

ORIGINAL ARTICLE

A Comparative Study of Antioxidant Enzymes Activity to Heat Shock in Amphipods *Gmelinoides fasciatus* of Littoral Community of Lake Baikal and Thermal Springs

Lubyaga Y.A.¹, Trifonova M.S.³, Nikolaeva A.K.¹,
Emshanova V.A.¹, Axenov-Gribanov D.V.^{1,2}, Gurkov A.N.¹,
Shatilina Z.M.^{1,2}, Timofeev M.A.¹

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

² ANO Baikal Research Centre. 664003 Irkutsk, 21 Lenin str., Russia

³ Institute of Limnology, 196105, St. Petersburg, Sevastyanov str., 9, Russia

*Tel.: ++7(3952) 243077

*E-Mail: yuliya.a.lubyaga@gmail.com

Received October 17, 2016

The aim of the current study was to comparative assessment of the antioxidant enzymes activity (peroxidase, catalase, glutathione S-transferase) in endemic species *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899) inhabitants of the littoral community of the Lake Baikal and the thermal spring under short term thermal stress. It was shown, that the exposure of *G. fasciatus* from different areas to acute temperature stress didn't lead to changes in the activities of three key enzymes of the antioxidant system. However, it was found that the activity of glutathione S-transferase in the control animals of thermal springs population is higher than in animals of Lake Baikal. This can be determined by peculiarities of environment of different populations.

Key words: Amphipods, antioxidant enzymes, Baikal, stress, thermal springs

Озеро Байкал является крупнейшим центром биоразнообразия пресноводных амфипод. В составе его фауны описано свыше 350 видов и подвидов (Тахтеев, 2000; Камалтынов, 2001; Väinölä *et al.*, 2008). Известно, что высокий уровень видообразования в Байкале, привел к формированию уникальной и разнообразной эндемичной фауны, большей частью не выходящей за его пределы. Лишь малая часть видов расселилась вниз по течению рек Ангара и Енисей (Базикалова, 1945, и др.). Исключение представляет лишь один вид байкальского происхождения - *Gmelinoides fasciatus* (Stebb., 1899). Данный вид характеризуется большой морфологической изменчивостью и высокой экологической пластичностью (Базикалова, 1945; Бекман, 1962; Механикова, 2000). Представители данного вида населяют мелководные участки открытого Байкала, в основном до глубин 5 м, однако вид наиболее обилен в прибрежно-соровой зоне, хорошо прогреваемых заливах и бухтах (Лимнология..., 1977). Это связано с его относительной термофильностью, тогда как большая часть представителей байкальской фауны характеризуется холодолюбивостью (Тимофеев, Кириченко, 2004). Кроме того, представители *G. fasciatus* способны совершать протяженные миграции вдоль береговой линии в самом Байкале, благодаря чему вид достиг ряда термальных источников в окрестностях Байкала (Золотой Ключ, Гусихинский, Киронский, Верхняя Заимка), в водах которых обитает в массовом количестве при температурах до 29 °C (Тахтеев, 2009). Кроме того, *G. fasciatus* был объектом плановой акклиматизации в ряд озер и водохранилищ СССР, из которых стал активно расселяться в другие водоемы. Обзор современного

естественного и искусственного ареалов вида, охватывающих европейскую и азиатскую части России от Волго-Балтийского бассейна до бассейна Амура, содержится в работе Матафонова и др. (2005). Вероятные причины способности этого вида к успешному освоению водоемов за пределами естественного ареала, их вселению в нехарактерные экосистемы могут быть связаны с физиолого-биохимическими особенностями, обеспечивающими высокий уровень экологической пластичности и возможность адаптации к новым условиям обитания.

Целью данного исследования являлась сравнительная оценка активности ферментов антиоксидантной системы (АОС) в условиях острого температурного стресса у амфипод вида *G. fasciatus* - обитателей литорали оз. Байкал и термального источника Верхняя Заимка.

