

На правах рукописи



Бедняков Дмитрий Андреевич

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕМБРАННОГО
ПИЩЕВАРЕНИЯ У ОСЕТРООБРАЗНЫХ ВИДОВ РЫБ И ИХ ГИБРИДОВ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

АСТРАХАНЬ – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханский государственный технический университет» Федерального агентства по рыболовству

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Неваленный Александр Николаевич

Официальные оппоненты:

Лозовская Марина Вячеславовна, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», кафедра зоологии и аквакультуры, заведующая кафедрой

Голованова Ирина Леонидовна, доктор биологических наук, ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина» Российской академии наук, лаборатория экологии рыб, главный научный сотрудник

Металлов Геннадий Федорович, доктор биологических наук, ФГБУН Южный научный центр Российской академии наук, лаборатория водных биоресурсов и аквакультуры, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», г. Москва

Защита состоится 29 ноября 2014 г. в 10.00 часов на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 212.009.01 при ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет» по адресу: 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1, ауд. 101

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет» по адресу: 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20а и на сайте <http://www.aspu.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,



Е.В. Курьянова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Пищеварение является центральным звеном процесса экзотрофии. Полученные во второй половине XX - начале XXI в.в. данные значительно изменили многие фундаментальные представления о функционировании пищеварительной системы. Исторически механизмы усвоения пищевых веществ гетеротрофными организмами рассматривались как двустадийные: внеклеточное и внутриклеточное пищеварение (Павлов, 1887; Бабкин, 1927; Коштыяц, 1950). В конце 50-х годов прошлого века было открыто мембранное пищеварение (Уголев, 1960а,б). Описание данного типа пищеварения позволило приблизиться к пониманию целого ряда важных закономерностей функционирования пищеварительной системы животных, в том числе и рыб. В дальнейшем были описаны дополнительные типы пищеварения - индуцированный аутолиз и симбионтное пищеварение с участием микрофлоры (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005; Извекова, 2006).

Рыбы исторически являются классическим объектом исследования пищеварительных процессов в сравнительной, экологической и эволюционной физиологии ввиду исключительного видового разнообразия, особенностей среды обитания, специфики питания и организационной структуры пищеварительной системы.

Среди большого видового разнообразия представителей класса Osteichthyes, рыбы семейства Осетровые (Acipenseridae) представляют особый интерес. Прежде всего это обусловлено промежуточным положением семейства, эволюционно находящимся между более примитивными хрящевыми рыбами и более современными костистыми, а также малой изученностью особенностей функциональных воздействий на различные системы организма. Осетровые рыбы являются уникальными реликтовыми видами, успешно эволюционируя на протяжении миллионов лет и приспосабливаясь к меняющимся экологическим условиям. Однако из-за стремительного вмешательства человека в естественный ход биологических процессов в настоящее время данная группа рыб находится на грани полного исчезновения. В связи с этим важное значение приобретает заводское товарное выращивание осетровых для поддержания их численности и биоразнообразия. В товарном осетроводстве в последние годы особую популярность приобретает выращивание гибридных форм осетровых видов рыб.

Исходя из вышесказанного, особый интерес представляют исследования, направленные на выявление влияния экологических факторов на процессы пищеварения в кишечнике рыб и раскрытие механизмов взаимодействия нутриентов в естественно протекающем пищеварительном процессе. Ранее были исследованы некоторые закономерности мембранного пищеварения у ряда представителей осетровых видов рыб (Волкова, 2010). Установлено, что важнейшими биотическими факторами, влияющими на пищеварение рыб, являются количественный и качественный состав пищи, наиболее важным абиотическим – температура, а для гидробионтов и концентрация водородных ионов (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003; Кузьмина, 2005, 2008).

Исследования регуляторных свойств ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб, проводятся достаточно давно (Гредин, 1977; Кузьмина, 1987), однако механизмы регуляции и взаимодействия различных пищевых веществ до конца не выяснены (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003). Данные по пищеварению у гибридных форм осетровых видов рыб отсутствуют вовсе. Раскрытие регуляторных механизмов необходимо для решения ряда теоретических и прикладных проблем питания и пищеварения у выращиваемых видов рыб, что будет способствовать углубленному пониманию процессов, происходящих в искусственных и естественных водных экосистемах.

Цель и задачи исследования. Основная цель работы заключается в изучении особенностей структурной и функциональной организации процессов усвоения пищи у осетрообразных видов рыб различных экологических групп и их гибридов. Особое внимание уделено таким вопросам, как влиянию температуры и концентрации водородных ионов на процессы мембранного пищеварения; регуляция процессов пищеварения в кишечнике рыб, а также проведению сравнительного анализа воздействия абиотических факторов у гибридов и их родительских видов.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительное изучение ультраструктурной организации среднего отдела кишечника у осетровых видов рыб и их гибридов для выявления общих закономерностей и особенностей строения, характерных для родительских видов и их гибридов.

2. Исследовать видовые температурные адаптации пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридных форм.

3. Оценить влияние концентрации водородных ионов в инкубационной среде на активность гидролитических ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов.

4. Провести сравнительный анализ факториальных воздействий на пищеварительные ферменты родительских видов и их гибридных форм.

5. Оценить влияние ионов металлов на уровень активности пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов.

6. Произвести оценку комплексного влияния температуры и ионов металлов на пищеварительные процессы.

7. Выявить механизмы регуляции уровня активности пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов с помощью модификаторов углеводной и белковой природы.

8. Оценить эффекты взаимодействия основных пищевых веществ в гидролитическом процессе у осетрообразных видов рыб и их гибридов.

Научная новизна. Выявлены морфо-функциональные особенности ферментных систем, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб отряда Acipenseriformes и их гибридных форм. При этом показано, что свойства пищеварительных ферментов у исследованной группы рыб значительно

адаптированы к условиям функционирования, что обеспечивает оптимальное протекание пищеварительных процессов в естественных условиях.

Впервые описаны ультраструктурные особенности строения кишечника осетровых видов и их гибридов. Установлено, что средний отдел кишечника имеет ультраструктурные характеристики, как общие для всех изученных осетровых, так и видоспецифичные. Особенности морфологии кишечного эпителия родительских видов проявляются и у гибридных особей. Впервые у осетровых рыб выявлены клетки, аналогичные М-клеткам млекопитающих, обеспечивающие первичный иммунный ответ.

При исследовании температурных характеристик пищеварительных ферментов было установлено, что у осетрообразных видов температурный оптимум в среднем на 10°C выше, чем у рыб других семейств, обитающих в сходных экологических условиях. Анализ собственных результатов и данных литературы подтвердил представления о том, что температурные характеристики пищеварительных ферментов могут отображать условия существования и эволюции вида в прошлом.

В экспериментах по исследованию влияния концентрации водородных ионов в инкубационной среде на активность гидролитических ферментов установлено, что пищеварительные ферменты осетрообразных видов рыб имеют широкую зону оптимальных значений. Сравнительный анализ показал, что пищеварительные ферменты осетровых рыб обладают рН характеристиками как морских, так и пресноводных видов, что позволяет данной группе осваивать как морскую, так и пресную среды обитания.

Впервые на основе многомерного анализа для данных по влиянию температуры и рН инкубационной среды на пищеварительные ферменты родительских видов и их гибридных форм установлено, что на характеристики ферментов гибрида оказывает влияние как материнский, так и отцовский вид. Это влияние неодинаково для разных ферментов и может существенно меняться при разных значениях температуры и рН инкубационной среды.

При исследовании влияния модификаторов различной природы на активность пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб установлено наличие регуляторной функции ионов металлов, углеводов и аминокислот. Предполагается, что ферменты рыб в пределах семейства осетрообразных могут иметь схожую структуру регуляторных центров.

Теоретическая и практическая значимость. На основе описанных в работе закономерностей можно дать рекомендации по разработке кормов, четко сбалансированных по содержанию основных групп пищевых субстратов, для выращиваемых видов рыб, что позволит обеспечить максимальную эффективность гидролитических процессов. Полученные результаты могут использоваться в разработке теоретических основ биотехнологии культивируемых объектов аквакультуры, а также при изучении болезней рыб и нарушений у них пищеварительной функции как в аквакультуре, так и в естественных условиях.

Кроме того, описанные закономерности могут быть использованы для оптимизации условий выращивания осетрообразных видов рыб и их гибридных форм, в том числе и при проведении селекционной работы. В частности, влияние температуры и рН среды необходимо учитывать при расчете норм кормления объектов аквакультуры, а также при поддержании данных факторов на оптимальном уровне. В процессе селекции рыб необходимо учитывать влияние родительских видов на характеристики ферментов, наследуемых гибридами, с целью получения наиболее оптимальных значений у гибридных форм.

Результаты работы включены в курсы лекций по подготовке бакалавров и магистров в области рыбного хозяйства, биологии и экологии.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории «Физиология питания рыб» ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет». В основу работы положены данные, полученные с 2004 года.

В работе исследовано 6 видов рыб (кл. Костистые рыбы Osteichthyes) - представителей отряда Осетрообразные (Acipenseriformes), относящиеся к двум ныне живущим семействам (сем. Осетровые (Acipenseridae): белуга (*Huso huso* Linnaeus, 1758), ленский осетр (*Acipenser baerii* Brandt, 1869), русский осетр (*A. gueldenstaedtii* Brandt, 1833), стерлядь (*A. ruthenus* Linnaeus, 1758), севрюга, (*A. stellatus* Pallas, 1771) и сем. Веслоносые (Polyodontidae): веслонос (*Polyodon spathula* Walbaum, 1792), относящиеся к различным экологическим группам и эволюционировавшие в различных условиях. Также в работе были исследованы основные гибридные формы представителей сем. Осетровые: бестер (*Huso huso* L. × *Acipenser ruthenus* L.) – гибрид, полученный оплодотворением икры белуги спермой стерляди, стербел (*Acipenser ruthenus* L. × *Huso huso* L.) – гибрид, полученный оплодотворением икры стерляди спермой белуги, РОЛО (*Acipenser gueldenstaedtii* B. × *Acipenser baerii* B.) – гибрид, полученный оплодотворением икры русского осетра спермой ленского осетра.

