

На правах рукописи



БЕДУЛИНА Дарья Сергеевна

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И
КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У БАЙКАЛЬСКИХ И
ПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ АМФИПОД**

03.00.16 - экология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Борок
2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет», г. Иркутск.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
Тимофеев Максим Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Чуйко Григорий Михайлович

Институт биологии внутренних вод им.
И.Д. Папанина РАН, п. Борок

доктор биологических наук

Боровский Геннадий Борисович

Сибирский институт физиологии и
биохимии растений РАН, г. Иркутск

Ведущая организация:

Учреждение Российской Академии наук
Институт биологии развития им. Н.К.
Кольцова РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «27» октября 2009 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета ДМ 002.036.01 при Учреждении Российской Академии Наук Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

по адресу: 152742, п. Борок, Некоузского р-на, Ярославской обл. Тел./факс:(48547)24042

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской Академии Наук Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Автореферат разослан « 24 » сентября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Л. Г. Корнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В процессе своей жизнедеятельности водные организмы постоянно сталкиваются с изменениями различных факторов среды обитания, подвергаясь стрессам. Температурный фактор оказывает существенное влияние на все уровни структурной организации гидробионтов, от организменного до клеточного (Hoffman and Hercus, 2000; Teotónio and Rose, 2000; Badyaev, 2005). Глобальные климатические изменения, и в первую очередь повышение среднегодовых температур, крайне неблагоприятно сказываются на состоянии водных экосистем. Особенно негативно эти изменения могут отразиться на существовании древних пресноводных сообществ, население которых представлено в основном узкоадаптированными видами-эндемиками (Brooks et al., 2006, Forest et al., 2007 и др.). Одной из таких экосистем является озеро Байкал, характеризующееся огромным биоразнообразием, высоким уровнем эндемизма, и являющееся одним из наиболее известных центров интенсивного видообразования. Глобальные климатические изменения уже отразились на температурном режиме озера. По последним данным, с 1946 года отмечается повышение средних поверхностных температур в Байкале на 1–2 градуса, что уже отразилось на процессах формирования планктонных сообществ (Hampton et al., 2008; Kozhova, 1987; Поповская, 1971; Bondarenko, 1999). Однако оценок возможного влияния повышенных температур на состояние байкальского бентоса до настоящего времени практически не проводилось. Эндемичные амфиподы (Crustacea, Amphipoda) являются одной из важнейших бентосных групп организмов Байкала, как по видовому составу, так и по биомассе. Амфиподы представлены в Байкале значительным разнообразием форм и обитают в широком диапазоне экологических условий (Тахтеев, 1998–2000; Тахтеев и др., 2003). До настоящего времени исследования устойчивости к температурному фактору у байкальских амфипод были проведены в основном на этологическом (поведенческом) и физиологическом уровнях (Тимофеев, 2000; Тимофеев, Кириченко, 2004). При этом, и в целом по группе, клеточные механизмы резистентности амфипод к температурному фактору на сегодняшний день остаются недостаточно исследованными. Имеется лишь несколько работ в этом направлении для морских (Patarnello, 1992; Lahdes, 2003; Brown et al., 1995) и пресноводных амфипод (Sures, Radszuweit 2008). Некоторые клеточные механизмы стресс-ответа на температурное воздействие у байкальских и палеарктических амфипод освещены в работах М.А. Тимофеева и Ж.М. Шатилиной (Тимофеев и др., 2005–2006, Шатилина и др., 2005). Тем не менее, проблема изучения специфики этих механизмов у байкальских эндемиков в связи с возможным негативным влиянием глобальных климатических изменений на состояние экосистемы озера на сегодняшний день стоит достаточно остро и требует дальнейшего освещения.

Цель исследования. Целью данного исследования являлось изучение влияния повышенной температуры на клеточные механизмы резистентности у байкальских и палеарктических амфипод и установление различий в данных механизмах.

Для достижения цели исследования необходимо было решить следующие **задачи**:

- 1) исследовать влияние повышенной температуры на активность ключевых ферментов антиоксидантной системы у байкальских и палеарктических амфипод;
- 2) провести оценку уровня конститутивного синтеза белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ, иммунохимически родственных α -кристаллину, у байкальских и палеарктических амфипод;

3) изучить количественные изменения в синтезе белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ у байкальских и палеарктических амфипод, экспонированных при повышенных температурах.

Научная новизна. Впервые были получены данные об изменениях активности пероксидазы у таких байкальских литоральных амфипод как *Pallasea cancelloides*, *Gmelinoides fasciatus* и глубоководных *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus* при воздействии повышенных температур (20 и 25°C). Впервые были получены данные о воздействии гипертермии на показатели активности каталазы и глутатион S-трансферазы у ряда байкальских литоральных и глубоководных, а также палеарктических видов амфипод. Впервые был проведен сопоставительный анализ конститутивного синтеза БТШ у байкальских литоральных, глубоководных, а также палеарктических видов. Данные были сопоставлены с имеющимися материалами по термоустойчивости видов. Была прослежена зависимость уровня конститутивного синтеза белков теплового шока семейства БТШ70 от термотолерантности вида. Впервые были получены данные об особенностях температурно-индуцированного синтеза белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ у байкальских литоральных и глубоководных амфипод и палеарктических *Gammarus lacustris* и *Gammarus pulex*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы могут найти применение при прогнозировании влияния глобального изменения климата на состояние водных экосистем, в первую очередь уникальной экосистемы оз. Байкал. Полученные данные могут быть применены для разработки высокоэффективных маркеров состояния биоценозов озера, могут быть полезны в освещении вопросов экологии и эволюции байкальской фауны. Материалы исследования включены в отчеты лаборатории «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии при ИГУ по проектам РФФИ – гранты: 04-04-63098-к, 02-04-48677, 05-04-97239, 05-04-97263, 06-04-48099, 08-04-100065, 08-04-00928, 09-04-00398; ФЦП Министерства образования РФ: 2.1.1/982 , 2.2.2.3.10067, 2.1.1/8069, 2.2.2.3, 02.442.11.7120. Материалы данного исследования используются в учебном процессе ИГУ при чтении курсов лекций на биолого-почвенном факультете («Практикум по экологии», «Современные проблемы лимнологии» и др.), при проведении полевых учебных практик студентов ИГУ, а также включены в программу российско-германской летней школы «Лимноэкология озера Байкал» (ИГУ – Университет Кристиана-Альбрехта, г. Киль, Германия).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспозиция амфипод при повышенных температурах ведет к изменениям в активности антиоксидантных ферментов у литоральных видов. У глубоководных видов *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus* однозначно выраженной реакции антиоксидантных ферментов не обнаружено.
2. У глубоководных видов *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus* обнаружены наименьшие уровни конститутивного синтеза белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ, иммуннохимически родственных α -кристалину, относительно литоральных видов.
3. Экспозиция амфипод при повышенных температурах ведет к увеличению содержания белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ у большинства видов. Исключение составляют виды *Eulimnogammarus cyaneus* и *Gammarus pulex*, у которых не отмечено достоверного увеличения содержания нмБТШ.
4. Для литоральных видов амфипод характерен интенсивный синтез белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ в ходе всего периода экспозиции, однако у

глубоководных амфипод детектируемое увеличение синтеза БТШ70 и нмБТШ фиксируются с задержкой.

Апробация работы. Об основных результатах докладывалось на следующих конференциях: Всероссийской школе-семинаре с международным участием «Концептуальные и практические аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных», Томск, 2004 г.; Международной научной конференции «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных», Саранск, 2005 г.; Ежегодной научно-теоретической конференции молодых ученых Иркут. гос. ун-та, Иркутск, 2006 г.; Международной научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2», Борок, 2007 г.; I Международной школы-конференции «Актуальные вопросы изучения микро-, мейо-зообентоса и фауны зарослей пресноводных водоемов», Борок, 2007 г.; Ежегодной научно-теоретической конференции аспирантов и студентов Иркут. гос. ун-та, 2007 г., III Всероссийской конференции по водной токсикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы», конференции по гидроэкологии «Критерии оценки качества вод и методы нормирования антропогенных нагрузок» и школе-семинаре «Современные методы исследования и оценки качества вод, состояния водных организмов и экосистем в условиях антропогенной нагрузки», Борок, 2008 г.; Международном Симпозиуме “Environmental Physiology of Ectotherms and Plants” (ISEPEP3), Япония, 2009 г.; «3-rd US-Russia conference on Aquatic Animal Health”, США, 2009 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано и принято в печать 42 работы. Из них: статей в зарубежных журналах (системы Web of Science) – 5; статей в российских изданиях, рекомендованных ВАК, – 8; в других изданиях (журналах и вестниках, не входящих в список ВАК) – 7; тезисов конференций – 22.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 153 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию систематической принадлежности и экологии исследованных видов, методической и экспериментальной частей, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа включает 39 рисунков. Список литературы состоит из 231 источников, из них 82 на русском и 149 на английском языке.