MATERIALS AND METHODS

В работе использовали представителей популяции термального источника Верхняя Заимка, располагающийся в пределах Байкальской рифтовой зоны (Тахтеев, Галимзянова, 2009). Вода источника характеризуется как гидрокарбонатно-сульфатно-хлоридная магниевое-кальциевое-натриевая. Среда слабощелочная, общая минерализация составляет 164,6 мг/дм³. Термальное поле, протяженностью не менее 400–450 м, начинается с основного выхода (28,8 °C) и обширной топи с мелкими высачиваниями. Амфиподы в массе обитают в разливах мелких излияний, при температурах 21–25°C. Также *G. fasciatus* был отловлен в литорали оз. Байкал в районе п. Большие Коты (Южный Байкал) при температуре 9°C. Сбор

амфипод производился гидробиологическим сачком.

В ходе исследования проведены эксперименты по экспонированию рачков в условиях острого теплового шока при температуре 27 °С после трехдневной акклимации при температуре 6°С в аквариумах с аэрируемой байкальской водой. Перед началом эксперимента были зафиксированы контрольные образцы амфипод сразу после акклимации. Время эксперимента составило 24 ч. После экспериментов рачков фиксировали в жидком азоте и проводили дальнейшие биохимические анализы. Эксперименты проведены в 5 биологических параллелях.

Оценку изменения активности ферментов (АОС) (пероксидазы, каталазы, глутатион S – трансферазы) производили методами спектрофотометрического анализа, согласно методикам Drotar (1985), Aebi (1984) и Habig (1974) соответственно (Тимофеев, 2010). Измерения проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, США) при $\lambda=340$ нм для пероксидазы, при $\lambda=240$ нм для каталазы и при $\lambda=436$ нм для глутатион S- трансферазы. Биохимический анализ каждой пробы проведен в 3-х аналитических измерениях. Сравнение контрольных значений активностей ферментов АОС между двумя проанализированными популяциями проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Динамика активностей ферментов в условиях теплового шока была аппроксимирована с помощью регрессионного анализа, проведенного в статистическом пакете R (R Core Team, 2016). В случае глутатион S – трансферазы использовали линейную регрессию. Активности пероксидазы и каталазы у особей из термального источника показали нелинейную динамику и были аппроксимированы с помощью

экспоненциальной (1) и логнормальной функций (2) соответственно. Для сравнения, динамики активностей пероксидазы и каталазы у популяции из литорали оз. Байкал были аппроксимированы аналогичными регрессионными моделями. На графиках изображены средние значения $\pm$ стандартные отклонения.

$$y = a + e^{bx} \quad (1)$$

$$y = \frac{a}{x+b} e^{\left(\frac{\ln(x+b)}{c}\right)^2} \quad (2)$$

RESULTS AND DISCUSSION

В результате проведенных исследований были обнаружены различия в активности глутатион S-трансферазы у контрольных групп разных популяций *G. fasciatus*. Так, у *G. fasciatus* из термального источника активность глутатион S-трансферазы была выше ($6,0 \pm 0,7$ нКат/мг белка), чем у представителей этого вида из литорали оз. Байкал ($4,3 \pm 0,45$ нКат/мг белка). В условиях эксперимента у обеих групп *G. fasciatus* активность данного фермента оставалась в пределах контрольных значений на протяжении всего времени экспозиции (Fig. 1).

Активность фермента пероксидазы в контрольных группах *G. fasciatus* имела одинаковые значения, и составила $0,019 \pm 0,007$ нКат/мг белка. Тенденцию к снижению активности пероксидазы наблюдали после 1 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч экспозиции у группы *G. fasciatus* из термального источника. Так, минимальная активность данного фермента была отмечена у представителей данной популяции при 3 ч экспозиции, и составил $0,009 \pm 0,005$ нКат/мг белка. У амфипод из литорали оз. Байкал наименьшая активность данного фермента

наблюдали после 6 ч экспозиции ($0,015 \pm 0,005$ нКат/мг белка), что находится в пределах контрольных значений. При достижении 24 ч экспозиции активность пероксидазы у обеих

популяций *G. fasciatus* достигла наибольшего значения, составив $0,021 \pm 0,65$ нКат/мг белка (Fig. 2).