Исследовались годовики, которые были получены и выращены в искусственных условиях (НЭБ ФГУП «КаспНИРХ» - центр «БИОС»). Пойманных рыб в течение 1-2 часов доставляли в лабораторию, затем готовили гомогенаты для биохимического анализа *in vitro*. Объем и характеристика собранного материала представлены в табл. 1.

В работе использованы ихтиологические (морфометрические), гистологические (методы световой и электронной микроскопии), физиолого-биохимические методы, методы математического анализа и статистики.

Для определения активности ферментов использовали гомогенат слизистой оболочки медиального отдела кишечника, приготовленные на растворе Рингера для холоднокровных животных (109 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 1.1 мМ CaCl₂, 1.2 мМ NaHCO₃). Для определения казеинлитической активности протеиназ гомогенат готовился на фосфатном буфере (1/15 М Na₂HPO₄ · 2H₂O и 1/15 М KH₂PO₄ в соотношении 4 : 1). Уровень активности α-амилазы (КФ 3.1.1.1) определяли по убыли крахмала модифицированным методом Смита и Роя (Smyth, Roe, 1949),

активность мальтазы (КФ 3.2.1.20) – модифицированным глюкозооксидазным методом (Dahlqvist, 1964; Неваленный и др., 2005), щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) – по степени гидролиза *n*-нитро-фенилфосфата Na. Казеинлитическую активность протеиназ (КФ 3.4.21) в нейтральной (рН = 7,4) среде определяли методом Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации (Неваленный и др., 2005). Активность ферментов выражали в мг или мкмоль продукта гидролиза, образующегося за 1 мин инкубации в расчёте на 1 г влажной массы слизистой.

Таблица 1

Объем и характеристика собранного материала.

Вид или гибридная форма	Количество экземпляров (n)	Длина, см	Масса, г
Русский осетр	306	34.0±1.5	221.0±17.0
Ленский осетр	318	37.5±1.6	243.0±15.5
РОЛО	340	39.0±2.7	268.0±28.0
Белуга	294	36.0±2.0	344.0±26.0
Стерлядь	357	31.5±1.5	130.0±6.5
Бестер	304	42.5±3.8	385.0±29.0
Стербел	326	41.8±3.5	379.0±25.7
Севрюга	288	30.5±1.8	87.5±5.5
Веслонос	293	52.0±2.5	490.0±15.0

При исследовании влияния температуры гомогенаты медиального отдела кишечника и соответствующие субстраты инкубировали в диапазоне температуры 0-65°C для щелочной фосфатазы и 0-60°C для α -амилазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ. Определение влияния рН проводили в диапазоне 3-12 при температуре инкубации 25°C.

В качестве источника ионов металлов использовали сернокислые соли (MnSO₄, FeSO₄, CoSO₄, NiSO₄, CuSO₄, ZnSO₄). Растворы этих солей добавляли в ферментативно-активный препарат и субстрат в количестве, необходимом для создания в этих средах концентрации соответствующего иона в 10 мг/л.

В качестве моносахаридов использовали 10 mM растворы глюкозы, фруктозы и смесь глюкозы и фруктозы с концентрацией каждого из модификаторов в 5 mM, в качестве аминокислот - 10 mM растворы глицина, L-глутамин, L-лейцин, DL- β -фенила- α -аланина. Модификаторы добавляли в ферментативно активный препарат и раствор субстрата непосредственно перед началом инкубации.

При исследовании полисубстратного пищеварения до недавнего времени использовали, как правило, простейшую модель одновременного переваривания двух пищевых веществ. Однако данный методический подход в полной мере не отражает всех сторон реально протекающих пищеварительных процессов. В связи с этим нами была выбрана трисубстратная модель, где одновременно перевариваются белки, углеводы и эфиры фосфорной кислоты. Данный

методический подход был предложен и апробирован Неваленным А.Н. с соавторами (Неваленный, 1996; Неваленный и др., 2003; Неваленный и др., 2011).

Для исследования ультраструктурной организации кишечного эпителия применялись классические методы электронной микроскопии (Гайер, 1974; Уикли, 1975; Луппа, 1980). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-NOVA при помощи стеклянных ножей, а затем монтировали их на сетки или бленды с подложками, изготовленными из раствора формвара или пиолоформа на диоксиде кремния. Контрастирование ультратонких срезов проводили в водных растворах уранилацетата при температуре 37°C и цитрата свинца во влажной камере при комнатной температуре, в присутствии сухого NaOH. Время контрастирования ультратонких срезов для каждого объекта подбиралось опытным путем. Срезы просматривали на трансмиссионных электронных микроскопах JEOL JEM -100С и HITACHI.

Полученные результаты обрабатывались с использованием стандартного пакета прикладных программ STATISTIKA 6.0 и MS Excel 2007. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). При сравнении результатов проводили однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующей оценкой достоверности различий при помощи Dunnett-теста, $p \leq 0.05$.

Кластерный анализ представляет собой совокупность алгоритмов классификации, позволяющих представить изучаемое множество данных единой размерности в виде компактной схемы классификации. Анализировали данные по уровню активности каждого из исследуемых ферментов у:

- русского осетра, ленского осетра и их гибрида РОЛО;
- белуги, стерляди и их гибрида бестера;
- белуги, стерляди и их гибрида стербела при различных значениях температуры и рН инкубационной среды.

В качестве способа определения расстояния между объектами было выбрано расстояние городских кварталов, которое определяется по формуле

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

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

Объединение кластеров осуществлялось методом невзвешенного попарного среднего, в соответствии с формулой

$$d(r, s) = \frac{1}{n_r n_s} \sum_{i=1}^{n_r} \sum_{j=1}^{n_s} [dist(x_{ri}, x_{sj})]$$

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Эпителий среднего отдела кишечника осетровых видов рыб имеет ультраструктурные особенности, как общие для всех изученных ранее рыб, так и видоспецифичные. Особенности ультраструктурного строения кишечного эпителия родительских видов наблюдается и у гибридных особей.

2. Гибриды осетровых видов рыб наследуют характеристики пищеварительных ферментов от обоих родителей, влияние родительских видов на ферментные системы гибрида может существенно изменяться при разных значениях воздействующих факторов.
3. Пищеварительные ферменты осетрообразных видов рыб имеют широкую зону оптимальных значений экологических факторов, что свидетельствует о продолжающейся адаптации к современным условиям среды обитания. Пищеварительные ферменты данной группы рыб имеют характеристики присущие как морским, так и пресноводным видам.
4. Регуляторные центры пищеварительных ферментов у рыб в пределах семейства имеют близкую структуру. Регуляторные центры у рыб сем. Acipenseridae имеют существенные отличия от таковых у рыб сем. Polyodontidae.
5. Активность пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов подвержена прямому субстратному регулированию. В отличие от гомойотермных животных, у рыб эффект взаимодействия модификатора может существенно варьировать в силу большей гибкости макромолекул.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на Международной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2004); VI, VII, VIII Всероссийских конференциях «Физиология висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2008, 2009, 2012); Международной научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем» (Астрахань, 2008); Международной научной конференции «Молекулярные механизмы адаптации» (Махачкала, 2008); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоэкологии» (Москва, 2008); VI Международной научно-практической конференции «Проблемы сохранения и рационального использования биоразнообразия Прикаспия и сопредельных территорий» (Элиста, 2009); 6 International symposium on sturgeon (Wuhan, China, 2009); Международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана» (Владивосток, 2010); Международной научно-практической конференции «Татищевские чтения: актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды» (Тольятти, 2010); XXI Съезде физиологов им И.П. Павлова (Калуга, 2010); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной науки и образования» (Уфа, 2010); I Всероссийской конференции с международным участием «Современное состояние биоресурсов внутренних водоемов» (Борок, 2011); 7 Международной Биогеохимической школе (Астрахань, 2011); Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 2012); II Международной научной интернет-конференции «Математическое и компьютерное моделирование в биологии и химии. Перспективы развития» (Казань, 2013); Всероссийской научной интернет-

конференции с международным участием «Физические процессы в биологических системах» (Казань, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 46 работ, в том числе 22 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 320 страницах машинописного текста, иллюстрирована 127 рисунками и 13 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, 6 глав с изложением собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, который включает 495 источников, в том числе 270 работ отечественных и 225 работы иностранных авторов.

Благодарность. Автор выражает сердечную благодарность и искреннюю признательность своему учителю - д.б.н., профессору Неваленному Александру Николаевичу за постоянное внимание, критические замечания и советы, а также коллегам – соавторам совместных публикаций Корневой Ж.В., Федоровой Н.Н., Мартьянову А.С., Новинскому В.Ю. за неоценимую помощь в совместном сборе материалов и получении экспериментальных данных.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Сравнительная характеристика ультраструктуры кишечного эпителия осетровых рыб и их гибридов

Осетровые виды рыб - это достаточно высокоспецифичная группа. Благодаря наличию примитивных черт в морфологии они существенно отличаются от всех остальных представителей ихтиофауны. Несмотря на древность происхождения и примитивность морфологии, осетровые виды рыб до недавнего времени находились в состоянии биологического прогресса и занимали большой ареал обитания в результате различного рода адаптаций на популяционном, организменном и клеточном уровне (Гербицкий, 1962).

При гистологическом исследовании эпителия средней кишки, пилорической железы и спирального клапана установлено, что, несмотря на общую структурную организацию, существуют определенные различия в строении пищеварительного тракта различных видов осетровых. В частности отмечена значительная разница в высоте кишечных ворсинок в среднем отделе кишечника: у белуги их высота составляет $290,4 \pm 5$ мкм, у стерляди $146,4 \pm 2,3$ мкм, у севрюги $194,2 \pm 2,5$ мкм. Эти различия, прежде всего, могут быть связаны с типом питания рыб. Так белуга является типичным хищником, стерлядь - бентофагом, севрюга занимает промежуточное положение, поскольку в ее рационе встречается больше белковой пищи (Иванов, Комарова, 2008; Иванов, Егорова, 2012). Гистологическое строение кишечной трубки гибридных форм занимает промежуточное положение. Например, высота кишечных ворсинок у бестера и стербела составляет $180,9 \pm 2,8$ мкм и $175,1 \pm 1,8$ мкм соответственно, что меньше, чем у белуги и больше, чем у стерляди. У РОЛО так же отмечено сходство гистологического строения пищеварительного тракта с родительскими формами.