Благодарности. Хочу выразить свою благодарность сотрудникам лаборатории «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии при ИГУ к.б.н. Шатилиной Ж.М., Протопоповой М.В., Павличенко В.В., Сапожниковой Е.А. и Аксенову–Грибанову Д.В. за помощь в сборе материала, постановке экспериментов и обработке данных. Огромную благодарность хочу выразить сотрудникам СИФИБР СО РАН д.б.н. Побежимовой Т.П., к.б.н. Грабельных О.И., к.б.н. Кириченко К.А. за обучение методикам электрофореза и Вестерн-блоттинга, а также за ценные советы и замечания в ходе выполнения и оформления работы. Выражаю мою искреннюю признательность д.б.н. Тахтееву В.В. за обучение и помощь в определении байкальских амфипод; д.б.н. Колесниченко А.В. за ценные советы по проведению биохимических анализов. Благодарю также сотрудников лаборатории «Эволюционной экофизиологии» Зоологического института университета Кристиана-Альбрехта, г. Киль, Германия (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Zoologisches Institut), в особенности доктора Мартина Циммера (PD Dr. Martin Zimmer) за предоставление условий работы с

палеарктическим *Gammarus pulex*. Особая благодарность АНО «Байкальский исследовательский центр» за финансовую и организационную поддержку выполнения данной работы.

ГЛАВА I. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы байкальские виды амфипод: *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf.), *Eulimnogammarus vittatus* (Dyb.), *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.), *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.), *Pallasea cancelloides* (Gerstf.), *Ommatogammarus flavus* (Dyb.) и *Ommatogammarus albinus* (Dyb.), а также палеарктические виды *Gammarus lacustris* Sars. и *Gammarus pulex* (L.)

По литературным данным, терморезистентность выбранных видов представляет собой следующий относительный ряд: *Ommatogammarus flavus* = *Ommatogammarus albinus* < *Eulimnogammarus verrucosus* < *Eulimnogammarus vittatus* < *Eulimnogammarus cyaneus* = *Gammarus pulex* < *Gmelinoides fasciatus* = *Gammarus lacustris*. По возрастанию предпочитаемых температур: *Ommatogammarus flavus* = *Ommatogammarus albinus* (3–4°C) < *Eulimnogammarus verrucosus* = *Eulimnogammarus vittatus* (5–6°C) < *Eulimnogammarus cyaneus* (11–12°C) < *Gammarus lacustris* (15–16°C) < *Gmelinoides fasciatus* (17–18°C) (Тимофеев, 2000; Тимофеев, Кириченко, 2004;).

Материал был собран в 2004–2008 гг. Сбор амфипод проводили на глубине 0,5–1 м с использованием гидробиологического сачка, глубоководные виды отлавливались на глубине 100–400 м с помощью глубоководных ловушек. Байкальских амфипод отлавливали в прибрежной зоне оз. Байкал в районе пос. Листвянка, а также в районе пос. Большие Коты. *Gammarus lacustris* отлавливали в озере, расположенном в черте г. Иркутска в непосредственной близости от р. Ангара, и небольшом озере в районе пос. Большие Коты на расстоянии не более 1 км от побережья оз. Байкал, *Gammarus pulex* – в многочисленных мелководных каналах федеральной земли Шлезвиг Гольштейн и водоемах г. Киль (Германия). Амфипод содержали отдельно по видам, в аэрируемых аквариумах, при температуре 6–8°C. В экспериментах использовали здоровых и активно плавающих рачков, акклиматизированных не менее 1–2 суток. Предварительно акклиматизированных амфипод экспонировали в аэрированных аквариумах (емкостью 0,5–2 литра), помещенных в термостат при различных температурах (20–25–30°C). Длительность экспозиции составляла от 30 минут до 2 суток. Амфипод контрольной группы содержали в условиях аналогичных предварительной акклиматизации (6–7°C). После экспериментов живых рачков замораживали в жидком азоте, а затем производили отбор образцов для биохимического анализа из недифференцируемых тканей.

Методы биохимического анализа

Определение активности ферментов. Активность антиоксидантных ферментов определяли при помощи стандартных спектрофотометрических методик. Активность каталазы устанавливали согласно методике, описанной (Aebi, 1984), пероксидазы по Bergmeyer (1974), глутатион S-трансферазы по Nabis (1974).

Определение специфики синтеза белков. Белок выделяли из недифференцированных тканей амфипод по модифицированной методике (Колесниченко и др., 1999). С белковыми образцами проводили денатурирующий электрофорез в полиакриламидном 12,5-процентном геле в модифицированной системе Лэммли (Laemli, 1970) и последующий «мокрый» Вестерн-блоттинг по методу (Towbin et al. 1979). Мембраны

инкубировали в растворах антител к белкам теплового шока семейств БТШ70 (Sigma) и нмБТШ, иммунохимически родственных α -кристалинам (Stressgen). Для проявки мембран использовали систему BCIP/nBT (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate/ Nitro-Blue Tetrazolium), после чего мембраны сканировали. Калибровку электрофореграмм и расчет молекулярных масс белков проводили с использованием специализированных программ Sigma Gel (USA) и Total Lab V 1.6 (USA).

ГЛАВА II. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Температурно-индуцированное изменение активности пероксидазы у амфипод.

У байкальского *Eulimnogammarus verrucosus* отмечали достоверное снижение активности фермента при 20°C в течение 3-х часов экспозиции (рис.1, 1А). В течение всего 2-суточного эксперимента активность пероксидазы у данного вида оставалась сниженной. Экспозиция рачков данного вида при температуре 25°C вела к еще более выраженному (четырекратному) падению активности фермента, остающейся на таком сниженном уровне до конца 12-часового эксперимента (рис. 1, 1). У *Pallasea cancelloides* экспозиция при температуре 20°C вела к снижению активности фермента на 1 часу эксперимента, с кратковременным возвратом на 3-й час экспозиции, и дальнейшим снижением до конца эксперимента. При трехчасовом экспонировании при 25°C также отмечали снижение активности фермента (рис. 1, 2).

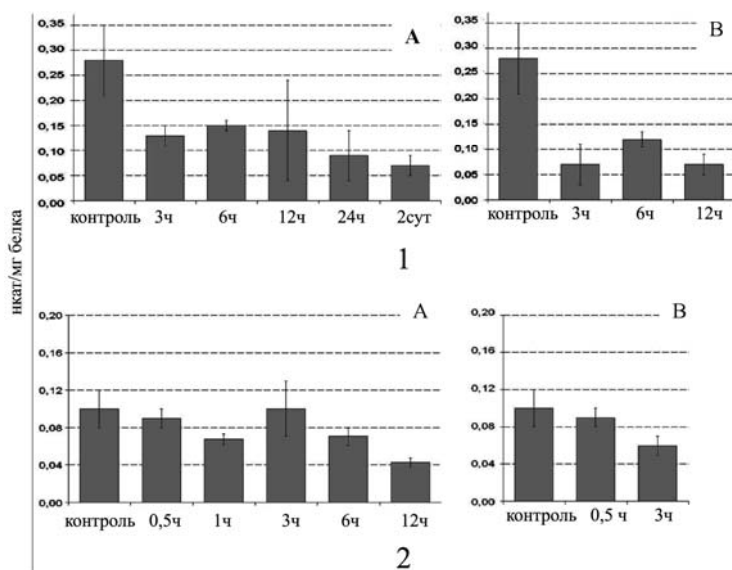


Рис.1. Активность фермента пероксидазы у амфипод, экспонированных при различных температурах.

1 – *Eulimnogammarus verrucosus*, экспонированные при температуре 20°C (А) и 25°C (В),

2 – *Pallasea cancelloides*, экспонированные при температуре 20 °С (А) и при 25 °С (В).

У *Eulimnogammarus cyaneus* экспозиция при температуре 20°C не вызывала статистически достоверных изменений в активности фермента даже на протяжении 3 суток эксперимента (рис. 2, 1А). Повышение температуры до 25°C оказывало более выраженное воздействие, приводя к снижению активности фермента уже к 24 часам экспозиции (рис. 2, 1В). Экспозиция термоустойчивого *Gmelinoides fasciatus* при 25°C вела к достоверному снижению активности пероксидазы уже к 30 минутам экспозиции, однако уже к 12 часам экспонирования активность фермента снижалась до контрольного уровня (рис.2, 2).

Термочувствительных амфипод *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus* экспонировали только при температуре 20°C, поскольку более высокие

температуры приводили к их быстрой гибели. Активность пероксидазы у отдельных экземпляров *Ommatogammarus flavus* колебалась в широком диапазоне, однако достоверной картины повышения или, напротив, понижения активности отмечено не было. Полукасовой эксперимент с экспонированием *Ommatogammarus albinus* также показал широкий диапазон реакций у отдельных рачков и отсутствие выраженной тенденции изменения.

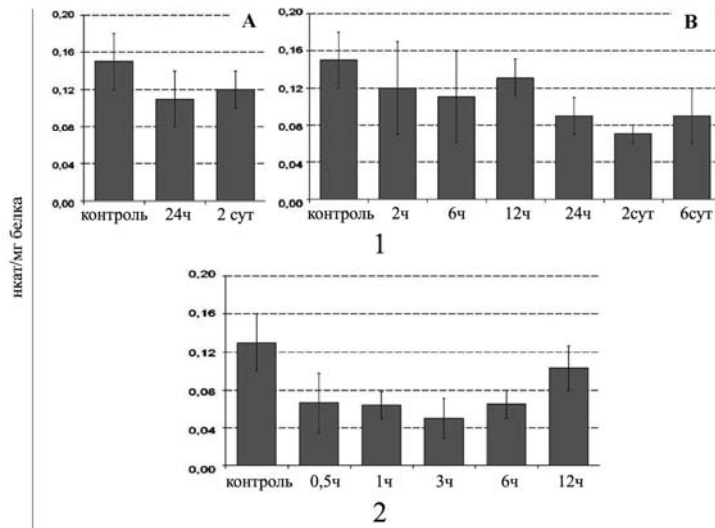


Рис.2. Активность фермента пероксидазы у амфипод, экспонированных при различных температурах.