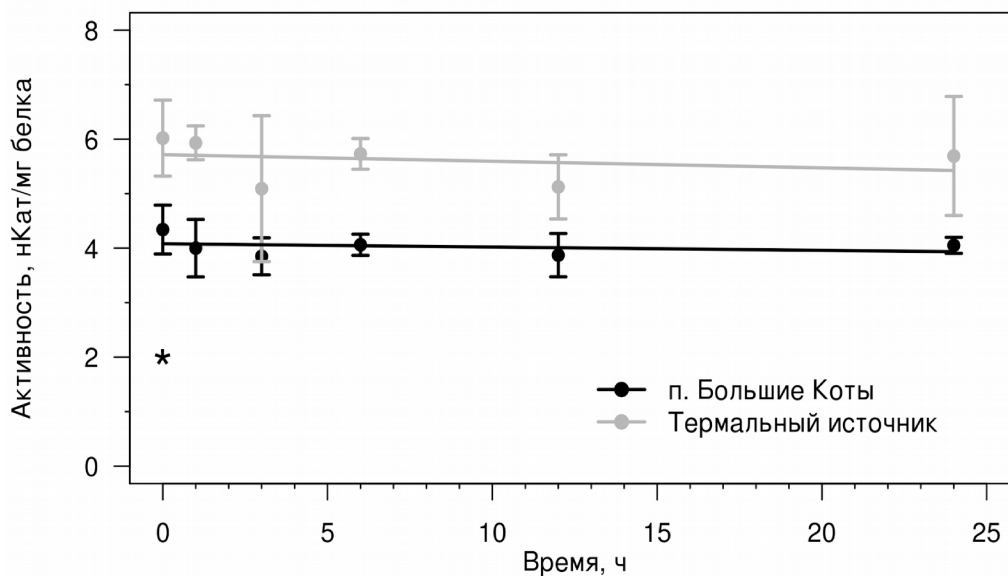


Figure 1. Изменение активности глутатион S-трансферазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *G. fasciatus* из литорали оз. Байкал и термального источника Верхняя Заимка в условиях острого повышения температуры среды (27°C).

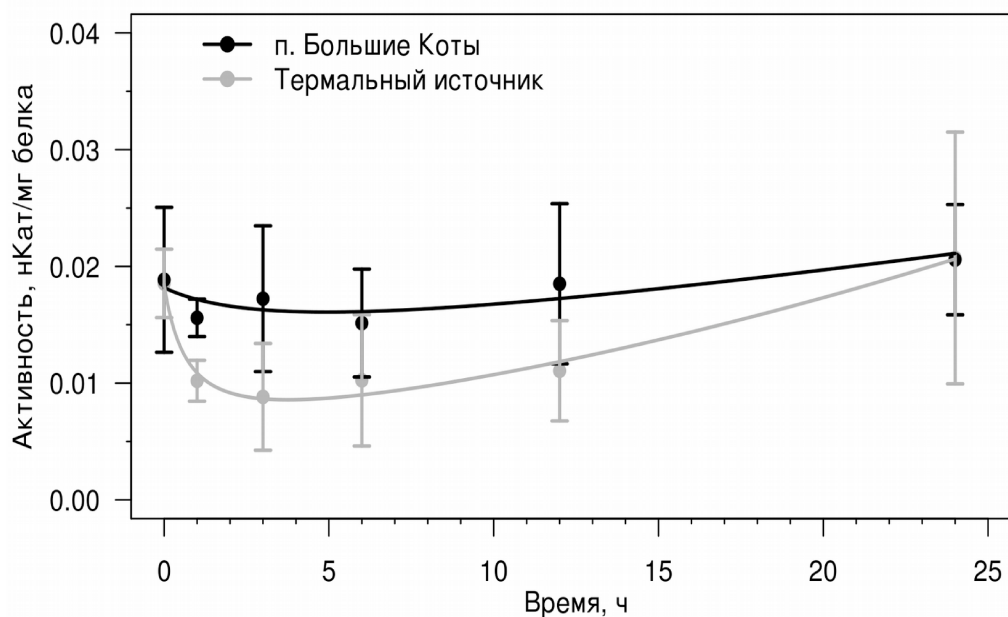


Figure 2. Изменение активности пероксидазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *G. fasciatus* из литорали оз. Байкал и термального источника Верхняя Заимка в условиях острого повышения температуры среды (27°C).