Ранее при ультратонком исследовании строения энтероцитов рыб разных таксономических групп были выявлены вариации в длине микроворсинок (Уголев, Кузьмина, 1993; Kuperman, Kuz'mina, 1994), электронной плотности цитоплазмы и митохондриального матрикса (Abaurrea-Equisoain, Ostos-Garrido, 1996). Для всех изученных нами видов осетровых рыб характерными признаками энтероцитов оказались слабое развитие гликокаликса на микроворсинках, способность к пиноцитозу (рис. 1), наличие в цитоплазме разнообразных микрофиламентов, а так же скопление митохондрий в апикальной и базальной части клеток.

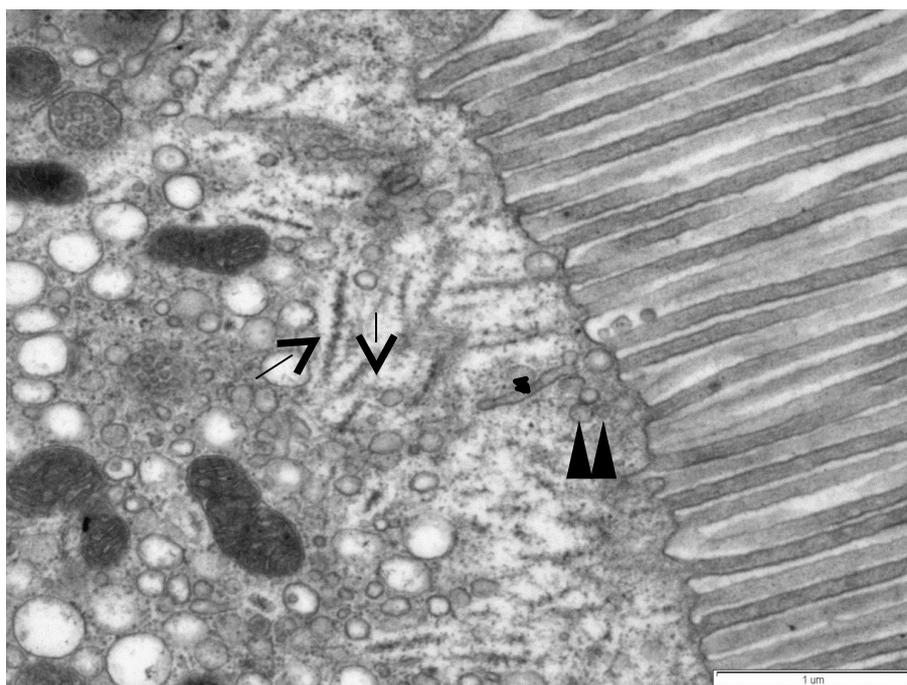


Рис. 1. Пиноцитозные вакуоли (отмечены двойными стрелками), пиноцитозные каналы (отмечены звездочками) и микрофиламенты (отмечены стрелками) в энтероцитах кишечного эпителия белуги

Отличительной особенностью является то, что в базальной части энтероцитов, несмотря на присутствие митохондрий, мембрана не формирует выросты, направленные вглубь цитоплазмы, что характерно для клеток, принимающих участие в процессах осморегуляции в ренальной ткани и энтероцитах у морских рыб (Iwai, 1968; Vianna et al., 2000). У пресноводных видов рыб данная особенность не описана (Kuperman, Kuz'mina, 1994). Кишечник осетровых рыб играет важную роль в поддержании осмотического и ионного гомеостаза в условиях увеличения солёности воды (Краюшкина, 1998). Ранее было установлено, что осетровые обладают значительной степенью эвригалинности с самых ранних этапов онтогенетического развития. Развитие органов осморегуляции происходит одновременно с развитием всего организма, т.е. молодь, выращенная в одних и тех же условиях, неравноценна по состоянию

осморегуляторной системы, развитие которой связано в основном с размером рыб, нежели с их возрастом (Краюшкина, Дюбин, 1974). В нашей работе были исследованы годовики, содержащиеся в бассейнах с пресной водой, и следовательно, их энтероциты еще не принимали участия в процессах осморегуляции. Однако имеет место опережающее формирование системы осморегуляции, которая должна начать работать сразу после попадания рыб в условия повышенной солёности.

Несмотря на то, что схема организации пищеварительного эпителия у всех исследованных видов одинакова, отмечены и видоспецифичные ультраструктурные особенности. Так в составе эпителиального пласта русского и ленского осетров и их гибрида РОЛО на апикальной поверхности энтероцитов присутствовали не только микроворсинки, но и реснички (рис. 2). У других видов и гибридных форм данной особенности не обнаружено. Ресничные клетки были ранее описаны для взрослых особей миноги, веслоноса и сенегальского многопера (Weisel, 1973; Abdel Magid, 1975; Hansen, Youson, 1978). Наличие ресничных клеток в составе кишечного эпителия рыб считается примитивным признаком (Weisel, 1973; Iwai, 1981).

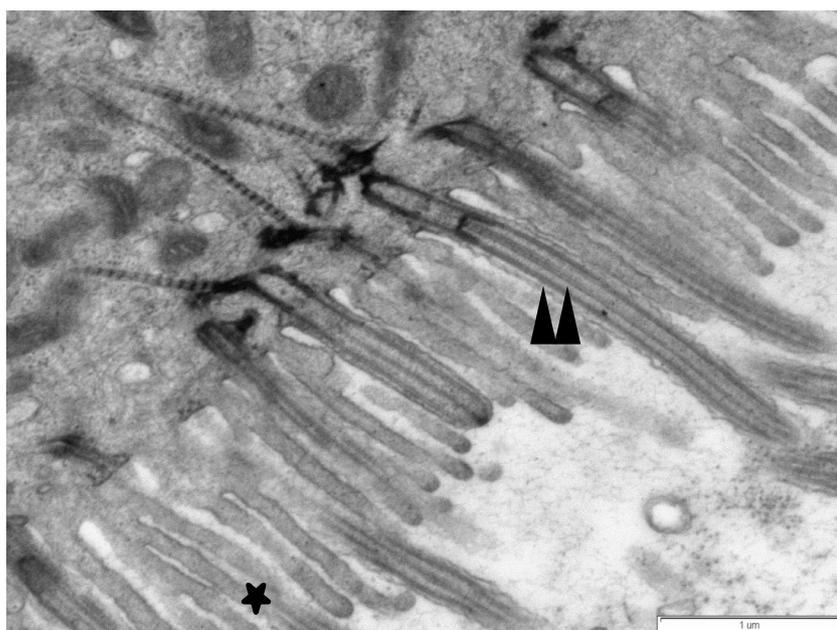


Рис. 2. Микроворсинки (отмечены звездочкой) и реснички (отмечены двойными стрелками) на апикальной поверхности энтероцитов кишечника ленского осетра

Обнаруженные у стерляди и стербела энтероциты с электронно-плотной цитоплазмой по основным ультраструктурным характеристикам не отличаются от типичных энтероцитов. Присутствие энтероцитов двух типов было описано ранее для радужной форели и миноги (Hansen, Youson, 1978; Abaurrea-Equisoain, Ostos-Garrido, 1996), причем авторами также не было выявлено существенных

отличий в строении клеток данного типа. На наш взгляд, наблюдаемые различия в морфологии клеток могут быть обусловлено их физиологическим состоянием.

У стерляди, белуги и их гибридов терминальная сеть в апикальной части энтероцитов развита умеренно, однако присутствуют пучки микрофиламентов, которые не обнаружены у русского и ленского осетров и их гибрида – РОЛО, причем у гибрида терминальная сеть развита лучше. Таким образом, можно говорить об ультраструктурных особенностях энтероцитов, характерных для определенных видов и их гибридных форм. Клетки, наблюдаемые в составе эпителиального пласта, с крупным окаймленным секретом, относятся к иммунокомпетентным клеткам (рис. 3) крови, которые способны свободно мигрировать из кровяного русла и проникать в различные органы и ткани (Хэм, Кормак, 1983; Temkin, McMillan, 1986). Обнаруженные клетки схожи с эозинофилами и нейтрофилами осетровых рыб, описанных в гемопоэтической ткани осетровых (Балабанов, 2009).

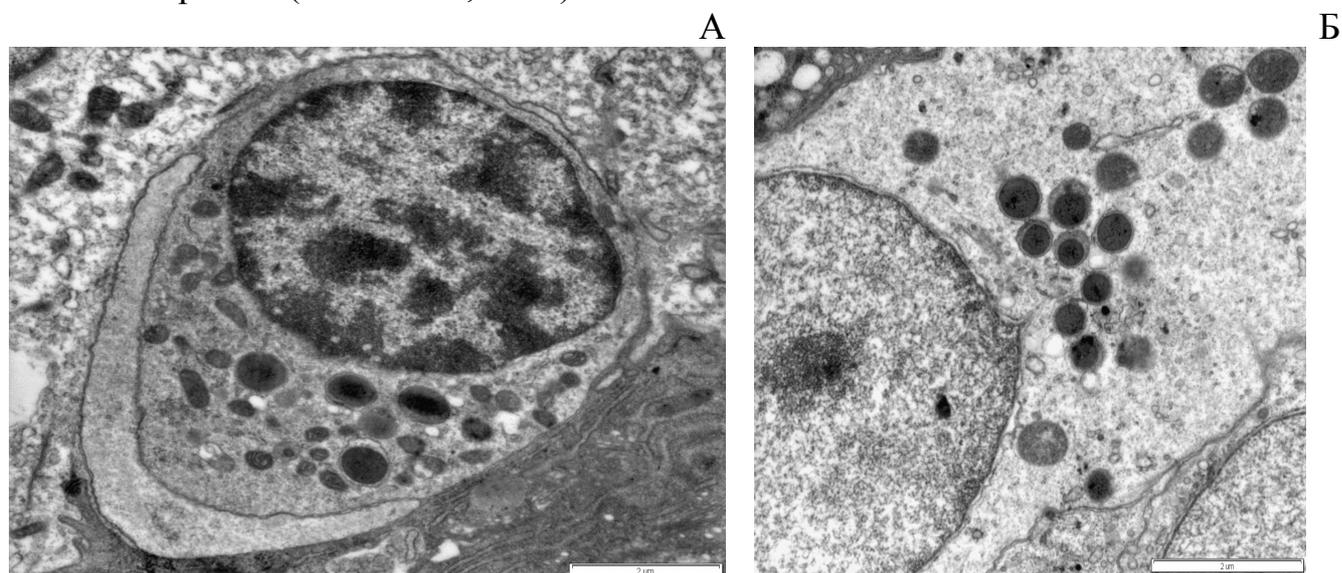


Рис. 3. Иммунокомпетентная клетка в кишечном эпителии ленского осетра (А) и стербела (Б)

