митохондрий, что в ряде случаев приводит к активации в организме анаэробного метаболизма. О частичном переключении *E. verrucosus* на анаэробный метаболизм свидетельствуют изменение активности лактатдегидрогеназы и содержания лактата. Изменение данных маркеров у *E. verrucosus* при повышенной температуре может быть обусловлено термочувствительностью данного вида, поскольку даже небольшие отклонения температур от оптимальных приводят к активации механизмов стресс-ответа и изменению в энергетическом метаболизме (Axenov-Gribanov et al., 2016).

Согласно литературным данным, повышение активности лактатдегидрогеназы (Tesch et al., 1978) отмечают в случаях высокого содержания лактата, недостатка кофермента НАДН, истощения запасов гликогена, в результате чего происходит угнетение функционального и физиологического состояния организмов, что и отмечали в случае повышения температуры (Motohashi et al., 1999; Stillman, Somero, 2001; Kawall et al., 2002; Selvakumar, Geraldine, 2003). Установленное в нашей работе увеличение активности лактатдегидрогеназы при понижении температуры среды может свидетельствовать о попытках амфипод нарастить долю анаэробного метаболизма, следствием которого и является последующее накопление лактата. В целом, некоторые наблюдаемые изменения уровня стресс-маркеров могут быть объяснены снижением функционального и физиологического статуса организма (Hochachka, Somero, 2014).

Накопление конечных кислых продуктов метаболизма, таких как лактат, сукцинат, пропионат или ацетат, может привести к подкислению внутриклеточной среды. Хотя умеренный ацидоз внутренней среды может быть полезен для клетки посредством поддержания снижения скорости метаболизма (Langenbuch et al., 2006; Pörtner, 2008), но все же чрезмерное внутриклеточное закисление токсично. Успешные факультативные анаэробы, такие как морские литоральные моллюски, способны

противодействовать этому потенциально токсичному подкислению и задерживать или замедлять снижение внутриклеточного рН. Из-за интенсивного ингибирования генерации АТФ во время приостановления метаболизма, активные АТФ-зависимые механизмы играют незначительную роль в поддержании кислотно-щелочного баланса, который поддерживается с использованием пассивных тканевых буферных систем (таких как имидазол, фосфат и карбонат кальция) (Sokolova et al., 2000b). Эти механизмы буферизации имеют ограниченную эффективность, и длительный анаэробизм обычно связан с умеренным внутриклеточным подкислением (Sokolova et al., 2000b).

Это свидетельствует о развитии метаболической компенсации у холодолюбивого вида *E. verrucosus* в условиях низких температур, что выражается в отсутствии реакции лактатдегидрогеназы. Многократное повышение активности фермента при температуре 15 °С свидетельствует о выходе за пределы метаболического кислородного окна и активизации процессов анаэробизма, что соответствует полученным нами данным о верхних границах метаболического кислородного окна для этого вида (Aхеноv-Gрибанов et al., 2016; Jakob et al., 2016).

Полученные данные свидетельствуют о наличии разных стратегий адаптации к низким температурам у изучаемых видов. Так, когда оба теплолюбивых вида – *E. cyaneus* и *G. lacustris* – реагируют на экспозицию при низких температурах усилением гликолизогенеза, или депонированием свободной клеточной энергии, на фоне снижения общей метаболической активности, у холодолюбивого вида *E. verrucosus* энергетический метаболизм протекает без признаков угнетения.

ВЫВОДЫ

1. Низкая положительная температура 1,5 °С является наиболее стрессовой для голарктического *G. lacustris*, так как только для него отмечали гибель при экспозиции к данной температуре. Байкальские виды амфипод, напротив, являются наиболее чувствительными к высоким температурам.
2. У холодолюбивого *E. verrucosus* существуют особые биохимические адаптации на уровне антиоксидантной системы к температурам, близким к нулю, что подтверждает отсутствие реакции трех ключевых ферментов АОС у амфипод, акклимированных при температуре 1,5 °С. Оба термотолерантных вида, *E. cyaneus* и *G. lacustris*, продемонстрировали изменение активности всех трех ферментов АОС в условиях акклимации при температурах ниже предпочитаемых.
3. Акклимация байкальских эндемичных амфипод *E. verrucosus* и *E. cyaneus* к температурам выше предпочитаемых приводит к изменению активности ферментов АОС и развитию клеточного стресс-ответа. Выявлены межвидовые различия в активности ферментов АОС в условиях акклимации к температурам выше предпочитаемых.
4. Байкальские эндемичные амфиподы *E. verrucosus* и *E. cyaneus* имеют более низкую скорость базового метаболизма по сравнению с голарктическим видом *G. lacustris*, что связано с обитанием в постоянных холодных условиях озера Байкал.
5. Низкие положительные температуры оказывают значимый эффект на процессы энергетического метаболизма термоустойчивого эндемика *E. cyaneus* и потенциального вида-вселенца *G. lacustris*, что выражено в изменении уровня АТФ, гликогена, активности цитохромоксидазы, а также лактата. Показано наличие

специфических межвидовых стратегий адаптации к низким температурам у изучаемых видов.