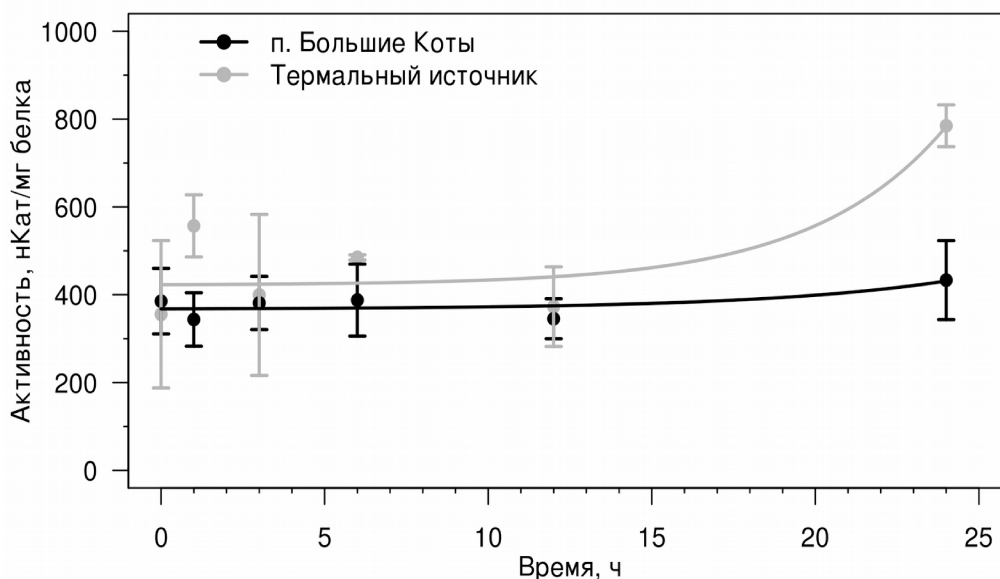


Figure 3. Изменение активности каталазы (в нКат/мг белка) при экспозиции амфипод *G. fasciatus* из литорали оз. Байкал и термального источника Верхняя Заимка в условиях острого повышения температуры среды (27°C).

Значения активности каталазы в контрольных группах *G. fasciatus* различались не значительно и составляли $355,0 \pm 167,8$ нКат/мг белка у амфипод из термального источника, и $385,0 \pm 74,7$ нКат/мг белка у особей из литорали оз. Байкал. При экспозиции в условиях острого температурного шока (27 °C) отмечены различия в активности данного фермента. Так, у *G. fasciatus* из оз. Байкал активность каталазы была в пределах контрольных значений на протяжении всего эксперимента, тогда как у рачков из термальных источников отмечали тенденцию к повышению активности данного фермента после 1 ч, 6 ч и 24 ч экспозиции. Максимальная активность каталазы у данной популяции была отмечена после 24 ч экспозиции ($785,0 \pm 47,6$ нКат/мг белка), а самая низкая активность фермента составила $373,0 \pm 90,6$ нКат/мг белка и наблюдалась у той же экспериментальной группы после 12 ч экспозиции (Fig. 3).