У всех исследованных осетровых видов рыб и их гибридных форм среди типичных энтероцитов обнаружены клетки, на поверхности которых располагаются складки и атипичные микроворсинки, а в цитоплазме находятся крупные фагосомы или остаточные тела. Такие клеточные элементы относят к специфическим М-клеткам (рис. 4), описанным в эпителиальном слое некоторых млекопитающих (Gebert et al., 1999; Kucharzik et al., 2000). Ранее было установлено, что данные клетки представляют собой отдельную клеточную линию и происходят из клеток-предшественников независимо от энтероцитов, бокаловидных клеток и других клеточных типов (Gebert et al., 1999). Предполагается, что такие М-клетки обеспечивают первый непосредственный контакт между антигенами, поступающими с эндоцитозными вакуолями вглубь клетки с апикальной стороны, и специализированными иммунными клетками

(Nicoletti, 2000; Kucharzik et al., 2000). У стерляди и стербела под базальным матриксом кишечного эпителия отмечены скопления эозинофилов, приуроченные к базальному отделу клеток, аналогичных М-клеткам. Можно предположить, что обнаруженные у осетровых клетки также отвечают за первичный иммунитет при контакте кишечного эпителия с чужеродными антигенами и микроорганизмами.

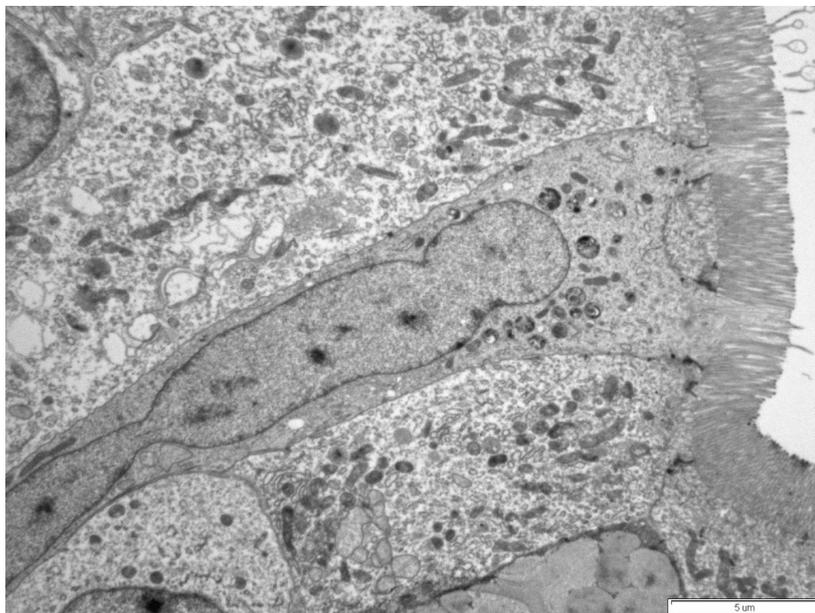


Рис. 4. Отростчатая клетка, образующая выросты апикальной поверхности (по видимому, М-клетка) в среднем отделе кишечника русского осетра

В базальной части кишечного эпителия у большинства изученных нами рыб выявлены секреторные клетки с мелким, окаймленным и неокймленным электронно-плотным сектором. В их цитоплазме содержится небольшое количество органоидов, секреторные гранулы в основном располагаются в базальной части (рис. 5). Без специальных иммуноцитохимических исследований невозможно точно определить природу данных элементов, однако известно, что в эпителии, выстилающем желудок тилапии, обнаружено два типа эндокринных клеток (Gargiulo et al., 1997). В данном случае, скорее всего, выявлены секреторные клетки, относящиеся к эндокринным элементам, сходным по морфологическим признакам с клетками, описанными в литературе (Хэм, Кормак, 1983; Gargiulo et al., 1997).

Таким образом, эпителий среднего отдела кишечника имеет ультраструктурные характеристики, как общие для всех изученных осетровых видов рыб, так и видоспецифичные. Особенности кишечного эпителия, характерного для родительских форм, отмечены и у гибридов. Впервые у осетровых описаны клетки, аналогичные М-клеткам млекопитающих, которые обеспечивают первичный иммунный ответ.

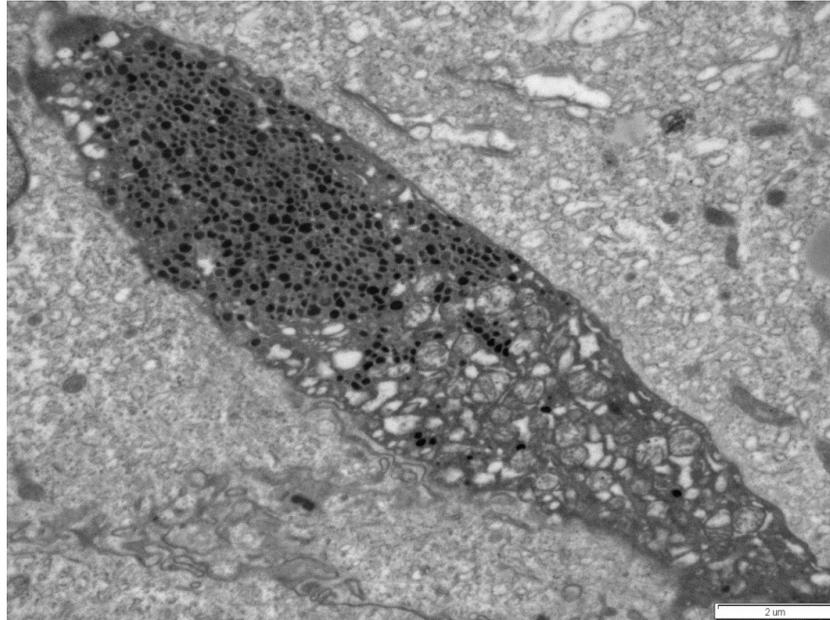


Рис. 5. Энтероэндокринная клетка в кишечном эпителии ленского осетра

2. Нутритивные адаптации пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов

Детальное понимание эволюционных и адаптивных перестроек системы пищеварения у рыб возможно лишь при тщательном изучении воздействия факторов внешней и внутренней среды. В настоящее время четко установлено, что уровень активности пищеварительных ферментов зависит от таких экологических особенностей среды, как температура, pH, солёность, количество минеральных и органических взвесей и т.д. (Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004; Кузьмина, 2005, 2008, 2010; Голованова и др., 2010). Кроме того, хорошо известно об адаптации пищеварительных ферментов к характеру питания рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004; Кузьмина, 2005) и к диетам (Неваленный и др., 2003; Коростелев, 2006).

У пресноводных рыб, отнесенных по типу питания к различным экологическим группам, характеристики одноименных ферментов могут существенно отличаться. Так, при исследовании ферментов, осуществляющих процессы мембранного пищеварения, было установлено, что уровень активности α -амилазы максимален у типичных бенто- и планктонофагов, несколько ниже у хищников – факультативных бенто- и планктонофагов, а минимален у типичных хищников (Кузьмина, 1981). Подобная закономерность описана и для других энтеральных гидролаз, таких как γ -амилаза, мальтазы и инвертазы (Кузьмина, 1978). Ранее нами при исследовании 12 видов рыб (в том числе и представителей сем. Осетровые), относящихся к разным экологическим и систематическим группам, также было показано, что активность казеинлитических протеиназ значительно выше у типичных хищников, а активности мальтазы у планкто- и бентофагов (Бедняков, 2004). При этом уровень активности одноименных

ферментов у разных видов рыб может отличаться на порядок. Однако при исследовании осетрообразных видов рыб данной закономерности не обнаружено. Уровень активности ферментов у всех исследованных видов отличался незначительно: активность α -амилазы изменялась от $9,22 \pm 0,35$ мкмоль/г·мин у веслоноса до $16,53 \pm 0,16$ мкмоль/г·мин у стербела, активность казеинлитических протеиназ - в пределах от $0,94 \pm 0,02$ мкмоль/г·мин у веслоноса до $5,79 \pm 0,13$ мкмоль/г·мин у стербела. Однако ранее при исследовании пищеварения у осетровых видов рыб было отмечено, что типичный хищник белуга обладает максимальной активностью протеиназ и минимальной карбогидраз, у русского осетра уровень протеиназ ниже и самый низкий - у типичного бентофага севрюги. Активность мальтазы, напротив, у севрюги максимальна, а у русского осетра и белуги минимальны (Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004). Выявленные различия, по всей вероятности, объясняются условиями кормления исследованных видов рыб. Так ранее нами были исследованы особи, пойманные из естественной среды обитания, а в данной работе изучаются особи, выращенные в бассейновых условиях и получавших искусственный корм. Данный факт подтверждает предположение А.Н. Неваленного с соавторами (2003) о том, что адаптивные перестройки систем, участвующих в процессах мембранного пищеварения, осуществляются при непосредственном участии прямого субстратного регулирования.

Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что уровень активности одноименных ферментов у гибридных особей в некоторых случаях выше, чем у родительских. Например, уровень активности мальтазы у РОЛО составляет $12,08 \pm 0,21$ мкмоль/г·мин, в то время как у русского и ленского осетров $7,03 \pm 0,30$ и $8,27 \pm 0,22$ мкмоль/г·мин соответственно. Эти данные частично объясняют тот факт, что гибридные особи имеют, как правило, более высокие темпы роста, нежели родительские формы (Васильева, 2000).

3. Температурные адаптации пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов

Одним из основных факторов среды, оказывающим непосредственное влияние на скорость всех биохимических процессов в организме, является температура. Температурные адаптации мембранно-связанных пищеварительных ферментов у холоднокровных животных исследованы достаточно подробно (Неваленный и др., 2003; Коростелев, 2006, Кузьмина, 2005, 2008). В частности установлено, что температурные оптимумы одноименных ферментов у различных видов могут отличаться на десятки градусов. Известно, что свойства ферментов во многом определяются экологическими особенностями исследуемых видов рыб (Неваленный и др., 2003; Кузьмина, 2005; Коростелев, 2006; Новинский, 2011). Так, щелочная фосфатаза слизистой оболочки кишечника рыб, обитающих в разных зонах Атлантического океана, имеет разные температурные оптимумы: $50-60^\circ\text{C}$ у рыб тропической зоны (скупбрия, сардинелла, ставрида) и 30°C у глубоководных видов, обитающих при температурах $4-5^\circ\text{C}$ (Уголев и др., 1976).

Аналогичные результаты были получены и для рыб, обитающих в умеренных широтах: 45°C у судака, 40°C у леща и форели (Gelman et al., 1992). У дикой микижи, обитающей в северных Дальневосточных морях, температурный оптимум отмечен при 30°C, у кеты, обитающей в более теплых водах, при 40°C (Коростелев, 2006). У рыб, обитающих в водоемах Волго-Каспийского бассейна, температурный оптимум щелочной фосфатазы находится, как правило, при 50°C (Туктаров, Левченко, 2003). Аналогичные закономерности описаны для большинства пищеварительных ферментов рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Неваленный и др., 2003; Коростелев, 2006; Кузьмина, 2005). Так, при исследовании протеиназ и карбогидраз у рыб, обитающих в условиях Севера, выявлены адаптивные перестройки температурных характеристик ферментов, наиболее значительные для сахаразы (Пономарев, 1992, 1997).

Установлено, что кроме температуры окружающей среды на температурные характеристики ферментов существенное влияние оказывает и тип питания рыб. Так, у типичных хищников, способных питаться при температуре 0°C, температурный коэффициент для α -амилазы в зоне физиологических температур составляет 1,1-1,6, что ниже, чем у бенто- и планктонофагов, которые начинают питаться при температуре воды около 10°C (Кузьмина, Морозова, 1977). При сравнении температурных характеристик ферментов у бентофагов и ихтиофагов, обитающих в бассейне р. Печоры, данные закономерности не выявлены, что объясняется значительной эврифагией рыб северных водоемов (Пономарев, 1992). Низкая температура приводит к снижению активности карбогидраз в большей степени у планкто- и бентофагов, нежели у хищных (Голованова, 1997).

При исследовании влияния температуры инкубации на ферментативную активность слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб и их гибридов отличий в температурных характеристиках одноименных ферментов у рыб разных трофических групп не выявлено. Так, температурный оптимум щелочной фосфатазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ отмечен в диапазоне температуры 50-60°C, α -амилазы – 25-30°C. Температурные оптимумы одноименных ферментов у рыб, обитающих в близких экологических условиях, как правило, различаются на 10°C (Неваленный и др., 2003). Отсутствие зависимости температурных характеристик ферментов от типа питания рыб можно объяснить тем, что все исследованные виды получали комбикорм одного состава. Однако в ранее проведенных исследованиях на осетровых, выловленных из водоемов нижней Волги и питавшихся в естественных условиях, также не обнаружено данной зависимости (Неваленный и др., 2003). Обращает на себя внимание и то, что все собственнокислечные ферменты осетрообразных видов рыб сохраняют высокую относительную активность в достаточно широком диапазоне температуры (рис. 6). Даже при температуре 0°C уровень активности ферментов, как правило, составляет 25% от максимальной активности, а α -амилазы - 80-90% (рис. 7).

А

Б

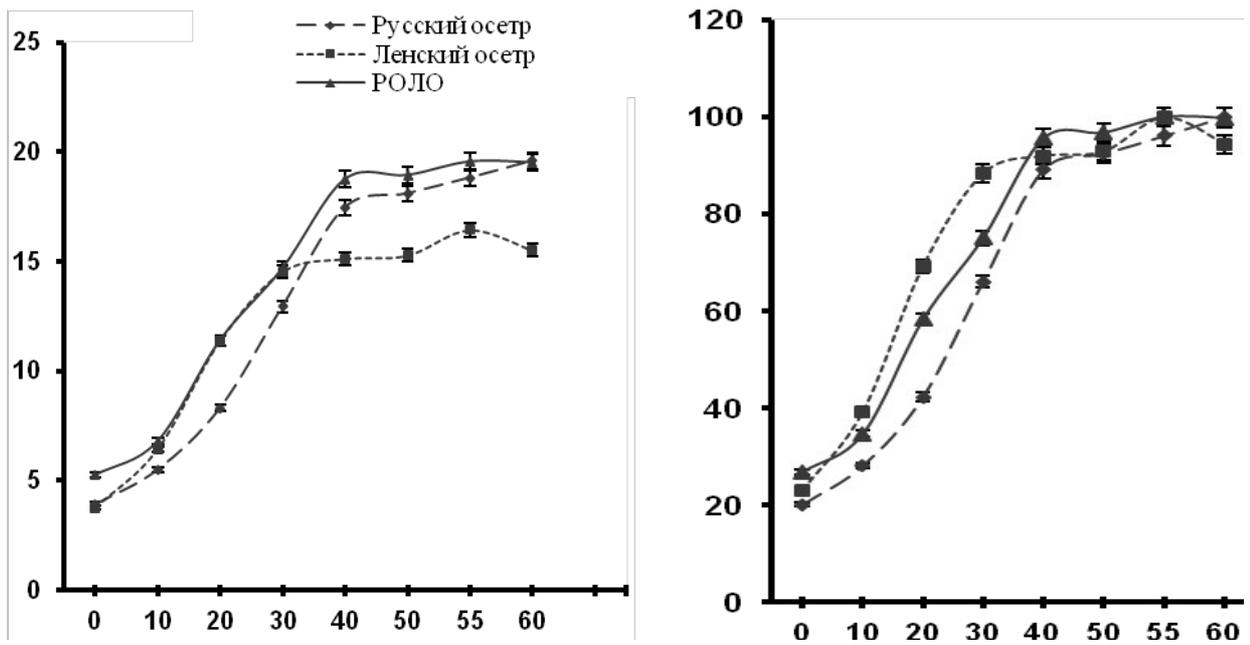


Рис. 6. Зависимость активности мальтазы кишечника русского осетра, ленского осетра и РОЛО от температуры инкубации. По оси абсцисс – температура (°C); по оси ординат – (А) – активность фермента (мкмоль/г×мин), (Б) – относительная активность в % от максимальной активности, принятой за 100%

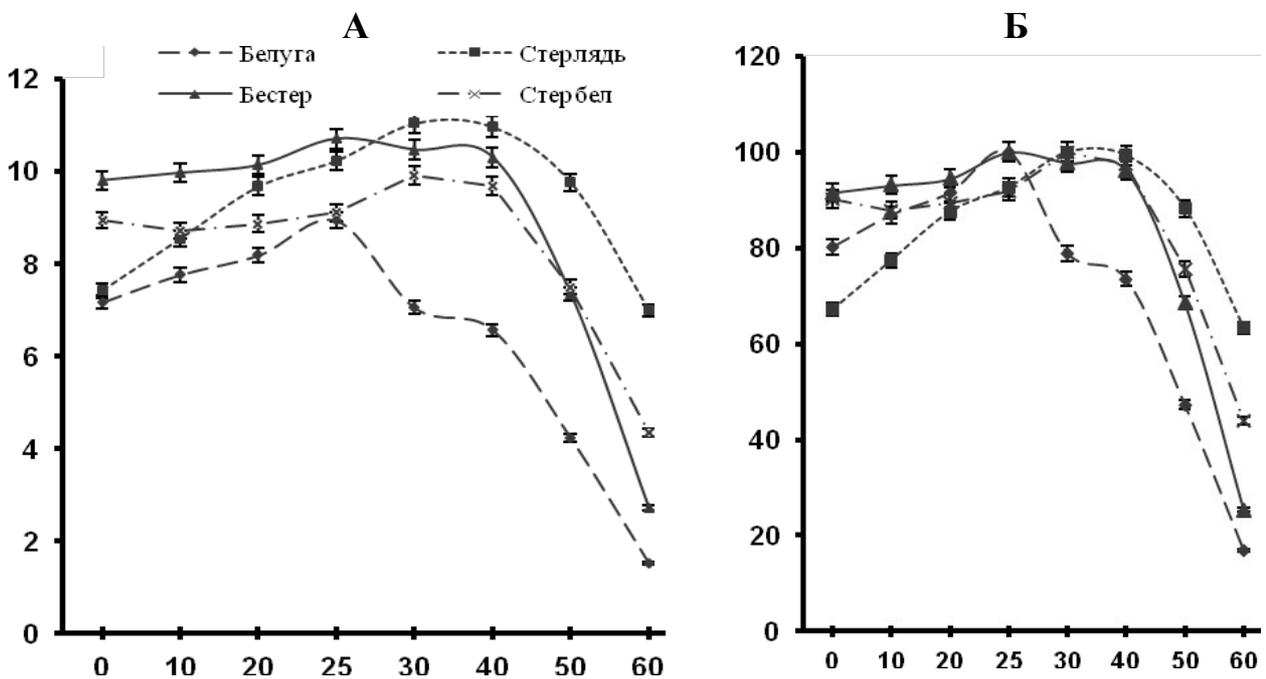


Рис. 7. Зависимость активности α -амилазы кишечника белуги, стерляди, бестера и стербела от температуры инкубации. По оси абсцисс – температура (°C); по оси ординат – (А) – активность фермента (мг/г×мин), (Б) – относительная активность в % от максимальной активности, принятой за 100%

Столь высокие значения температурного оптимума пищеварительных ферментов у осетровых хорошо согласуются с предположением о том, что в

некоторых случаях температурные оптимумы могут отражать условия существования и эволюцию вида в далеком прошлом. Так, при исследовании угольной сабли, обитающей при температурах 4-5°C, но исторически формировавшейся в условиях тропического климата, температурный оптимум щелочной фосфатазы, как и у других тропических видов рыб, составляет 60°C (Гельман, 1976). У белорыбицы, обитающей в Волго-Каспийском бассейне, но формировавшейся в условиях холодных вод Северного-Ледовитого океана, температурный оптимум для большинства ферментов обнаружены в диапазоне 20-50°C (Неваленный и др., 2003). Температурный оптимум пищеварительных ферментов у древнейшего отряда осетрообразных, по-видимому, отражает адаптацию ферментных систем на заре эволюции этих видов.

