

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 519.237:[597-1.044:597.423-113.32]
ББК 22.172.6:28.693.324

Д. А. Бедняков, А. С. Мартьянов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ pH СРЕДЫ НА УРОВЕНЬ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ РУССКОГО ОСЕТРА, ЛЕНСКОГО ОСЕТРА И ИХ ГИБРИДА С ПОМОЩЬЮ НЕМЕТРИЧЕСКОГО МНОГОМЕРНОГО ШКАЛИРОВАНИЯ

D. A. Bednyakov, A. S. Martyanov

COMPARATIVE ANALYSIS OF INFLUENCE OF pH ON THE LEVEL OF THE ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES OF RUSSIAN STURGEON, SIBERIAN STURGEON AND THEIR HYBRID BY MEANS OF NONMETRIC MULTIDIMENSIONAL SCALING

Исследуется воздействие pH среды на ряд пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и их гибрида РОЛО. Изучалось воздействие pH на α -амилазу, мальтазу, щелочную фосфатазу и казеинлитические протеиназы годовиков с последующим сравнительным анализом реакций ферментов на изменения pH среды. В качестве основного инструмента сравнительного анализа использован метод неметрического многомерного шкалирования. В итоге степень сходства между ферментами родительских видов и гибрида была отображена в виде расстояний между точками на двумерной диаграмме рассеяния. Установлено, что ферменты гибрида в ответных реакциях проявляют существенно большее сходство с аналогичными ферментами русского осетра. При этом наибольшее сходство обнаруживается в кислой среде, при pH ниже 6. При увеличении pH сходство гибрида и родительских видов существенно уменьшается, особенно сильно в случае сравнения активности ферментов гибрида и ленского осетра.

Ключевые слова: осетровые, гибриды, мембранное пищеварение, пищеварительные ферменты, pH, многомерное шкалирование.

The pH impact on some digestive enzymes of the intestinal mucous tunic of Russian sturgeon, Siberian sturgeon and their hybrid ROLO is examined. The influence of the pH on α -amylase, maltase, alkaline phosphatase and caseinolytic proteinases of yearlings is studied with subsequent comparative analysis of the reactions of the enzymes on the changes of pH. The method of the nonmetric multidimensional scaling is used as a main tool of the comparative analysis. Finally, the degree of the similarity between enzymes of the parent species and hybrids is shown as a distance between points on the two-dimensional diagram of dispersion. It is stated that the enzymes of the hybrid in their responses to the changing pH are more similar to analogous enzymes of the Russian sturgeon. Besides, the maximum similarity is registered in the acid environment when pH is lower than 6. When pH grows similarity of hybrid to parent species essentially decreases, especially in case of comparison of the activity of the enzymes of hybrid and Siberian sturgeon.

Key words: sturgeons, hybrids, membrane digestion, digestive enzymes, pH, multidimensional scaling.

Введение

К настоящему времени достаточно подробно изучено значительное число проблем, связанных с механизмами мембранного пищеварения рыб, а также с различными адаптациями пищеварительной системы. Одним из важнейших объектов исследования в данной области являются осетровые [1–3]. Однако особенности адаптаций на уровне ферментных систем исследованы

недостаточно. Изучение воздействия экологических факторов на функциональные характеристики мембранно-связанных ферментных систем требует применения статистических методов обработки массивов данных, сочетающих возможность комплексного анализа многомерных данных, с удобным и лаконичным представлением результатов исследования. Одним из подобных методов является многомерное шкалирование – математический инструмент, предназначенный для обработки данных о попарных сходствах, связях или отношениях между анализируемыми объектами с целью представления этих объектов в виде точек некоторого координатного пространства [4]. Данный метод прикладной статистики в настоящее время чаще всего используется в современных социологических исследованиях [5, 6]. В биологических науках данный метод применяется относительно редко, а его основным назначением, как правило, является визуализация многомерных массивов данных [7–12].

Целью данной работы являлся сравнительный анализ воздействия pH среды на пищеварительные ферменты слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и их гибрида РОЛО.