Таким образом, у представителей *G. fasciatus* из сравниваемых районов обитания,

острое температурное воздействие не вызывает достоверного изменения активности трех ключевых ферментов АОС, что подтверждает ранее полученные нами данные о устойчивости данного вида к высоким температурам (Тимофеев, 2010). При этом у особей из термального источника Верхняя Заимка обнаружена повышенная активность глутатион S-трансферазы в базальном уровне, в сравнении с активностью фермента амфипод *G. fasciatus* – представителей оз. Байкал. Это может быть обусловлено особенностями гидрохимического состава термального источника и его температурного режима, где амфиподы обитают в условиях высоких физиологических температур (21–25°C), низком содержании кислорода, повышенной минерализации ($164,6 \text{ мг/дм}^3$) и слабощелочной среде (PH=8,2). Возможно, длительное существование в данных условиях привело к повышению активности именно глутатион S-трансферазы, как фермента антиоксидантной системы, способного восстанавливать

гидроперекисные группы окисленных фосфолипидов непосредственно в мембранах без их предварительного фосфолипазного гидролиза (Тимофеев, 2010), что обеспечивает представителям *G. fasciatus* из термального источника дополнительную резистентность.

ACKNOWLEDGEMENTS

Авторский коллектив выражает благодарность д.б.н. Тахтееву В.В. за организацию экспедиции и помощь в вылове и транспортировке амфипод из термального источника Верхняя Заимка. Хадеевой Е.Р. за проведение гидрохимического анализа воды термального источника Верхняя Заимка.

Работа выполнена при основной финансовой поддержки гранта РНФ 14-14-00400, а также частичной финансовой поддержке грантов РФФИ 16-34-60060 мол_а_дк, 15-29-01003 офи_м и Госзадания Минобрнауки РФ 1354–2014/51, 6.742.2016/ДААД, 6.734.2016/ДААД.

REFERENCES

- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.
- Bazikalova A.Y. (1945) Amphipods in Lake Baikal. *Proc. of Baikal. limnologist. Station*, **11**, 1-440.
- Beckman M.Y. (1962) Ecology and productions *Micruropus possolskii* Sow. and *Gmelinoides fasciatus* Stebb. Systematics and crustacean ecology in Lake Baikal. *Limnology Institute*, **2** (22), **1**, 141-155.
- Drotar A., Phelps P., and Fall R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.*, **42**, 35–40.
- Habig W.H., Pabst M.J., and Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139.
- Kamaltynov R.M. (2001) Amphipods (Amphipoda: Gammaroidea). Annotated list of fauna of Lake Baikal and its catchment basin.
- Limnology coastal zone of Lake Baikal (1977) Edit. N.A. Florensov, Nauka, Novosibirsk.
- Matafonov D.V., Itigilova M.T., Kamaltynov R.M., Faleichik L.M. (2005) Baikalian endemic *Gmelinoides fasciatus* (Micruropodidae, Gammaroidea, Amphipoda) in the lake Arahley. *Zoological journal*, **84**(3), 321-329.
- Mekhanikova I.V. (2000) Morpho-ecological adaptation of Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* to living conditions in the water bodies of different types. *Research aquatic ecosystems of East Siberia*, 104-114.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Tahteev V.V. (2000) Essays on the Lake Baikal amphipods (systematics, comparative ecology, evolution). Irkut. St. Univ, Irkutsk.
- Tahteev V.V. (2009) Amphipods (Amphipoda) of thermal and mineral springs, the northern part of Baikal region. *Biota waters of the Baikal Rift Zone*, 123-130.
- Tahteev V.V., Galimzyanova A.V. (2009) Baikal springs. *Ecology and Life*, **3**(88), 40-45.
- Timofeev M.A., Kirichenko K.A. (2004) Experimental evaluation of the role of abiotic factors in limiting the spread of endemic beyond Lake Baikal on the example of amphipods. *Siberian Ecological Journal*, **1**, 41-50.
- Timofeyev M.A. (2010) Ecological and physiological aspects of adaptation to abiotic environmental conditions of Baikalian endemic and Palearctic amphipods. Thesis for Dr.Sci. degree. Tomsk, 384.

- Väinölä R., Witt J.D.S., Grabowski M., Bradbury J.H., Jazdzewski K., Sket B. (2008) Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 241–255.