6. Низкие температуры оказывают значимый эффект на показатели неспецифического стресс-ответа и энергетического метаболизма у потенциального инвазивного вида *G. lacustris*.

7. Экспозиция амфипод при температурах выше предпочитаемых приводит к изменениям показателей неспецифического стресс-ответа и энергетического метаболизма у холодолюбивого эндемика Байкала *E. verrucosus*. В условиях повышения температуры в ходе изменения климата это может привести к усилению потенциала вселения *G. lacustris* в литораль оз. Байкал за счет повышения его конкурентных способностей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях из перечня ВАК, в том числе 8 – в научных изданиях, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus:

1. **Vereshchagina, K. P.**, Kondrateva, E. S., Axenov-Gribanov, D. V., Shatilina, Zh. M., Khomich, A. S., Bedulina D.S., Zadereev, E. S., Timofeyev M. A. Nonspecific stress response to temperature increase in *Gammarus lacustris* Sars with respect to oxygen-limited thermal tolerance concept // PeerJ. – 2018. – e5571. <https://doi.org/10.7717/peerj.5571> **IF 2,118** (Q1).

2. **Vereshchagina, K. P.**, Shatilina, Z. M., Bedulina, D. S., Gurkov, A. N., Axenov-Gribanov, D. V., Baduev, B. K., Kondrateva, E. S., Gubanov, M. V., Zadereev, E. S., Sokolova, I. M., Timofeyev, M. A. Salinity modulates thermotolerance, energy metabolism and stress response in amphipods *Gammarus lacustris* // PeerJ. – 2016. – 4:e2657. <https://doi.org/10.7717/peerj.2657> **IF 2,118** (Q1).

3. Axenov-Gribanov, D. V., Bedulina, D. S., Shatilina, Zh. M., Jakob, L., **Vereshchagina, K. P.**, Lubyaga, Y. A., Gurkov, A. N., Shchapova, E. P., Luckenbach, T., Lucassen, M., Sartoris, F. J., Pörtner, H. O., Timofeyev, M. A. Thermal preference ranges correlate with stable signals of universal stress markers in Lake Baikal endemic and Holarctic amphipods // PloS One. – 2016. – 11 (10): e0164226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164226> **IF 2,776** (Q1).

4. Drozdova, P., Madyarova, E., Dimova, M., Gurkov, A., **Vereshchagina, K.**, Adelshin, R., Timofeyev, M. The diversity of microsporidian parasites infecting the Holarctic amphipod *Gammarus lacustris* from the Baikal region is dominated by the genus *Dictyocoela* // Journal of Invertebrate Pathology. – 2020. – P. 107330. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107330> **IF 2,101** (Q1).

5. Shchapova, E. P., Axenov-Gribanov, D. V., Lubyaga, Y. A., Shatilina, Z. M., **Vereshchagina, K. P.**, Protasov, E. S., Madyarova, E. V., Timofeyev, M. A. Crude oil at concentrations considered safe promotes rapid stress-response in Lake Baikal endemic amphipods // Hydrobiologia. – 2017. – V. 805. – № 1. – P. 189 – 201. doi: 10.1007/s10750-017-3303-3 **IF 2,056** (Q1).

6. Drozdova, P., Rivarola-Duarte, L., Bedulina, D., Schreiber, S., Axenov-Gribanov, D., Gurkov, A., Shatilina, Zh., **Vereshchagina, K.**, Lubyaga, Y., Madyarova, E., Otto, C.,

Jühling F., Busch W., Jakob L., Lucassen M., Sartoris F. J., Hackermüller J., Hoffmann S., Pörtner, H.-O., Luckenbach, T., Timofeyev, M., Stadler, P. F. Comparison between transcriptomic responses to short-term stress exposures of a common Holarctic and endemic Lake Baikal amphipods // BMC Genomics. – 2019. – V. 20. – № 1. – P. 1 – 14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6024-3> IF 3,730 (Q1).

7. Axenov-Gribanov, D. V., Bedulina, D. S., Shirokova, Y. A., Emshanova, V. A., Lubyaga, Y. A., Vereshchagina, K. P., Saranchina, A.E., Pobezhimova, T.P., Timofeyev, M. A. Diet influence on mechanisms of non-specific stress-response in Baikal endemic amphipod species during long-term laboratory exposure // Crustaceana. – 2019. – V. 92. – №. 11-12. – P. 1349-1368. IF 0,517(Q2).

8. Bedulina, D. S., Takhteev, V. V., Luckenbach, T., Pogrebnyak, S. G., Govorukhina, E. B., Madjarova, E. V., Lubyaga, Y. A., **Vereshchagina, K. P.**, Timofeyev, M. A. On *Eulimnogammarus messerschmidtii*, sp. n. (Amphipoda: Gammaridea) from Lake Baikal, Siberia, with redescription of *E. cyanooides* (Sowinsky) and remarks on taxonomy of the genus *Eulimnogammarus* // Zootaxa. – 2014. – V. 3838. – № 5. – P. 518 – 544. IF 0,931(Q2).