Ископаемые остатки первых осетрообразных рыб впервые обнаруживаются в нижнеюрских отложениях (около 200 млн. лет назад). Однако, по данным генетиков, появление осетрообразных относят к пермскому периоду (около 300 млн. лет назад) (Александровская и др., 1988). При этом самый древний из известных осетров — хондростеус относится к раннеюрской эпохе. Таким образом, считается, что первые представители данного отряда возникли около 170 млн. лет тому назад в начале юрского периода и достигли своего расцвета в меловой период (Палатников, Касимов, 2008; Дубчак, 2010). Географически они могли возникнуть на территории современной Северной Америки (Миллер, 1969) или на территории современной центральной Азии (Birstein, De Salle, 1998). В любом случае представители данного отряда должны были эволюционировать в условиях более теплого климата, поскольку в юрский период климат был теплым и влажным, в среднем на Земле было теплее на 5-10° или даже на 15° (Sellwood, Valdes, 2008) в меловой период отмечается понижение температуры, однако климат, по-прежнему, оставался гораздо теплее современного (Климат в эпохи ..., 2004). Данные периоды также характеризуются мощной вулканической активностью, в результате чего наблюдался разогрев атмосферного воздуха и воды мирового океана (Rees et al., 2000; Климат в эпохи ..., 2004; Selwood, Valdes, 2008; Иванов, Егорова, 2012). Именно этим можно объяснить адаптацию ферментов осетрообразных видов рыб к действию высоких температур. Кроме того широкая зона температур, при которой ферменты сохраняют высокую относительную активность, может свидетельствовать о продолжающейся адаптации данной группы рыб к современным условиям среды обитания. Это предположение подтверждает тот факт, что осетровые эволюционируют с огромной скоростью, демонстрируя необыкновенную гибкость и способность адаптироваться к условиям постоянно изменяющейся среды обитания (Fridman, 2009; Rabosky, Smith, 2013; Rabosky et al., 2013).

Изложенные выше факты, а также то, что температурный оптимум ферментов выше, чем температура среды обитания, и даже не совместимой с жизнью гидробионтов, позволяет согласиться с предположением В.А. Александрова (1975, 1985) о том, что термостабильность белков не является полезным признаком в ходе естественного отбора. Скорее всего, наибольшее

приспособительное значение имеет термостабильность на организменном и клеточном уровнях. Механизмы связи термостабильности всего организма в целом и термостабильности молекул пока не вполне ясны (Ушаков, 1974, 1990). Данное замечание делает вполне понятным особый интерес исследователей к изучению свойств ферментов, действующих в зоне физиологических температур (Кузьмина, 2005, 2008; Коростелев, 2006).

Сравнение температурных характеристик одноименных ферментов у родительских видов и их гибридов позволяет предположить, что гибридные особи могут наследовать температурные характеристики одноименных ферментов как от одного родителя, так и от обоих сразу. Так, температурный оптимум α -амилазы (рис. 7) белуги и бестера находится при 25°C, а у стерляди и стербела при 30°C. Таким образом, становится очевидным, что данный признак передается только по материнской линии. При исследовании температурных характеристик мальтазы установлено, что оптимальные значения температуры инкубации находятся при 55 и 60°C для белуги и стерляди соответственно, для их гибрида бестера - в диапазоне 55-60°C. Таким образом, можно видеть, что в этом случае гибрид унаследовал данный признак от обоих родителей, что может являться одной из причин его высокого темпа роста. Подобная закономерность установлена и для гибрида русского и ленского осетров – РОЛО.

Проведение многомерного статистического анализа для множества данных по влиянию температуры инкубации на пищеварительные ферменты слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и их гибрида – РОЛО позволило сделать вывод о том, что на характеристики пищеварительных ферментов гибрида оказывает большое влияние материнский вид. Однако степень его влияния различна для разных ферментов и может существенно меняться при разных температурах. Так, по результатам многомерного шкалирования, можно выделить характерную особенность: переменные, содержащие информацию о действии на ферменты температуры 60°C образуют отдельный кластер, содержащий данные по русскому осетру и РОЛО, тогда как данные по ленскому осетру удалены от всех основных множеств анализируемых данных.

Кластеризация множества данных для мальтазы слизистой оболочки кишечника исследованных видов и их гибридной формы показала, что в диапазоне температуры 20-30°C данные по РОЛО более близки к таковым по ленскому осетру, а при более высоких температурах – 40-50°C к данным по русскому осетру (рис. 8 А). Для казеинлитических протеиназ (рис. 8 Б) отмечена противоположная картина: при низких температурах (до 40°C) наблюдается большее сходство ферментов РОЛО и русского осетра, при температуре 40°C и выше – с ленским осетром. Также стоит отметить, что сродство гибрида с родительскими видами более выражено при низких значениях температуры.

А

Б

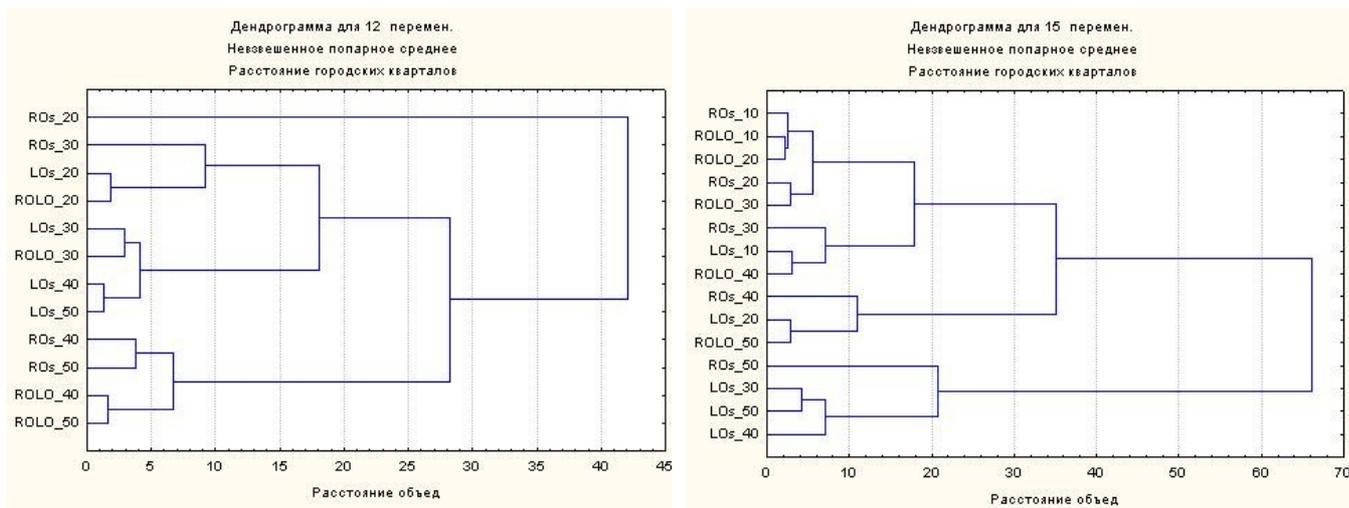


Рис. 8. Результаты кластеризации, полученные для мальтазы (А) и казеинлитических протеиназ (Б) при разных температурах инкубации.

Переменные ROs, LOs и ROLO содержат результаты относительно воздействия температуры инкубации на уровень активности α -амилазы русского осетра, ленского осетра и РОЛО соответственно, в конце имени цифрами обозначена соответствующая температура инкубации.

Анализ множества данных по влиянию температуры инкубации на активность пищеварительных ферментов белуги, стерляди и их гибрида показал, что бестер проявляет наибольшее существенное сродство в отношении стерляди, чем в отношении белуги, которое наиболее сильно выражено в диапазоне температуры от 10 до 50°C. Обращает на себя внимание и тот факт, что ферментные системы белуги и стерляди при значениях температурах от 0 до 20°C демонстрируют близкую ответную реакцию (рис. 9).

Различные ферменты бестера проявляют разное сродство к родительским видам при разных температурах инкубации. Например, в диапазоне от 10 до 40°C α -амилаза слизистой оболочки кишечника бестера более схожа с ферментом стерляди, при температуре 50-60°C – с ферментом белуги. Данные по влиянию температуры на уровень активности мальтазы группируются в отдельные кластеры в соответствии с интенсивностью действующего фактора, а не с происхождением фермента.

В ходе проведения многомерного шкалирования множества данных по влиянию температуры инкубации на уровень ферментов слизистой оболочки кишечника стерляди, белуги и их гибрида – стербела (рис. 10) установлено, что при низких температурах переменные стербела группируются с переменными стерляди, формируя единую область данных, включающую также переменные белуги в диапазоне от 0 до 20°C. Переменные у стерляди и стербела при температуре 30-40°C и выше формируют отдельную группу, расстояния в которой между переменными существенно больше, чем в раннее описанной. Переменные белуги при высокой температуре выделены в группу, существенно удаленную от

прочего множества переменных. Таким образом, очевидно в целом преобладающее сходство реакций ферментов гибрида с ферментами стерляди во всем диапазоне исследуемой температуры. Кроме того, при температурах не выше 20°C, весьма существенно сходство и с ферментами белуги.