Материал и методы исследований

Объектами исследования служили годовики русского осетра (*Acipenser güldenstädtii* В.), ленского осетра (*Acipenser baerii* В.) и их гибрид РОЛО (*Acipenser güldenstädtii* × *Acipenser baerii*), полученные и выращенные в искусственных условиях. Биохимический анализ проводили по общепринятым методикам [13]. Уровень активности α -амилазы (КФ 3.1.1.1) определяли по убыли крахмала модифицированным методом Смита и Роя, уровень активности мальтазы (КФ 3.2.1.20) – модифицированным глюкозооксидазным методом, щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) – по степени гидролиза *n*-нитро-фенилфосфата Na. Казеинлитическую активность протеиназ (КФ 3.4.21) определяли модифицированным методом Ансона [13]. Активность ферментов регистрировали в диапазоне pH от 3 до 12, в случае казеинлитических протеиназ – от 6 до 12.

Из осредненных значений активности исследуемых ферментов формировалась матрица сопряженных измерений для каждого исследуемого значения температуры. Затем на основе этой матрицы вычислялась матрица различий между переменными. Для вычисления различий между переменными использовалась метрика городских кварталов:

$$d_{st} = \sum_{j=1}^n |x_{sj} - x_{tj}|$$

где d_{st} – расстояние, x_{sj} , x_{tj} – координаты объектов s и t .

При обработке данных использовался комбинированный алгоритм неметрического многомерного шкалирования по методикам Гуттмана и Краскала. Для вычисления функции стресса использовалась формула Краскала:

$$Phi = \sum [d_{ij} - f(\sigma_{ij})]^2, \quad (1)$$

где P_{hi} – значение функции стресса; d_{ij} – воспроизведенные расстояния в двумерном пространстве; σ_{ij} – исходные расстояния; $f(\sigma_{ij})$ – значения функции неметрического монотонного преобразования исходных данных.

Результаты вычислений по алгоритму Краскала также использовались при построении диаграммы Шепарда, отражающей зависимость оценок расстояний от исходных данных.

Результаты исследований

При обработке методом неметрического многомерного шкалирования экспериментальных данных совокупность изучаемых многомерных переменных содержащих информацию об уровне активности четырех исследуемых ферментов слизистой оболочки кишечника была представлена в виде двумерной карты, т. е. эта совокупность была отображена в плоскость двух главных осей (рис. 1).

Как отмечалось выше, подобная картина была получена с применением комбинированного алгоритма, поэтому в качестве мер соответствия полученной структуры данных исходной – многомерной, использовались функция стресса Краскала (1) и коэффициент отчуждения.

Значения этих показателей составили 0,09 для стресса и такую же величину для коэффициента отчуждения. Это свидетельствует о высокой степени соответствия полученной и исходной структур данных и, следовательно, об адекватности полученных результатов [1]. С целью дополнительного изучения качества выполненных преобразований по результатам обработки

была построена диаграмма Шепарда (рис. 2), отображающая зависимость воспроизведенных расстояний от исходных. Данные диаграммы также свидетельствуют о хорошем соответствии исходных данных конечной конфигурации точек.

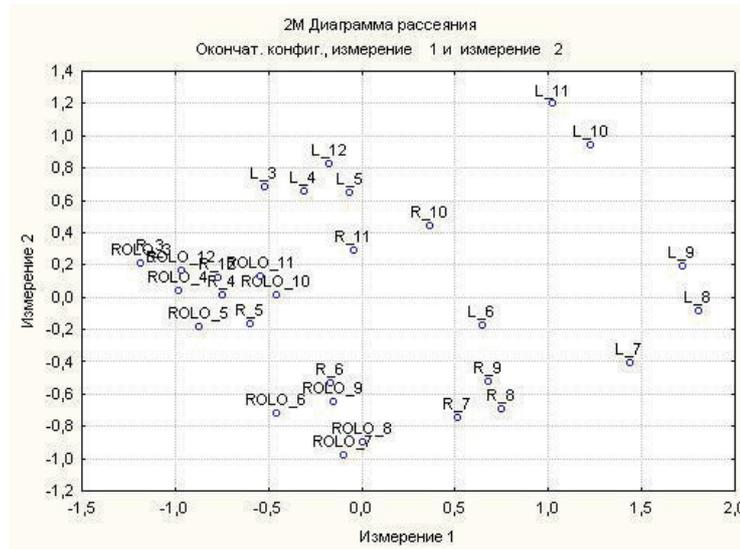


Рис. 1. Результаты многомерного шкалирования (индекс R в имени переменной означает данные по русскому осетру, индекс L – по ленскому осетру, RL – по РОЛО, числа в имени переменной – значение рН)