9. **Vereshchagina, K. P.**, Lubyaga, Y. A., Axenov-Gribanov, D. V., Gurkov, A. N., Kondratieva, E. S., Shchapova, E. P., Prokosov, S. O., Shatilina, Z. M. The particularities of nonspecific stress resistance mechanism activation in Baikalian endemic amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebb, 1899) under thermal stress (short communication) // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2014. – V. 10. – № 4. – P. 131 – 138.

10. Axenov-Gribanov, D. V., Shatilina, Z. M., Lubyaga, Y. A., Emshanova, V. A., **Vereshchagina, K. P.**, Lozovoy, D. V., Kondratieva, E. S., Timofeyev, M. A. Estimation of experimental cohabitation between Golarctic and Baikal endemic amphipods species: *G. lacustris* against *G. fasciatus* // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2018. – V. 14. – №. 1. – P. 5 – 11.

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

Тезисы докладов:

1. **Vereshchagina, K. P.**, Kondrateva, E. S., Mutin, A. D., Axenov-Gribanov, D. V., Madyarova, E. V., Timofeyev, M. A. Adaptation to cold as a possible advantage of Lake Baikal endemic amphipods *Eulimnogammarus verrucosus* and *E. cyaneus* compared to a potential invader *Gammarus lacustris* // 18th International Colloquium on Amphipoda (ICA). 26 – 30 August 2019 – Dijon, France. – P. 73.

2. **Vereshchagina, K.**, Kondrateva, E., Axenov-Gribanov, D., Madyarova, E., Timofeyev, M. Adaptation to cold as a possible key to the uniqueness of Lake Baikal endemic amphipods // European Large Lakes Symposium – IAGLR (International Association of Great Lakes Research) “Big lakes small world”. 23 – 28 September 2018 – Evian, France. – P. 57.

3. **Верещагина, К. П.** Поиск и выделение антифризных белков, обладающих криопротекторными свойствами, у представителей экстремофильной эндемичной фауны амфипод оз. Байкал // III Международная научная конференция «Наука будущего» и IV Всероссийский форум «Наука будущего – наука молодых», 14 – 17 мая 2019 г. – Сочи. – С. 66.

4. **Верещагина, К. П.,** Кондратьева, Е. С., Аксенов-Грибанов, Д. В., Емшанова, В. А., Тимофеев, М. А. Оценка активности антиоксидантных ферментов байкальских амфипод при длительной холодной и тепловой акклимации // Биология - наука XXI века: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. 23 – 27 апреля 2018 г. – Пущино. – С. 385 – 386.

5. **Верещагина, К. П.,** Кондратьева, Е. С., Аксенов-Грибанов, Д. В., Тимофеев, М. А. Устойчивость к холоду как ключевой механизм уникальности байкальских эндемичных амфипод // Международная конференция "Пресноводные экосистемы – современные вызовы". 10 – 14 сентября 2018 г. – Иркутск, пос. Листвянка. – С. 354 – 355.

6. **Vereshchagina, K.,** Lubyaga, Y., Shatilina, Z., Zadereev, E., Timofeyev, M. Can adaptation to habitats with different salinity regimes modulate the energy metabolism, cellular stress responses and thermal tolerance in amphipod *Gammarus lacustris* Sars? // 17th International Colloquium on Amphipoda. 4 – 7 September 2017. – Trapani, Italy. – Vol. 8. – № 2. – P. 627 – 628.

7. **Vereshchagina, K. P.,** Lubyaga Y. A., Shatilina Z. M., Zadereev E. S., Gurkov A. N., Timofeyev M. A. Salinity modulates thermotolerance, energy metabolism and stress response in amphipods *Gammarus lacustris* Sars. 13th International Conference on Salt Lake Research (ICSLR2017), 21 – 25 August 2017, Ulan-Ude, Russia. – P. 25 – 26.

Проведение работ по теме исследования осуществлялось в рамках научных проектов: грант РФФ-объединение им. Гельмгольца (Германия) «Влияние изменения климата на адаптированных к холоду эндемиков озера Байкал» № 18-44-06201; грант РФФ «Эндемичные байкальские амфиподы как экстремофилы: механизмы резистентности к гипероксии в условиях воздействия ультрафиолетового излучения и высокого давления на физиологическом, биохимическом и молекулярно-биологическом уровнях» № 17-14-01063; грант РФФИ мол_а «Акклимационный потенциал и энергетические механизмы Байкальских эндемичных и Палеарктических амфипод в условиях изменения абиотических факторов среды» №16-34-00687; грант РФФИ «Разработка подходов к созданию лабораторных культур эндемичных амфипод озера Байкал, аборигенных и инвазивных видов амфипод и десятиногих раков Беларуси» №19-54-04008 Бел_мол_а.