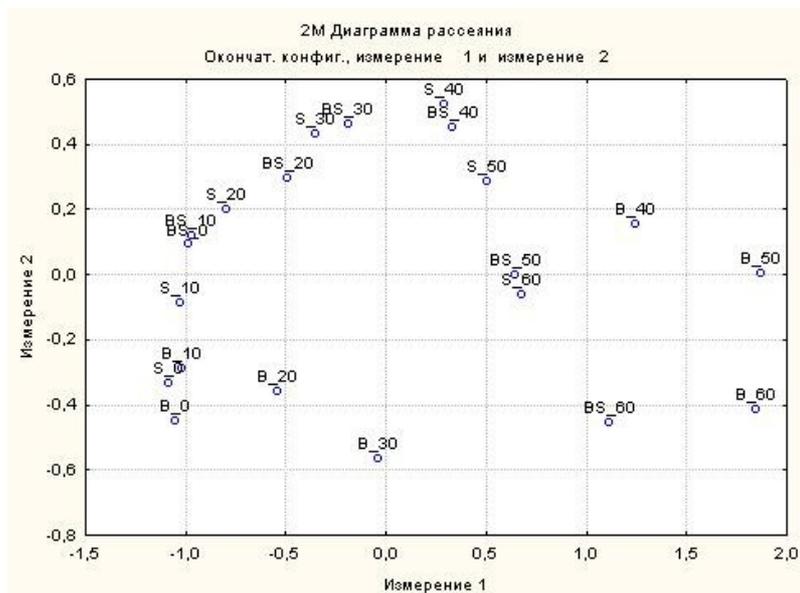


Рис. 9. Двумерная карта, иллюстрирующая расположение экспериментальных данных в пространстве двух координатных осей (индекс В в имени переменной означает данные по белуге, индекс S – по стерляди, BS – по бестеру, числа в имени переменной обозначают температуру инкубации)

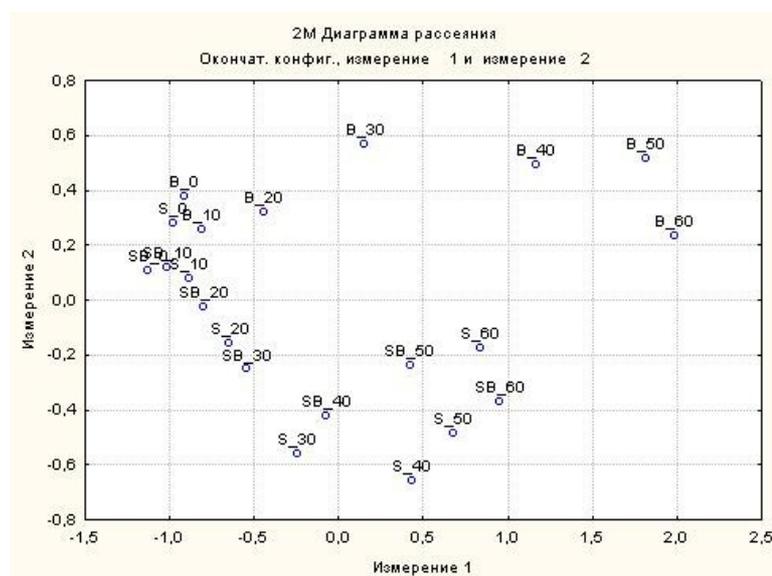


Рис. 10. Двумерная карта, иллюстрирующая расположение экспериментальных данных в пространстве двух координатных осей (индекс В в имени переменной означает данные по белуге, индекс S – по стерляди, SB – по стербелу, числа в имени переменной обозначают температуру инкубации)

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что гибридные формы наследуют характеристики исследованных ферментов от обоих родителей. Влияние материнского вида может или преобладать над влиянием отцовского, как в случае с РОЛО и стербелом, или нет, как в случае с бестером. Это может быть обусловлено схожестью ответных реакции ферментных систем обоих родительских видов на изменение температуры инкубации. Кроме того, влияние родительских видов на ферментные системы гибридной формы может существенно изменяться при различных температурах инкубации. Следовательно, изменяя параметры среды, можно изменять характеристики ферментов гибридных форм и тем самым регулировать скорость пищеварительных процессов, что является весьма актуальным при искусственном выращивании гибридов осетровых видов рыб.

4. Влияние концентрации водородных ионов на активность пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов

В естественных условиях на пищеварительные процессы, кроме температуры, значительное влияние оказывает концентрация водородных ионов (Уголев, Кузьмина, 1993; Немова и др., 1998; Неваленный и др., 2003; Deguara et al., 2003). Ранее при исследовании ферментативной активности у рыб Волжского бассейна было отмечено, что рН оптимум мальтазы приходится на рН 7,0-8,0 (Кузьмина, Неваленный, 1983). У исследованных нами осетрообразных видов рыб оптимум мальтазы также отмечен в интервале рН 7,0-8,0. Кроме того, наблюдается значительное снижение ферментативной активности на 50-70% при сдвиге рН ниже 5,0, или повышении до рН 10,0. Ранее при исследовании лососевых видов рыб, выловленных из морской среды, было установлено, что мальтаза слизистой оболочки кишечника у них более устойчива к воздействию водородных ионов - при аналогичных сдвигах рН активность мальтазы снижается на 10-30% (Коростелев, 2006).

Максимальная активность α -амилазы слизистой оболочки кишечника у представителей отряда осетрообразные отмечена в диапазоне рН 7,0-8,0 (рис. 11). У рыб, выловленных в морской среде, оптимальные значения рН для данного фермента находятся в диапазоне 8,0-9,0 (Коростелев, 2006), а для пресноводных костистых рыб - в диапазоне 6,5-7,5 (Уголев, Кузьмина, 1993). Таким образом, сопоставляя полученные данные с имеющимися в литературе, отметим, что оптимум рН α -амилазы у осетрообразных видов рыб занимает промежуточное положение между морскими и пресноводными рыбами. Снижение рН инкубационной среды до 5,0 вызывает уменьшение относительной активности данного фермента на 30-60%. У морских видов это снижение составляет 20-60% (Коростелев, 2006), у пресноводных костистых рыб - 15-80% от максимального уровня (Кузьмина, Неваленный и др., 1983). Аналогичная картина наблюдается и при увеличении рН среды до 10,0.

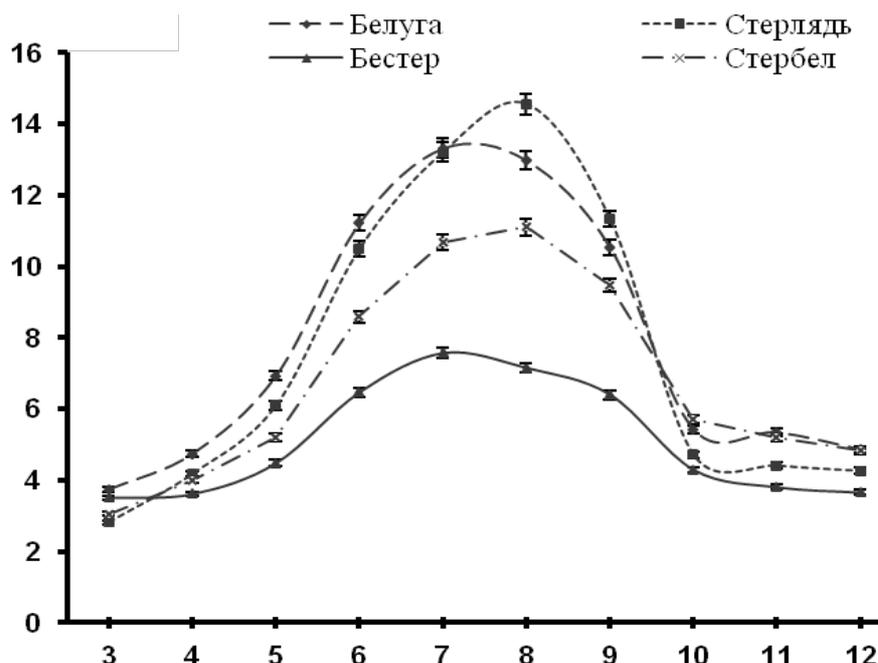


Рис. 11. Зависимость активности мальтазы кишечника белуги, стерляди, бестера и стербела от концентрации водородных ионов. По оси абсцисс – концентрация водородных ионов (рН); по оси ординат – активность фермента (мкмоль/г×мин)

Для щелочной фосфатазы оптимальный рН у исследованных рыб показан в интервале 7,0-8,0, однако для данного фермента отмечена высокая устойчивость к изменениям рН инкубационной среды (рис. 12). Так, фермент сохраняет более 50% своей активности в диапазоне рН от 3,0 до 11,0. Ранее такая же высокая устойчивость фермента к изменению рН была отмечена и для лососевых видов рыб (Коростелев, 2006).

При исследовании влияния концентрации водородных ионов на казеинлитические протеиназы у пресноводных костистых рыб было установлено, что оптимальным значением рН для большинства видов является диапазон от 7,5 до 10,0 (Хаблюк, Проскураков, 1983; Уголев, Кузьмина, 1993). Оптимум рН казеинлитических протеиназ у тихоокеанских лососей выявлен при рН 11,0 (Коростелев, 2006). В наших исследованиях установлено, что максимальная активность данного фермента в кишечнике большинства представителей осетрообразных видов рыб находится в диапазоне 9,0-11,0.

Таким образом, пищеварительные ферменты осетрообразных видов рыб имеют широкую зону оптимальных значений рН. Сравнение полученных результатов с данными, полученными при исследовании пресноводных костистых рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005) и тихоокеанских лососей, обитающих в соленой воле (Коростелев, 2006), показало, что пищеварительные ферменты представителей отряда осетрообразных обладают рН характеристиками как морских, так и пресноводных видов рыб. Это, по всей вероятности, позволяет

данной группе ихтиофауны активно осваивать как морскую, так и пресную среду обитания.