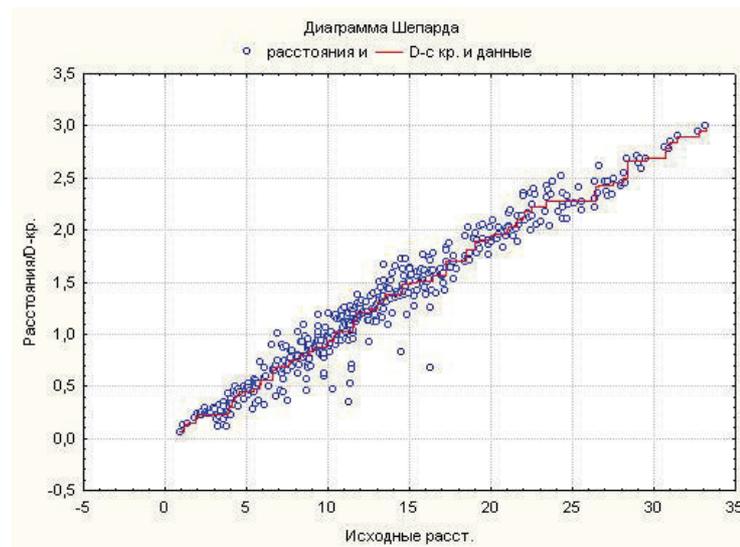


Рис. 2. Диаграмма Шепарда: по горизонтали – исходные расстояния между данными, по вертикали – воспроизведенные в конечной конфигурации, приведенной на рис. 1

На полученной диаграмме рассеяния можно выделить несколько групп. Группа, обладающая наибольшей компактностью, содержит переменные гибрида, характеризующие уровень активности исследуемых ферментов в существенно кислой и щелочной средах (при рН 3, 4, 5, 10, 11, 12) и русского осетра при рН от 3 до 5. Рядом с данной группой находится группа переменных, содержащих информацию по ленскому осетру в аналогичных условиях среды и русскому осетру при рН 10 и 11. Для диапазона рН от 6 до 9 характерно формирование существенно более разреженных скоплений кластеров переменных, однако и в данном диапазоне ферменты гибрида в своих реакциях существенно более сходны с ферментами русского осетра, нежели ленского. Следует отметить, что переменные по ленскому осетру при рН 7–9 и 10–11 образуют группы, крайне удаленные как от переменных, содержащих информацию по ферментам гибрида, так и от

переменных, содержащих информацию по ферментам русского осетра. Из построенной диаграммы рассеяния очевидно, что для диапазона pH от 6 до 9 переменные с информацией по активности ферментов ленского осетра располагаются на существенно большей дистанции от переменных с информацией по активности ферментов РОЛО, чем в случае экстремальных значений. Таким образом, на всем диапазоне исследуемых значений очевидно большее сходство ферментного комплекса гибрида с ферментами русского осетра в реакциях на pH среды. С другой стороны, анализируя взаимное расположение переменных на диаграмме рассеяния, можно отметить, что данное сходство наиболее сильно выражено для pH от 6 и ниже, а с ростом значения pH среды оно ослабевает. Различия с увеличением pH среды особенно сильно возрастают для гибрида и ленского осетра, однако и для ферментов русского осетра тенденция аналогична.

Результаты анализа в совокупности с предыдущим исследованием, посвященным исследованию воздействия на ферменты слизистой оболочки кишечника осетровых и гибрида температуры [14], подтверждают перспективность метода многомерного шкалирования при обработке данных физиолого-биохимических исследований мембранного пищеварения рыб.

Выводы

1. Тенденции в изменении уровня активности ферментов РОЛО под воздействием pH среды обнаруживают большее сходство с аналогичными тенденциями для ферментов русского осетра нежели, ленского.

2. Наибольшее сходство между реакциями ферментов РОЛО и русского осетра обнаруживается при pH от 6 и ниже.