1 – *Eulimnogammarus cyaneus*, экспонированные при температуре 20 °С (А) и при 25 °С (В),

2 – *Gmelinoides fasciatus*, экспонированные при температуре 25 °С.

У палеарктического *Gammarus lacustris*, экспонированного при 20°C, не отмечали изменений в активности пероксидазы в ходе всего 3-суточного эксперимента. Повышение температуры до 25°C также не вело к существенным изменениям в активности фермента (рис. 3, 1). Наблюдали снижение активности пероксидазы только к двум суткам экспозиции, после чего наблюдали восстановление до контрольного уровня. Экспозиция другого палеарктического вида при 25°C *Gammarus pulex* вела к многократному росту активности фермента (рис. 3, 2).

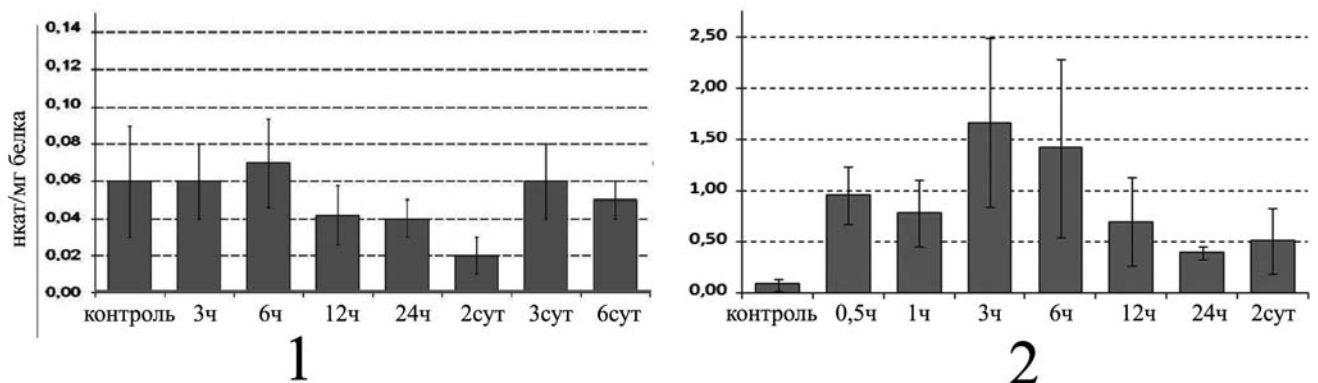


Рис.3. Активность фермента пероксидазы у амфипод, экспонированных при температуре 25 °С.

1 – *Gammarus lacustris*, 2 – *Gammarus pulex*.

Таким образом, показано, что воздействие температуры 20°C не вызывает каких-либо изменений в активности пероксидазы у термоустойчивых амфипод. При температуре 25°C отмечены лишь кратковременные периоды снижения с последующим возвратом показателей активности ферментов к контрольному уровню, либо повышение. Экспозиция менее устойчивых видов при обеих температурах вела к снижению активности пероксидазы. Иная картина отмечена у наиболее

термочувствительных видов *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus*, у которых изменения в реакции пероксидазы были не выражены.

Температурно-индуцированное изменение активности каталазы у амфипод

Температурное экспонирование *Eulimnogammarus verrucosus* при 20°C вело к колебанию уровня активности фермента до 3-х суток (рис. 4, 1). Отмечали достоверный рост активности на период 24 часов экспозиции. Экспозиция при температуре 25°C не приводила к изменениям в активности в ходе 6 часов экспонирования, однако к 24 часам отмечали рост показателя активности фермента. У *Eulimnogammarus cyaneus* экспозиция при температуре 20°C вела к последовательному достоверному росту активности каталазы, достигшей своего максимума к моменту окончания 2-суточного эксперимента (рис. 4, 2А). Экспонирование рачков данного вида при 25°C также вело к росту активности каталазы (рис. 4, 2В). К 6 суткам экспозиции отмечали снижение активности до контрольного уровня. У байкальского вида *Pallasea cancelloides* отмечали близкие показатели активности каталазы при 20°C и 25°C (рис. 4, 3). Температурная экспозиция амфипод при обеих температурах вел к достоверной активации активности каталазы в начальные периоды экспозиции и снижению до контрольного уровня уже к 3 часам. Далее у амфипод, экспонированных при 20°C, уровень активности фермента оставался близким к контрольному, а у амфипод при 25°C вновь возрастал и держался на повышенном уровне до окончания эксперимента (12 часов).

Экспозиция термоустойчивого *Gmelinoides fasciatus* при 25°C вела к достоверному (двукратному) повышению активности каталазы уже к 30 минутам экспозиции (рис. 4, 4). Далее отмечали кратковременное снижение активности с последующим подъемом к 6 часам.

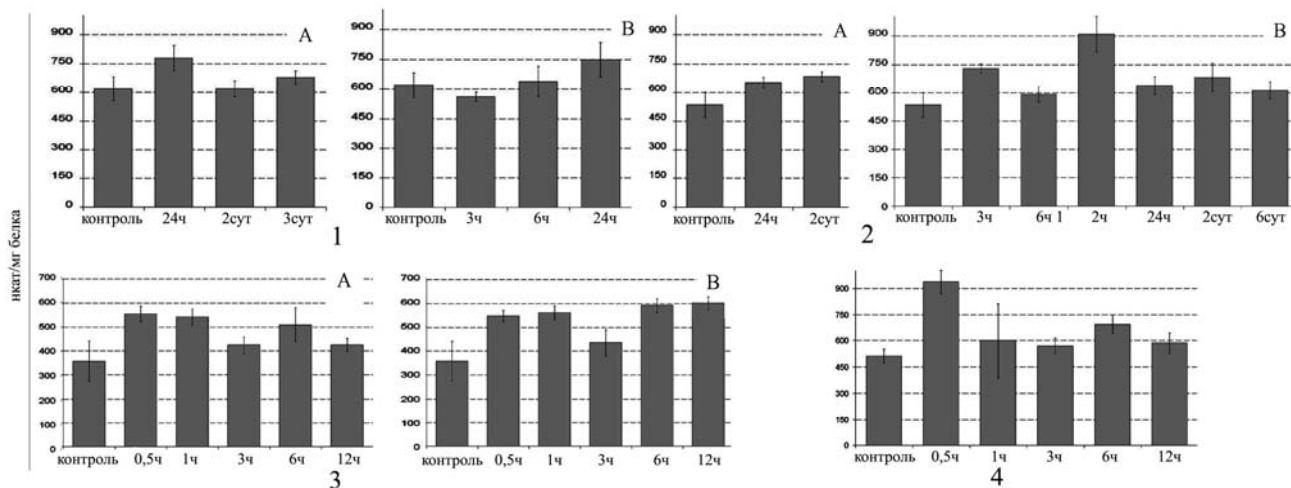


Рис.4. Активность фермента каталазы у амфипод, экспонированных при различных температурах.

1 – *Eulimnogammarus verrucosus*, экспонированные при температуре 20°C (А) и 25°C (В), 2 – *Eulimnogammarus cyaneus*, экспонированные при температуре 20°C (А) и 25°C (В), 3 – *Pallasea cancelloides*, экспонированные при температуре 20°C (А) и при 25°C (В), 4 – *Gmelinoides fasciatus*, экспонированные при температуре 25°C.

Экспозицию термочувствительных амфипод *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus* проводили только при температуре 20°C. Активность каталазы у отдельных особей *Ommatogammarus flavus* колебалась в широком

диапазоне, однако достоверной картины повышения или понижения активности вновь отмечено не было.

У палеарктического *Gammarus lacustris*, экспонированного при 20°C, не отмечали достоверных изменений в активности каталазы в ходе всего 3-суточного эксперимента. Повышение температуры до 25°C вело к достоверному росту активности только на период 6 суток экспозиции (рис. 5, 1). Экспонирование палеарктического *Gammarus pulex* при 25°C также вело к росту активности каталазы к 24 часам экспозиции (рис. 5, 2).

Таким образом, у большинства видов отмечено температурно-индуцированное увеличение активности каталазы. При этом у наиболее термоустойчивого палеарктического вида *Gammarus lacustris* при 20°C не наблюдается изменений в активности каталазы, однако уже при 25°C отмечен статистически достоверный рост. Исключением являются термочувствительные виды рода *Ommatogammarus*. Влияние температуры у обоих видов не вело к достоверным изменениям показателей активности каталазы. Наблюдался большой разброс индивидуальных показателей активности фермента, в то же время какой-либо выраженной общей направленности реакция не имела.