3. С ростом pH свыше 6 сходство реакций ферментов гибрида и родительских видов ослабевает, особенно существенно эта тенденция выражена для ферментов РОЛО и ленского осетра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Невалённый А. Н. Комплексное исследование особенностей процессов мембранного пищеварения у севрюги / А. Н. Невалённый, Д. А. Бедняков, В. Ю. Новинский // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. 2011. № 2. С. 93–98.
2. Бедняков Д. А. Совместное влияние температуры и ионов металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника у рыб семейства *Acipenseridae* / Д. А. Бедняков, А. Н. Невалённый, С. Г. Коростелёв // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. 2012. № 2. С. 131–135.
3. Мартыанов А. С. Нечетко-нейронное моделирование изменений уровня активности карбогидраз пилорической железы русского осетра под воздействием осмолярности среды / А. С. Мартыанов, А. А. Невалённая, Л. А. Невалённая // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. 2012. № 1. С. 93–98.
4. Дэвисон М. Многомерное шкалирование: методы наглядного представления данных / М. Дэвисон. М.: Финансы и статистика, 1988. 254 с.
5. Терехина А. Ю. Анализ данных методами многомерного шкалирования / А. Ю. Терехина. М.: Наука, 1986. 168 с.
6. Толстова Ю. Н. Основы многомерного шкалирования / Ю. Н. Толстова. М.: КДУ, 2006. 160 с.
7. Ципилева Т. А. Методы автоматической классификации в сжатии экологической информации // Алгоритмическое и информационное обеспечение систем экоинформации / Т. А. Ципилева. Томск: СО АН СССР, 1989. С. 23–61.
8. Шитиков В. К. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации / В. К. Шитиков, Г. С. Розенберг, Т. Д. Зинченко. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2003. 463 с.
9. Хрусталева А. М. Генетическая дифференциация нерки (*Oncorhynchus nerka*) азиатских стад / А. М. Хрусталева: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2007. 25 с.
10. Прокофьев А. М. О происхождении Соловецкой ряпушки *Coregonus albula* и корюшки *Osmerus eperlanus* Сямозера / А. М. Прокофьев // Вопросы ихтиологии. 2009. Т. 49, № 1. С. 15–28.
11. Новаковский А. Б. Методы ординации в современной геоботанике / А. Б. Новаковский // Вестн. Ин-та биол. Коми НЦ УрО РАН. 2008. № 10 (132). С. 28.
12. Дирипаско О. А. Популяционная структура пиленгаса *Liza haematocheila* (Mugiliformes, Mugilidae), акклиматизированного в бассейне Азовского моря / О. А. Дирипаско // Вопросы ихтиологии. 2007. Т. 47, № 4. С. 476–474.
13. Невалённый А. Н. Энзимология / А. Н. Невалённый, Д. А. Бедняков, И. С. Держинская: учеб. пособие. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2005. 84 с.
14. Бедняков Д. А. Сравнительный анализ воздействия температуры инкубации на активность комплекса пищеварительных ферментов русского осетра, ленского осетра и их гибрида методом многомерного шкалирования / Д. А. Бедняков, А. С. Мартыанов // Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер.: Рыбное хозяйство. 2013. № 1. С. 118–123.