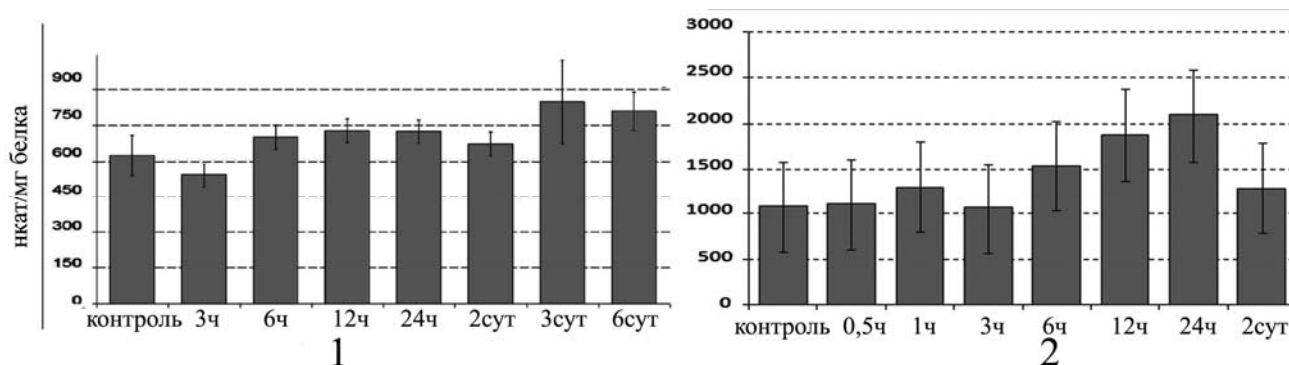


Рис. 5. Активность фермента каталазы у амфипод, экспонированных при температуре 25°C. 1 – *Gammarus lacustris*, 2 – *Gammarus pulex*.

Температурно-индуцированное изменение активности глутатион S-трансферазы у амфипод

У байкальского вида *Eulimnogammarus verrucosus* отмечали достоверное снижение активности глутатион S-трансферазы в обеих температурах уже через 6 часов эксперимента. При этом в случае экспозиции при 20°C отмечали кратковременное восстановление на периоды 24 часа и 2 суток экспозиции, с последующим падением к 3 суткам (рис. 6, 1А). Экспонирование амфипод при 25°C вело к снижению активности ферментов до конца эксперимента (рис. 6, 1В). У *Eulimnogammarus cyaneus* экспозиция при обеих температурах не вызывала статистически достоверных изменений в активности фермента. У байкальского вида *Pallasea cancelloides* отмечены близкие показатели активности глутатион S-трансферазы при экспозиции при 20°C и 25°C (рис. 6, 3). Температурная экспозиция амфипод при обеих температурах вела к достоверному снижению активности фермента. У амфипод, экспонированных при 20°C, уровень активности глутатион S-трансферазы оставался близким к контрольному до 6 часов эксперимента и понижался к 12 часам, а у амфипод при 25°C снижался уже к 3 часам и далее до окончания эксперимента. Экспозиция термоустойчивого *Gmelinoides fasciatus* при 25°C вела к достоверному повышению активности глутатион S-трансферазы уже

через 3 часа экспозиции (рис.6, 2). Далее к 12 часам отмечали снижение активности до контрольного уровня.

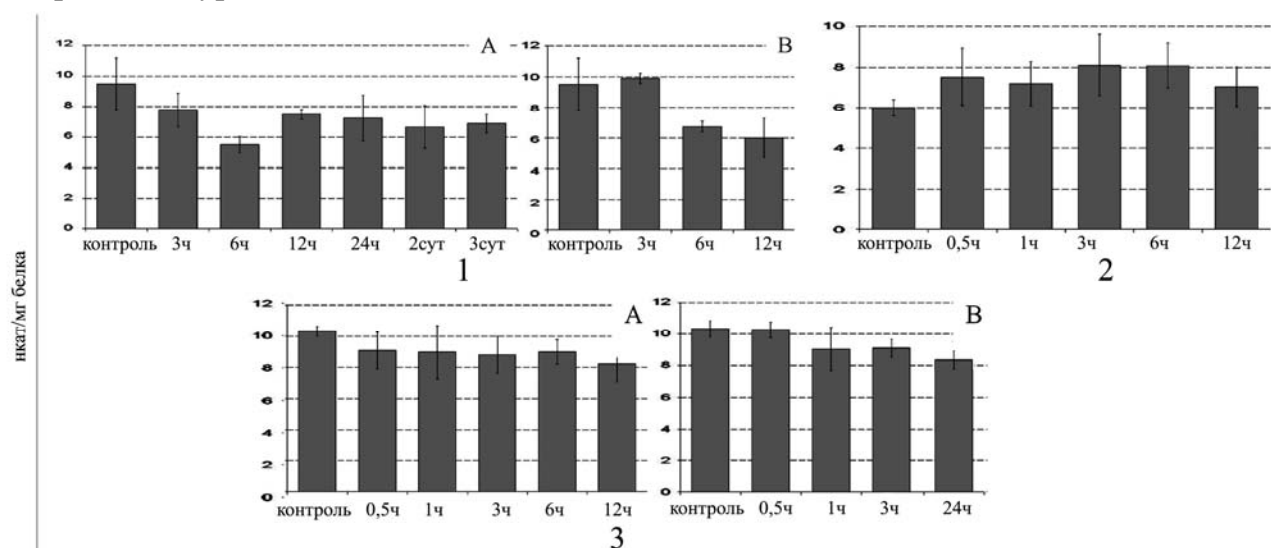


Рис.6. Активность фермента глутатион S-трансферазы у амфипод, экспонированных при различных температурах.

1 – *Eulimnogammarus verrucosus*, экспонированные при температуре 20°C (A) и 25°C (B), 2 – *Gmelinoides fasciatus*, экспонированные при температуре 25°C, 3 – *Pallasea cancelloides*, экспонированные при температуре 20°C (A) и при 25°C (B).

Экспозицию термочувствительных амфипод *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus* проводили только при температуре 20°C. Достоверной картины изменений в активности фермента у обоих видов отмечено не было. У палеарктического *Gammarus lacustris*, экспонированного при 20°C, не отмечали достоверных изменений в активности глутатион S-трансферазы в ходе всего 3-суточного эксперимента. Повышение температуры до 25°C вело к достоверному росту активности на периоды 3 часов и 6-ти суток экспозиции. Экспозиция *Gammarus pulex* при 25°C не вызывала существенных изменений в активности фермента (рис.7).

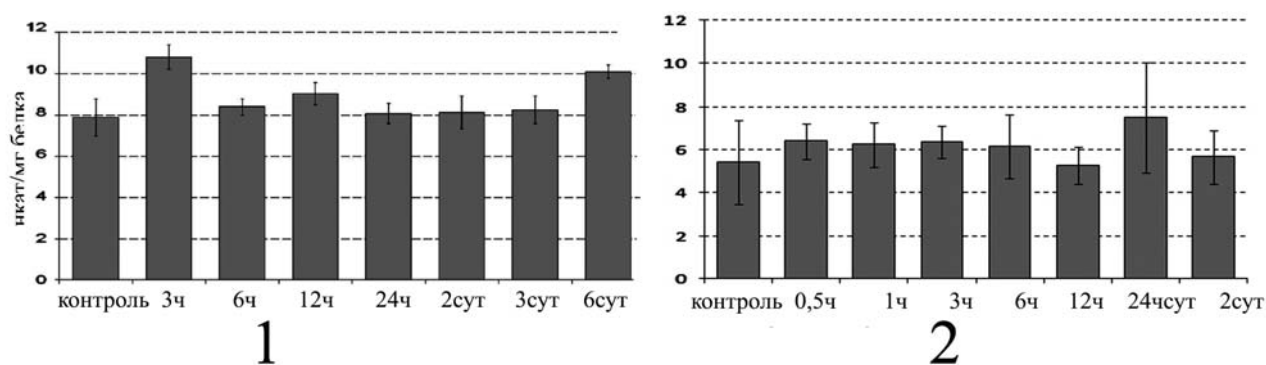


Рис.7. Активность фермента глутатион S-трансферазы у амфипод, экспонированных при температуре 25°C. 1 – *Gammarus lacustris*, 2 – *Gammarus pulex*.

Анализ активности глутатион S-трансферазы выявляет прямую зависимость направления активности фермента от терморезистентного статуса вида. У наиболее термоустойчивых *Gmelinoides fasciatus* и *Gammarus lacustris* отмечали повышение активности фермента (при 25°C) или отсутствие реакции (при 20°C). У других видов по мере снижения их терморезистентных способностей отмечали либо отсутствие реакции, либо падение активности глутатион S-трансферазы. При этом, если у

достаточно устойчивых видов *Eulimnogammarus cyaneus* и *Gammarus pulex* при температурной экспозиции изменения активности фермента не происходили, то у остальных видов уже при 20°C активность достоверно снижалась. У видов *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus* не отмечали какой-либо выраженной реакции глутатион S-трансферазы на температурные воздействия.

Конститутивный синтез белков теплового шока у амфипод.

Для оценки влияния конститутивного содержания белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ, иммунохимически родственных α -кристаллину, были выбраны следующие виды: байкальские *Eulimnogammarus cyaneus*, *Eulimnogammarus verrucosus*, *Eulimnogammarus vittatus*, *Gmelinoides fasciatus*, *Ommatogammarus flavus* и палеарктические *Gammarus lacustris* и *Gammarus pulex*. На рисунке 8А представлены результаты сравнительной иммунохимической оценки конститутивного уровня синтеза белков теплового шока семейства БТШ70 у амфипод разных видов. Как следует из представленных данных, относительное содержание белка у разных видов отличаются. Наибольшее количество белков теплового шока семейства БТШ70 отмечали у термоустойчивых видов *Gammarus lacustris*, *Gmelinoides fasciatus* и *Eulimnogammarus cyaneus*. Уровни конститутивного синтеза БТШ70 у термочувствительных видов *Eulimnogammarus verrucosus* и *Eulimnogammarus vittatus* в несколько раз снижены относительно термоустойчивых видов. Наименьшие детектируемые уровни белков теплового шока семейства БТШ70 отмечали у вида *Gammarus pulex*. Следует особо отметить, что у глубоководного *Ommatogammarus flavus* конститутивный синтез белков теплового шока семейства БТШ70 в детектируемых количествах в данной работе не зафиксирован.

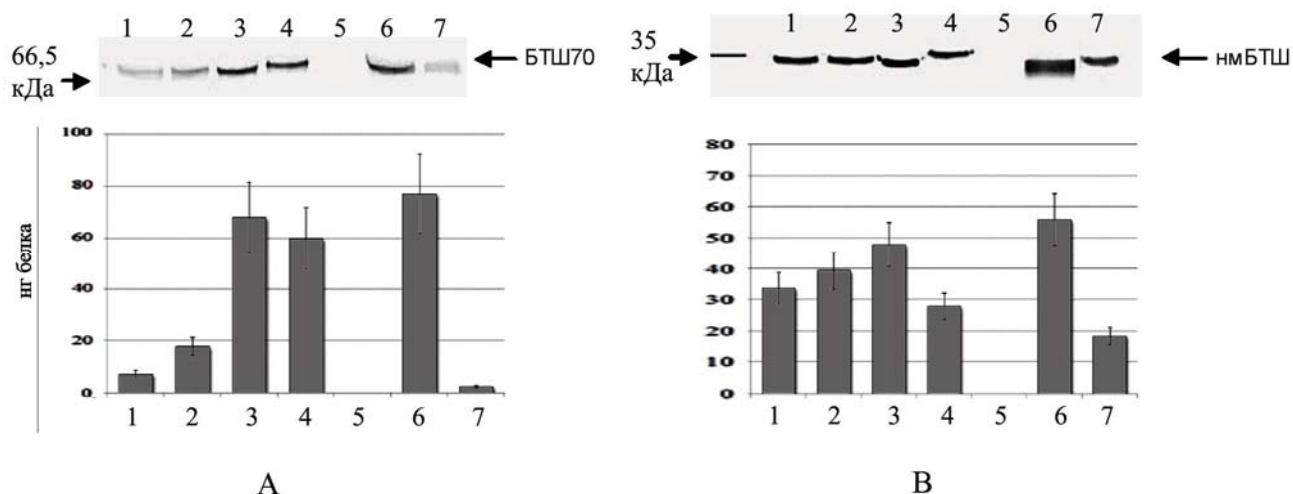


Рис. 8. Вестерн-блоттинг конститутивного синтеза белков БТШ у различных видов амфипод: 1. *E. verrucosus*; 2. *Eulimnogammarus vittatus*; 3. *Eulimnogammarus cyaneus*; 4. *Gmelinoides fasciatus*; 5. *Ommatogammarus flavus*; 6. *Gammarus lacustris*; 7. *Gammarus pulex*.

Вверху типовая мембрана, внизу усредненная полуколичественная оценка. А – БТШ70, В – нмБТШ.

На рисунке 8В представлены результаты сравнительной оценки уровня конститутивного синтеза белков теплового шока семейства нмБТШ, иммунохимически родственного α -кристаллину, у амфипод разных видов. Из представленных материалов видно, что, как и в случае с БТШ70, относительные уровни количества нмБТШ у разных видов отличаются. Наибольшее количество белков теплового шока семейства нмБТШ отмечено у палеарктического вида

Gammarus lacustris. Конститутивные уровни белков у видов *Eulimnogammarus cyaneus*, *Eulimnogammarus verrucosus*, *Eulimnogammarus vittatus* и *Gammarus pulex* были близки между собой. У глубоководного *Ommatogammarus flavus* конститутивное содержание белков теплового шока семейства нБТШ находится на грани чувствительности метода.

Условное расположение видов по уровням конститутивного синтеза БТШ70 дает следующий ряд: *Ommatogammarus flavus* < *Gammarus pulex* < *Eulimnogammarus verrucosus* < *Eulimnogammarus vittatus* < *Eulimnogammarus cyaneus* < *Gmelinoides fasciatus* < *Gammarus lacustris*. Таким образом, прослеживается прямая взаимосвязь между количественным уровнем конститутивного синтеза белков теплового шока семейства БТШ70 и резистентными способностями разных видов амфипод. Учитывая этот факт, белки теплового шока семейства БТШ70 должны играть важную роль, определяющую эти способности. Несколько иная картина отмечена для белков теплового шока семейства нБТШ, иммунохимически родственного α -кристаллину. Первое и последнее место по уровню конститутивного синтеза белка заняли виды *Gammarus lacustris* и *Ommatogammarus flavus* соответственно. Остальные виды характеризовались близкими между собой показателями. Таким образом, связь между количеством конститутивного синтеза белков теплового шока семейства нБТШ и резистентными способностями видов прослеживается в меньшей степени, чем в случае с белками теплового шока семейства БТШ70. Вероятно, белки теплового шока семейства нБТШ оказывают меньше влияния на резистентность исследованных видов.

Температурно-индуцированные изменения содержания БТШ70 у амфипод при различных температурах.

На рисунке 9 представлены результаты Вестерн-блоттинга с антителами к БТШ70 у амфипод *Ommatogammarus flavus*, экспонированных при повышенной температуре. Как видно из представленного материала, белки теплового шока семейства БТШ70 слабо идентифицируются в контроле, а также в периоды до 1 часа экспонирования. Достоверное увеличение содержания этих белков фиксировали только через 3 часа экспозиции. Наибольшее содержание отмечали на период 9-часовой экспозиции. Далее к 12 часам уровень белков несколько снижается, но остается по-прежнему выше контроля.

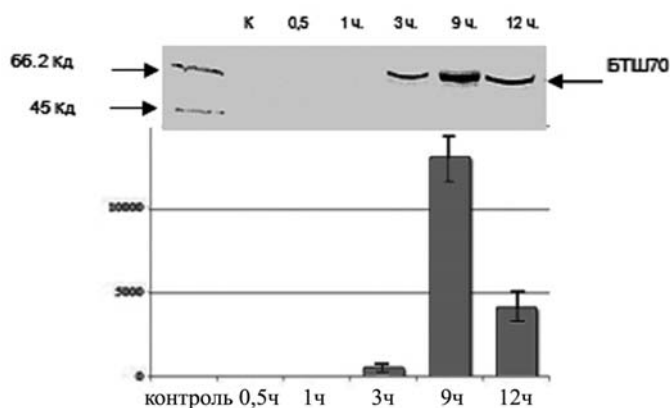


Рис. 9. Вестерн-блоттинг белков *Ommatogammarus flavus*, экспонированных при температуре 20°C, мембраны инкубированы в антителах к БТШ70. Вверху типовая мембрана. Внизу полуколичественная оценка.

Влияние повышенной температуры на содержание белков теплового шока у других байкальских и палеарктических амфипод проводили при температурах 25°C и 30°C.

Как видно из представленного материала, содержание белков теплового шока семейства БТШ70 в контроле у *Gmelinoides fasciatus* оставалось достаточно стабильным на протяжении 6 часов экспозиции (рис. 10 А). После 12 часов наблюдали более чем 4-кратное увеличение содержания белка. Максимальное содержание белков теплового шока семейства БТШ70 отмечали после 24-часовой экспозиции. Далее уровень был несколько снижен, однако оставался многократно выше контрольного значения.

Оценку влияния повышенной температуры на теплочувствительного байкальского вида *Eulimnogammarus verrucosus* проводили в ходе 24-часового экспонирования при 25°C. Как видно из представленных материалов, уже через 30 минут экспозиции отмечали повышение уровня белков теплового шока семейства БТШ70.