REFERENCES

1. Nevalennyi A. N., Bedniakov D. A., Novinskii V. Iu. Kompleksnoe issledovanie osobennostei protsessov membrannogo pishchevareniiia u sevrugi [Complex study of the specific parameters of the processes of membrane digestion of sturgeon]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2011, no. 2, pp. 93–98.
2. Bedniakov D. A., Nevalennyi A. N., Korostelev S. G. Sovmestnoe vliianie temperatury i ionov metallov na uroven' aktivnosti shchelochnoi fosfatazy slizistoi obolochki kishechnika u ryb semeistva Acipenseridae [Joint influence of temperature and ions of metals on the level of activity of alkaline phosphatase of mucous membrane of intestine of Acipenseridae]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2012, no. 2, pp. 131–135.
3. Mart'ianov A. S., Nevalennaia A. A., Nevalennaia L. A. Nechetko-neironnoe modelirovanie izmenenii urovnia aktivnosti karbogidraz piloricheskoi zhelezy russkogo osetra pod vozdeistviem osmoliarnosti sredy [Fuzzy-neural modeling of changes of the level of activity of carbohydrase of pyloric gland of Russian sturgeon under the influence of osmotic environment]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2012, no. 1, pp. 93–98.
4. Deivison M. *Mnogomernoe shkalirovanie: metody nagliadnogo predstavleniia dannykh* [Multidimensional scaling: methods of visible data representation]. Moscow, Finansy i statistika, 1988. 254 p.
5. Terekhina A. Iu. Analiz dannykh metodami mnogomernogo shkalirovaniia [Analysis of data using the methods of multidimensional scaling]. Moscow, Nauka, 1986. 168 p.
6. Tolstova Iu. N. *Osnovy mnogomernogo shkalirovaniia* [The basis of multidimensional scaling]. Moscow, KDU, 2006. 160 p.
7. Tshipileva T. A. Metody avtomaticheskoi klassifikatsii v szhatii ekologicheskoi informatsii [Methods of automated classification in compression of ecological information]. *Algoritmicheskoe i informatsionnoe obespechenie sistem ekoinformatsii*. Tomsk, SO AN SSSR, 1989, pp. 23–61.
8. Shitikov V. K., Rozenberg G. S., Zinchenko T. D. *Kolichestvennaia gidroekologiya: metody sistemnoi identifikatsii* [Quantitative hydroecology: methods of system identification]. Togliatti, IEVB RAN, 2003. 463 p.
9. Khrustaleva A. M. *Geneticheskaiia differentsiatsiia nerki (Oncorhynchus nerka) aziatskikh stad.* Avtoreferat dis. kand. biol. nauk [Genetic differentiation of nerk of Asian stocks. Abstract of diss. cand. biol. sci.]. Moscow, 2007. 25 p.
10. Prokof'ev A. M. O proiskhozhdenii Solovetskoii riapushki Coregonus albula i koriushki Osmerus eperlanus Siamozera [On the origin of Solovetsk whitefish Coregonus albula and Syamoser smelt Osmerus eperlanus]. *Voprosy ikhtiologii*, 2009, vol. 49, no. 1, pp. 15–28.
11. Novakovskii A. B. Metody ordinatsii v sovremennoi geobotanike [Methods of ordination in modern geobotanics]. *Vestnik Instituta biologii Komi NTs UrO RAN*, 2008, no. 10 (132), pp. 2–8.
12. Diripasko O. A. Populatsionnaia struktura pilengasa Liza haematocheila (Mugiliformes, Mugilidae), akklimatizirovannogo v basseine Azovskogo moria [Population structure of haarder Liza haematocheila (Mugiliformes, Mugilidae) acclimatized in the Azov Sea basin]. *Voprosy ikhtiologii*, 2007, vol. 47, no. 4, pp. 476–474.
13. Nevalennyi A. N., Bedniakov D. A., Dzerzhinskaia I. S. *Enzimologiya* [Enzymology]. Astrakhan, Izd-vo AGTU. 84 p.
14. Bedniakov D. A., Mart'ianov A. S. Sravnitel'nyi analiz vozdeistviia temperatury inkubatsii na aktivnost' kompleksa pishchevaritel'nykh fermentov russkogo osetra, lenskogo osetra i ikh gibrida metodom mnogomernogo shkalirovaniia [Comparative analysis of the incubation temperature influence on the activity of the complex of digestive enzymes of Russian sturgeon, Lensky sturgeon and their hybrid using the method of multidimensional scaling]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2013, no. 1, pp. 118–123.

Статья поступила в редакцию 3.07.2013

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Бедняков Дмитрий Андреевич – Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук, доцент; зав. лабораторией «Физиология питания рыб»; bednyakovd@rambler.ru.

Bednyakov Dmitriy Andreevich – Astrakhan State Technical University; Candidate of Biological Sciences; Head of the laboratory "Physiology of Fish Nutrition"; bednyakovd@rambler.ru.

Мартьянов Александр Сергеевич – Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры «Гидробиология и общая экология»; martyanovas1729@yandex.ru.

Martyanov Alexander Sergeevich – Astrakhan State Technical University; Candidate of Biological Sciences; Senior Lecturer of the Department "Hydrobiology and General Ecology"; nevalennyu@rambler.ru.