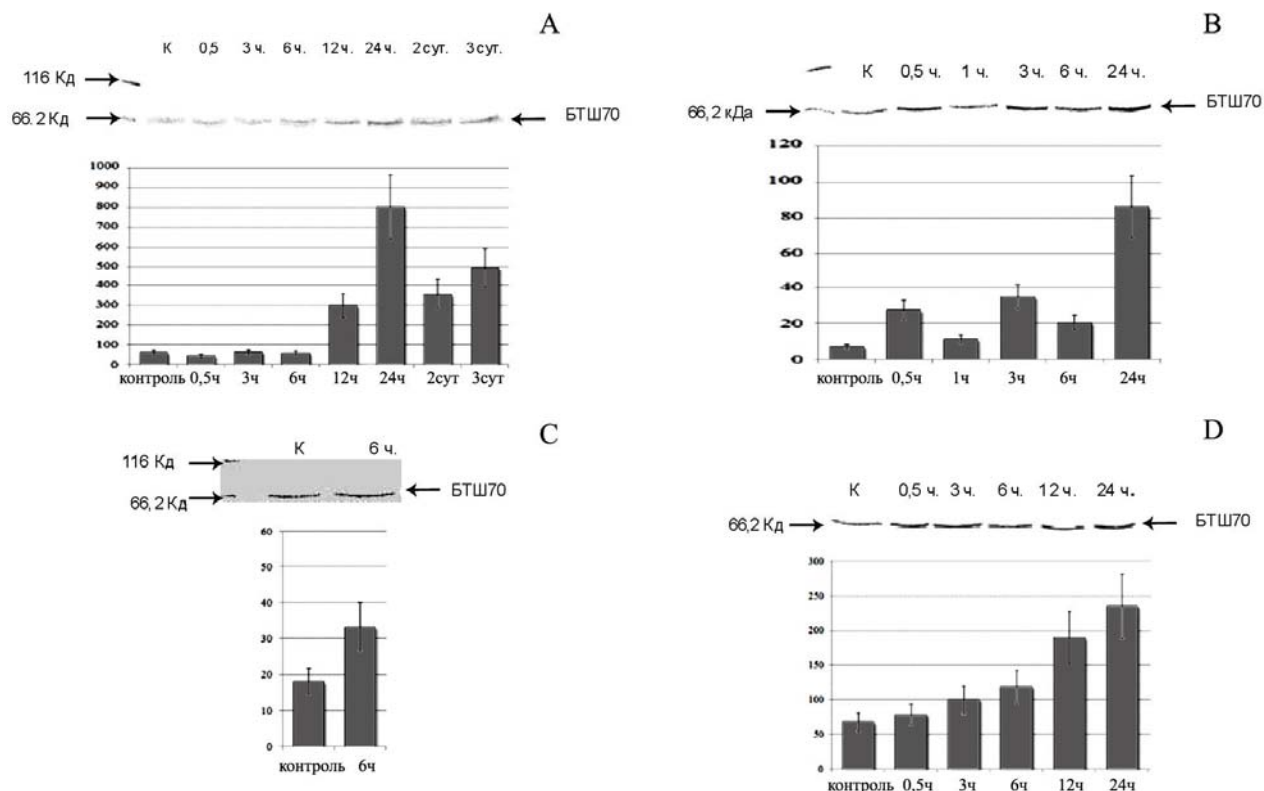


Рис. 10. Вестерн-блоттинг белков байкальских литоральных амфипод, экспонированных при температуре 25°C, мембраны инкубированы в антителах к БТШ70. Вверху типовая мембрана. Внизу полуколичественная оценка. А – *Gmelinoides fasciatus*, В – *Eulimnogammarus verrucosus*, С – *Eulimnogammarus vittatus*, D – *Eulimnogammarus cyaneus*.

В ходе 6 часов экспонирования содержание белка варьировало, с наибольшим повышением к 3 часам экспозиции. К 24 часам эксперимента содержание белков теплового шока семейства БТШ70 достигало своего максимального значения, многократно превышая контроль (рис. 10 В). Оценку уровня стрессовых белков у теплочувствительного байкальского вида *Eulimnogammarus vittatus* проводили в ходе коротких 6 часовых экспериментов. Отмечали почти двукратное увеличение уровня белков теплового шока семейства БТШ70 от контрольного при 6-часовой экспозиции (рис. 10 С). У устойчивого *Eulimnogammarus cyaneus* уровень белков теплового шока

семейства БТШ70 повышается в ходе всего периода экспозиции. Максимальное значение белка отмечали на 24 часа экспозиции (рис. 10 D).

На рисунке 11 представлены результаты Вестерн-блоттинга с антителами к белкам теплового шока семейства БТШ70 у палеарктических амфипод, экспонированных при повышенной температуре.

Как видно из представленных материалов, температурное экспонирование рачков *Gammarus pulex* вело к выраженному росту уровня белков теплового шока семейства БТШ70 (рис. 11 А). Уже к 3 часам экспозиции было отмечено двукратное увеличение содержания белка, наибольшее значение содержания белка отмечали при суточной экспозиции. К окончанию эксперимента уровень белков теплового шока семейства БТШ70 был несколько снижен, однако по-прежнему многократно превышал контрольный. Как следует из представленных материалов, у другого палеарктического вида *Gammarus lacustris* содержание белков теплового шока семейства БТШ70 заметно увеличивалось в результате температурной экспозиции рачков. При этом при 6-часовой экспозиции отмечено почти двукратное увеличение от контрольного (рис. 11 В).

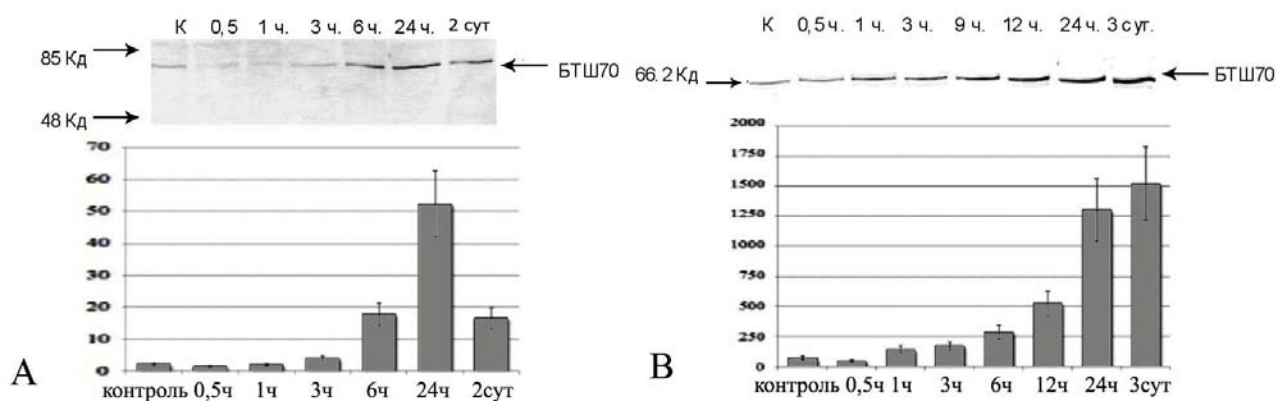


Рис. 11. Вестерн-блоттинг белков палеарктических амфипод, экспонированных при температуре 25°C, мембраны инкубированы в антителах к БТШ70. Вверху типовая мембрана. Внизу полуколичественная оценка. А – *Gammarus pulex*, В – *Gammarus lacustris*.

Температурно-индуцированные изменения содержания нмБТШ у амфипод.

На рисунке 12 представлены результаты Вестерн-блоттинга с антителами к белкам теплового шока семейства нмБТШ, иммунохимически родственных α-кристаллину, у *Ommatogammarus flavus*, экспонированных при температуре 20°C.

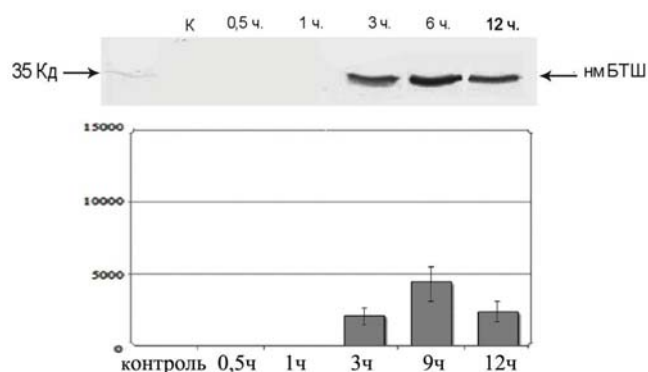


Рис. 12 Вестерн-блоттинг белков *Ommatogammarus flavus*, экспонированных при температуре 20°C, мембраны инкубированы в антителах к нмБТШ. Вверху типовая мембрана. Внизу полуколичественная оценка.

Как видно из представленного материала, белки теплового шока данного семейства в контроле, а также в периоды до 1 часа слабо детектировались. В целом

характер синтеза этих белков у *Ommatogammarus flavus* близок к белкам теплового шока семейства БТШ70. Индукцию синтеза белков теплового шока семейства нмБТШ впервые фиксировали только через 3 часа экспозиции. Наибольший уровень белка отмечали на период 9-часовой экспозиции, к 12 часам уровень белка также снижен.

Как видно из представленного материала, у устойчивого *Gmelinoides fasciatus* в контрольной группе отмечали присутствие белков теплового шока семейства нмБТШ. В отличие от БТШ70, уже через 30 минут экспонирования фиксировали многократное повышение содержания белков этого семейства. В дальнейшем уровень белков оставался высоким, к 24 часам и 3 суткам отмечено снижение, однако содержание белка оставалось выше контрольного (рис. 13 А). Как видно из графика (рис. 13 В), как и в случае с БТШ70, у чувствительного *Eulimnogammarus verrucosus* рост уровня белка начинается уже через 30 минут экспозиции и достигает максимума к 3 часам. В дальнейшем, к 24 часам экспозиции, отмечали снижение уровня нмБТШ, к 24 часам приближающегося к контрольному значению. У *Eulimnogammarus vittatus* отмечали увеличение более чем в 4 раза на 6 часов экспозиции (13 С). У *Eulimnogammarus suaneus* отмечали достаточно слабую реакцию белков теплового шока семейства нмБТШ на температурную экспозицию (рис.13 D).

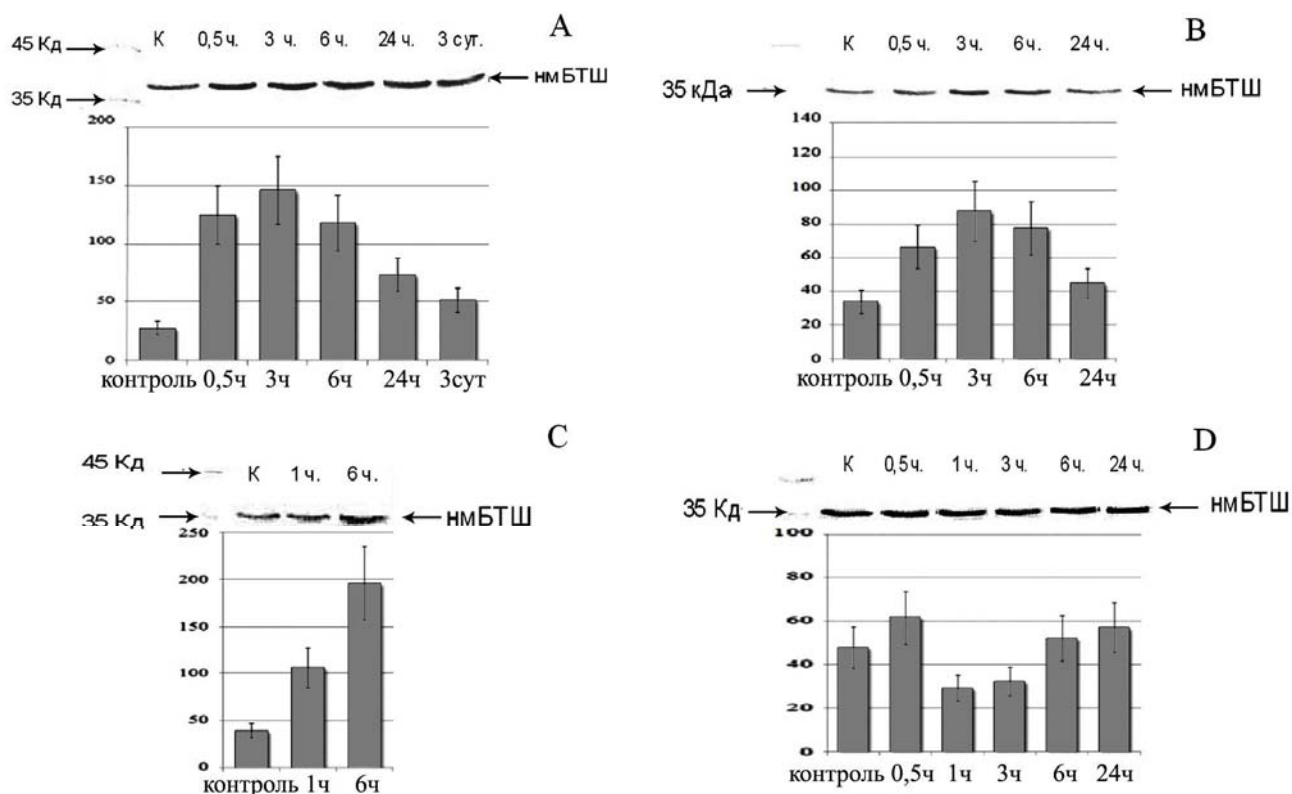


Рис. 13. Вестерн-блоттинг белков байкальских литоральных амфипод, экспонированных при температуре 25°C, мембраны инкубированы в антителах к нмБТШ. Вверху типовая мембрана. Внизу полуколичественная оценка. А – *Gmelinoides fasciatus*, В – *Eulimnogammarus verrucosus*, С – *Eulimnogammarus vittatus*, D – *Eulimnogammarus suaneus*.

Экспозиция палеарктического *Gammarus pulex* при температуре 25°C не приводила к существенному изменению содержания белков теплового шока семейства нмБТШ. Отмечали небольшое увеличение белка после 6 часов, с дальнейшим возвратом к уровню близкому к контрольному (рис. 14 А). Экспозиция при температуре 25 градусов приводила к существенному росту уровня этих белков у

другого палеарктического вида *Gammarus lacustris*. Отмечали многократное увеличение уровня белка после 6 часов. Максимальный уровень белков теплового шока семейства нмБТШ фиксировали через 12 часов экспозиции с дальнейшим возвратом к уровню, близкому к 6-часовому, который, однако, многократно превышал уровень в контроле (рис. 14 В).

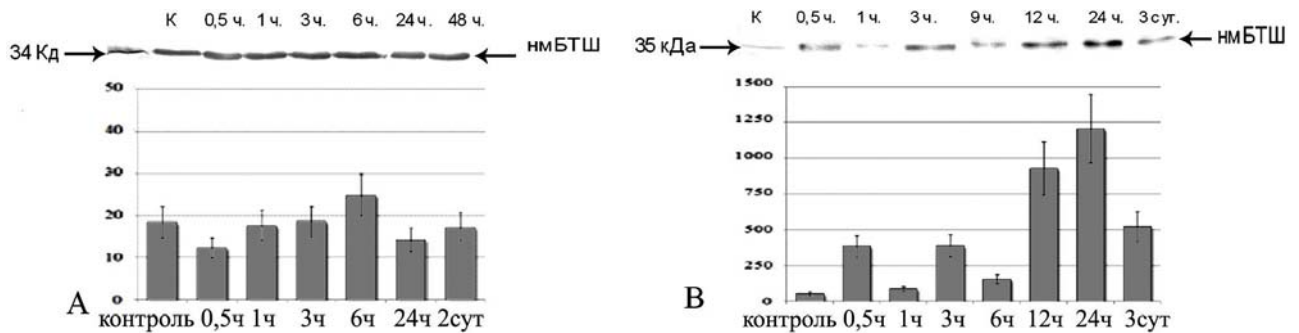


Рис. 14. Вестерн-блоттинг белков палеарктических амфипод, экспонированных при температуре 25°C, мембраны инкубированы в антителах к нмБТШ. Вверху типовая мембрана. Внизу полуколичественная оценка. А – *Gammarus pulex*, В – *Gammarus lacustris*.

Из ранее приведенных результатов можно заключить, что у всех литоральных видов происходит постепенное и многократное возрастание содержания белков теплового шока семейства БТШ70 в ответ на воздействие гипертермии. Вероятно, повышенные температуры вызывают частичную тепловую денатурацию клеточных белков у амфипод.

Поскольку одной из важнейших функций белков теплового шока является функция молекулярных шаперонов, можно предположить, что увеличение содержания этих белков выступает в качестве защитного механизма на клеточном уровне у всех исследованных видов. Вероятно, тем самым белки теплового шока семейства БТШ70 способствует приобретению термотолерантности у исследованных видов. Характерной особенностью глубоководных амфипод является минимальное детектируемое количество белков теплового шока семейства БТШ70. Увеличение содержания этих белков свидетельствует, что механизм использования белков теплового шока в ответе на повышенные температуры (20°C) у данного вида не редуцирован. Однако это увеличение происходит с задержкой, что может быть связано с длительной эволюцией данного вида в стабильных условиях низких температур. Результаты указывают, что у большинства исследованных в работе видов амфипод (за исключением *Eulimnogammarus cyaneus* и *Gammarus pulex*), происходит увеличение содержания белков теплового шока семейства нмБТШ. Одна из функций белков данного семейства – предотвращение агрегации частично денатурированных белков в клетках с последующей передачей их молекулярным шаперонам. Повышение содержания низкомолекулярных белков теплового шока в тканях амфипод, как и в случае с белками теплового шока семейства БТШ70, свидетельствует об участии этой группы белков в защите от негативного влияния повышенных температур. При этом роль низкомолекулярных белков теплового шока выражена в меньшей степени, чем семейства БТШ70.

ВЫВОДЫ

1. Повышение температуры внешней среды до 20-25°C вызывает у байкальских и палеарктических амфипод в зависимости от их термоустойчивости и места обитания вида разнонаправленные изменения активности ключевых ферментов антиоксидантной системы.
2. У литоральных видов при повышении температуры активность каталазы увеличивается вне зависимости от их термоустойчивости; активность пероксидазы снижается у всех видов (за исключением *Gammarus pulex*); изменения в активности глутатион S-трансферазы видоспецифичны: у теплочувствительных видов (*Eulimnogammarus verrucosus*, *Pallasea cancelloides*) происходит снижение, у теплоустойчивых видов активность либо не изменяется (*Gammarus pulex*, *Eulimnogammarus cyaneus*), либо повышается (*Gammarus lacustris*, *Gmelinoides fasciatus*).
3. У глубоководных теплочувствительных видов *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus* при повышенных температурах экспонирования активность всех исследованных ферментов антиоксидантной системы не изменяется.
4. У всех литоральных видов амфипод в контроле (6-7°C) выявлен конститутивный синтез белков теплового шока (семейств БТШ70 и нмБТШ), уровень которого для белков теплового шока семейства БТШ70 прямо пропорционален видовой терморезистентности и избираемой температуре; для низкомолекулярных белков теплового шока эта зависимость выражена в меньшей степени.
5. Повышение температуры внешней среды вызывает увеличение содержания белков теплового шока семейств как БТШ70, так и низкомолекулярных БТШ у большинства исследованных амфипод, за исключением литоральных видов *Eulimnogammarus cyaneus* и *Gammarus pulex*, у которых отмечено возрастание только уровня белков теплового шока семейства БТШ70. У литоральных видов увеличение уровня белков теплового шока обоих семейств наступает быстрее (через 0.5 ч) и наблюдается в течение всего периода экспозиции при повышенных температурах, в то время как у термочувствительных глубоководных видов увеличение содержания белков теплового шока происходит медленнее и выявляется через 3-6 ч экспозиции.
6. Выявленные изменения активности антиоксидантных ферментов и содержания белков теплового шока (семейств БТШ70 и нмБТШ) в ответ на действие температурного фактора носят адаптивный характер и отражают различную приспособленность видов амфипод к изменениям температуры окружающей среды. Литоральные теплоустойчивые виды обладают более лабильной антиоксидантной системой и более реактивной системой синтеза белков теплового шока, чем глубоководные теплочувствительные виды.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

(* - отмечены публикации в изданиях, рекомендуемых ВАК)

1. *Timofeyev, M. Thermal stress defense in freshwater amphipods from contrasting habitats with emphasis on small heat shock proteins (sHSPs) / M. Timofeyev, Shatilina Z.M., **Bedulina D.S.** et al. // *Journal of Thermal Biology*. – 2009. – V.34. – P. 281-285.
2. Шатилина, Ж.М., Губанов, М.В., Задереев, Е.С., Павличенко, В.В., Аксенов-Грибанов, Д.В., Сапожникова, Е.А., Протопопова, М.В., **Бедулина, Д.С.**, Тимофеев, М.А. Синтез белков теплового шока семейств БТШ70 и нмБТШ у представителей различных популяций *Gammarus lacustris* Sars при температурном стрессе// Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: материалы междунар. науч.-практ. конф., 24-28 августа 2009 г, С. 522-525.
3. Протопопова, М.В., Лозовой, Д.В., Павличенко, В.В., Аксенов-Грибанов, Д.В., Сапожникова, Е.А., Шатилина, Ж.М., **Бедулина, Д.С.**, Тимофеев, М.А. Влияние водорастворимых фракций нефти на содержание белков теплового шока у байкальских и палеарктических амфипод и гастропод// Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: материалы междунар. науч.-практ. конф., 24-28 августа 2009 г, С. 389-393.
4. Тимофеев, М.А., Тахтеев, В.В., Шатилина, Ж.М., Сапожникова, Е.А., Павличенко, В.В., Аксенов-Грибанов, Д.В., Протопопова, М.В., **Бедулина, Д.С.** Сравнительный анализ молекулярных масс белков теплового шока (БТШ) у эндемичных байкальских амфипод и палеарктического *Gammarus lacustris* Sars // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: материалы междунар. науч.-практ. конф., 24-28 августа 2009 г, С. 467-470.
5. *Тимофеев, М.А. Сравнительное исследование клеточных механизмов терморезистентности у байкальского и палеарктического видов эврибионтных амфипод / М.А. Тимофеев, Ж.М. Шатилина, **Д.С. Бедулина** и др. // Сиб. экологический журнал. – 2008. – № 1. – Т. 15. – С. 23– 29.
6. *Timofeyev, M.A. Evaluation of biochemical responses in Palearctic and Lake Baikal endemic amphipod species exposed to CdCl₂ / M.A. Timofeyev, Z.M. Shatilina, **D.S. Bedulina** at all // *Ecotoxicol. Environm. Safety*, Volume 70, Issue 1, May 2008. – P. 99–105.
7. *Тимофеев, М.А. Особенности применения белков теплового шока (БТШ) в качестве стресс-маркеров у байкальских эндемичных амфипод / Ж.М. Шатилина, **Д.С. Бедулина** и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 3. – С. 310–313.
8. Протопопова, М.В., Шатилина, Ж.М., Павличенко, В.В., **Бедулина, Д.С.**, Тимофеев, М.А. Участие белков теплового шока в механизмах стресс-резистентности у эндемичных амфипод оз. Байкал // Материалы III Всеросс. конф. по водной токсикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы», конференции по гидроэкологии «Критерии оценки качества вод и методы нормирования антропогенных нагрузок» и школы-семинара «Современные методы исследования и оценки качества вод, состояния водных организмов и экосистем в условиях антропогенной нагрузки». Часть 2. (Борок, 11-16 ноября 2008 г.). ООО «Ярославский печатный двор» - Борок, 2008.-С. 130-132.
9. **Bedulina D.S.** Stress-adaptation mechanism in freshwater amphipod *Gammarus pulex* //Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten des “Michail Lomonosov”-Programms 2007/08, Moskau, 16.-17. April 2008», Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), Ed. N. Prahл.- 2008.- P. 29-31.
10. **Бедулина, Д.С.** Протопопова, М.В., Шатилина, Ж. М., Павличенко, В.В., Тимофеев, М.А. нмБТШ в механизмах стресс-адаптации к гипертермии у байкальских амфипод

Gmelinoides fasciatus и *Eulimnogammarus cyaneus* // Проблемы естественно-научного образования. Сб. науч. тр. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. пед. ун-та, 2007. – С.18.

11. Павличенко, В.В., Протопопова, М.В., Шатилина, Ж.М., **Бедулина, Д.С.**, Тимофеев, М.А. Влияние температурного стресса на активность ферментов антиоксидантной системы у пресноводных амфипод // Проблемы естественнонаучного образования. Сборник науч. тр.-Иркутск: Изд-во Иркутского гос.пед. ун-та, 2007. - С.115-116.

12. **Бедулина, Д.С.** Низкомолекулярные БТШ в механизмах адаптации к гипертермии у пресноводных амфипод *Gmelinoides fasciatus* и *Eulimnogammarus cyaneus*/ Д.С. Бедулина, М.В. Протопопова, В.В. Павличенко и др. // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2. Расширенные материалы междунар. науч.-практ. конф. Борок, 17–20 июля 2007 года, С. 9–11.

13. *Тимофеев, М.А. О возможности использования показателя общей пероксидазной активности в качестве стресс-маркеров у байкальских организмов/ М.А.Тимофеев, Ж.М.Шатилина, **Д.С. Бедулина** и др. // Вестник Бурятского Университета. – Улан-Удэ. Изд. Бурятского госуниверситета. - 2006 г. - С.223.

14. *Тимофеев, М.А. Полиморфизм белковых спектров эндемичных амфипод озера Байкал и палеарктических видов, влияние температурного стресса / М.А. Тимофеев, Ж.М. Шатилина, **Д.С. Бедулина** и др. // Сиб. экологический журнал. – 2006. – № 5. – С. 571–579.

15. Тимофеев, М.А. Индукция анаэробных процессов у байкальских эндемиков *Eulimnogammarus vittatus* (Dyb.) и *E. verrucosus* (Dyb.) / М.А. Тимофеев, К.А. Кириченко, **Бедулина Д.С.** и др. // (AMPHIPODA, CRUSTACEA). Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2006. – Vol. 2, № 1. – P. - 56-61.

16. Тимофеев, М.А. Стрессовые белки в механизмах стресс-адаптации байкальских амфипод (Amphipoda, Crustacea), сопоставление с палеарктическими видами /М.А. Тимофеев, Ж.М. Шатилина, **Д.С. Бедулина** и др. // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2006. – Vol. 2, № 1. – P. 42–49.

17. Timofeyev, M.A. Natural organic matter (NOM) promotes oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *G. tigrinus* (Sexton) / M. Timofeyev, Z. Shatilina, **D. Bedulina** at all. // Science of The Total Environment. – Volume 366, Issues 2–3, 1 August 2006. – P. 673–681.

18. ***Бедулина, Д.С.**, Шатилина, Ж.М. Ингибирование пероксидазы при интоксикации солями кадмия / Д.С. Бедулина, Ж.М. Шатилина, // Вестник Российского государственного медицинского университета. –2005, № 3 (42). – С. 156.

19. *Шатилина, Ж.М. Участие низкомолекулярных БТШ в механизмах клеточной защиты, активизирующихся при интоксикации солями кадмия / Ж.М. Шатилина, **Д.С. Бедулина**, М.В. Протопопова // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2005. - № 3 (42). – С. 195.

20. Кириченко, К.А. Оценка влияния пониженного содержания растворенного кислорода на резистентные способности байкальских амфипод. / К.А. Кириченко, **Д.С. Бедулина**, М.А. Тимофеев.// Вестник Томского государственного университета. Серия «Естественные науки». - 2004.№11,. - С. 115-116.

21. Кириченко, К.А. Индукция анаэробных процессов у байкальских эндемичных амфипод в условиях гипоксии / К.А.. Кириченко, **Д.С. Бедулина**, М.А. Тимофеев // Вестник Томского государственного университета. Серия «Естественные науки». – 2004, №11 - С. 116.

22. Шатилина, Ж.М. Особенности активации механизмов антиоксидантной защиты у эндемичных байкальских амфипод / Ж.М Шатилина, **Д.С. Бедулина**, М.А. Тимофеев // Вестник Томского государственного университета. Общественный периодический журнал. Серия «Естественные науки». Приложение. Материалы международных, всероссийских и региональных научных конференций, симпозиумов, школ, проводимых в ТГУю - ноябрь 2004, №11. -С.144 – 148.