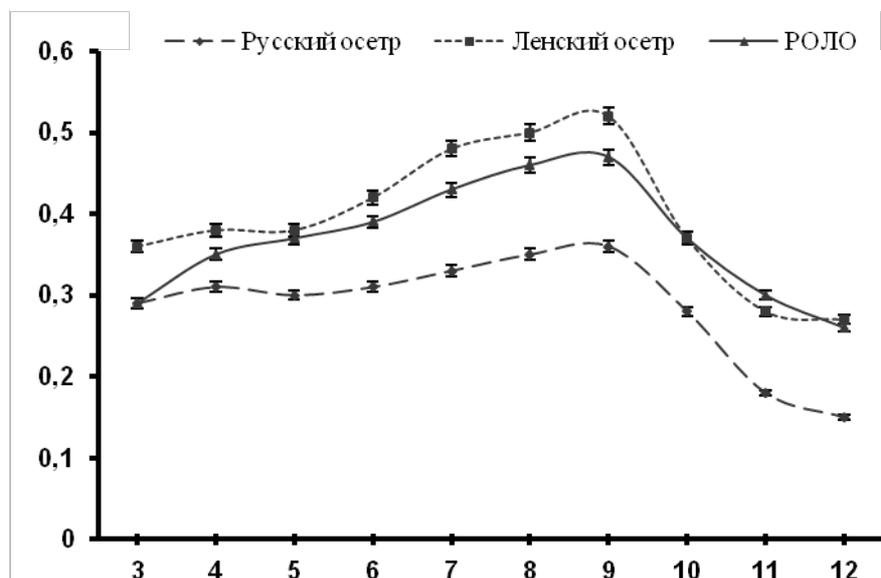


Рис. 12. Зависимость активности щелочной фосфатазы кишечника русского осетра, ленского осетра и РОЛО от концентрации водородных ионов. По оси абсцисс – концентрация водородных ионов (pH); по оси ординат – активность фермента (мкмоль/г×мин)

При сравнении влияния концентрации водородных ионов на уровень активности одноименных ферментов у родительских видов и их гибридов можно предположить, как и в случае с температурой, что гибридные особи могут наследовать pH характеристики одноименных ферментов как одного родителя, так и обоих сразу. Так, оптимальное значение pH для щелочной фосфатазы у белуги и стербела находится в диапазоне 7,0-9,0, а у стерляди и бестера при pH 9,0. Таким образом, данный признак передается только по отцовской линии. Подобная картина наблюдается для мальтазы русского и ленского осетра и их гибрида – РОЛО.

Проведение неметрического многомерного шкалирования показало, что во всем диапазоне исследуемых значений pH очевидно большее сходство ферментов РОЛО и русского осетра. Однако, как и в случае с температурой, оно может существенно изменяться у разноименных ферментов при разных pH инкубационного раствора. Например, в случае с мальтазой при pH ниже 7 и в диапазоне 11-12 фермент РОЛО проявляет большее сходство с ферментом русского осетра, при pH 7-9 мальтаза слизистой оболочки кишечника РОЛО демонстрирует одинаковое сродство к одноименным ферментам обоих родительских видов.

Анализ результатов влияния pH инкубационного раствора на уровень активности ферментов слизистой оболочки кишечника белуги, стерляди и их гибрида – бестера выявил, что ответная реакция всего комплекса ферментов

образует ряд «моновидных» групп, в силу чего нельзя с уверенностью сделать вывод о сходстве ферментных систем гибридной формы с каким-либо из родительских видов. Однако, как и в предыдущем случае, различные ферменты при разных значениях рН могут менять свое сродство к одному из родительских видов.

По результатам анализа множества данных влияния рН инкубационного раствора на уровень активности ферментов слизистой оболочки кишечника стерляди, белуги и их гибрида – стербела можно заключить, что ферменты стербела в кислой и слабокислой средах не проявляют выраженного сходства с ферментами родительских видов, тогда как в нейтральной и щелочной средах наблюдается выраженное в соответствующих рангах расстояний значительное сходство с ферментами белуги.

Таким образом, полученные данные, как и в случае с температурой, демонстрируют, что гибридные формы наследуют характеристики ферментов обоих родительских видов и могут проявляться при разных значениях рН.

5. Влияние ионов металлов на уровень активности пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов

При исследовании влияния факторов среды на активность ферментов, функционирующих в полости и на структурах слизистой оболочки кишечника, как правило, изучались действия таких экологических факторов среды как температура и рН (Уголев, Кузьмина, 1993). Однако данный подход не учитывал, что ферменты, обеспечивающие процессы пищеварения, могут функционировать в разных экологических условиях. До последнего времени не уделялось достаточного внимания и действию антропогенных факторов, что в настоящее время становится особенным актуально в связи с химическим загрязнением гидросферы. Тяжелые металлы входят в группу самых опасных загрязнителей водной среды. Их опасность для организмов и биоценозов в целом заключается в том, что многие из них обладают биологической активностью. Известно, что тяжёлые металлы аккумулируются в разных тканях и органах гидробионтов и крайне медленно выводятся из организма (Воробьев, 1993).

Установлено, что активность пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб и их гибридных форм зависит как от того, какой металл находится в инкубационной среде, так и от видовой принадлежности рыб. Ионы Mn^{2+} повышают активность щелочной фосфатазы на 15-78% в зависимости от вида рыб (табл. 2). Эти же ионы не вызывают статистически значимых изменений активности казеинлитических протеиназ у русского и ленского осетров, у белуги повышают её на 10%, у севрюги, напротив, приводят к достоверному ингибированию казеинлитических протеиназ.

Действие ионов металлов на активность пищеварительных ферментов гибридных форм, как правило, не отличалось от действия на ферменты родительских форм. Так, Ni^{2+} и Cu^{2+} повышают активность мальтазы на 6 - 9 % у русского, ленского осетров и их гибрида РОЛО. Однако в ряде случаев есть

отклонения. Так, присутствие Ni^{2+} в инкубационной среде повышает активность мальтазы на 14% у белуги и её гибридов бестера и стербела, у стерляди достоверных изменений не отмечено (табл. 3).

Таблица 2

Активность щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб и гибридных форм (мкмоль/гхмин) в присутствии ионов металлов в концентрации 10 мг/л.

Вид	Контроль	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}
Русский осетр	0,61±0,01	0,88±0,01*	0,91±0,01*	0,72±0,01*	0,54±0,01*	0,47±0,01*	0,55±0,01*
Ленский осетр	0,61±0,01	0,97±0,01*	0,85±0,01*	0,70±0,01*	0,55±0,01*	0,52±0,01*	0,56±0,01*
РОЛО	0,56±0,01	0,74±0,01*	0,81±0,01*	0,63±0,01*	0,47±0,01*	0,45±0,01*	0,50±0,01*
Белуга	0,80±0,01	0,92±0,01*	1,02±0,01*	0,94±0,01*	0,71±0,01*	0,64±0,01*	0,76±0,01*
Стерлядь	0,53±0,01	0,83±0,01*	0,85±0,01*	0,59±0,01*	0,48±0,01*	0,42±0,01*	0,48±0,01*
Бестер	0,78±0,01	1,08±0,01*	0,96±0,01*	0,89±0,01*	0,65±0,01*	0,63±0,01*	0,69±0,01*
Стербел	0,51±0,01	0,79±0,01*	0,79±0,01*	0,62±0,01*	0,45±0,01*	0,42±0,01*	0,44±0,01*
Севрюга	0,45±0,01	0,80±0,01*	0,71±0,01*	0,58±0,01*	0,41±0,01*	0,33±0,01*	0,40±0,01*
Веслонос	0,59±0,01	0,66±0,01*	0,83±0,01*	0,75±0,01*	0,54±0,01*	0,49±0,01*	0,58±0,01

Примечание: * здесь и в таблицах 3-7 – статистически значимые различия по сравнению с контролем, $p < 0.05$.

Таблица 3

Активность мальтазы слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб и гибридных форм (мкмоль/гхмин) в присутствии ионов металлов в концентрации 10 мг/л.

Вид	Контроль	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}
Русский осетр	17,05±0,11	17,99±0,11*	17,54±0,08*	17,58±0,08*	18,40±0,11*	18,14±0,11*	17,42±0,08*
Ленский осетр	16,67±0,08	17,65±0,11*	16,79±0,08	16,71±0,08	18,10±0,11*	17,91±0,08	17,24±0,04*
РОЛО	21,18±0,04	21,95±0,15*	20,96±0,08*	20,97±0,11*	23,18±0,15*	22,51±0,15*	22,13±0,08*
Белуга	11,06±0,08	11,74±0,23*	11,05±0,08	11,48±0,08*	12,57±0,08*	12,80±0,11*	12,31±0,08*
Стерлядь	13,29±0,08	14,60±0,11*	12,61±0,08*	12,42±0,08*	13,26±0,11	13,86±0,08*	13,97±0,08*
Бестер	16,79±0,08	17,69±0,04*	17,73±0,04*	18,29±0,08*	19,00±0,08*	18,28±0,08*	18,25±0,08*
Стербел	5,72±0,04	6,81±0,08*	6,10±0,08*	6,34±0,04*	6,47±0,04*	6,50±0,11*	6,14±0,04*
Севрюга	14,00±0,19	14,94±0,08*	14,30±0,04*	14,49±0,11*	15,24±0,04*	14,90±0,11*	14,83±0,04*
Веслонос	4,67±0,04	5,69±0,04*	4,41±0,04*	4,29±0,08*	4,78±0,08*	4,59±0,04	4,29±0,04*

Ранее было высказано предположение, что в молекуле фермента может существовать несколько регуляторных центров, специализированных для различных групп эффекторов (Уголев и др., 1983; Уголев, 1985). Быстрые конформационные переходы одной формы молекулы фермента в другую, по мнению ряда исследователей, возможны в результате присоединения к их активным центрам различных модификаторов, как органической, так и неорганической природы (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2001; Неваленный и др., 2003).

Еще один возможный механизм взаимодействия ионов металлов с ферментативными молекулами может заключаться в связывании иона металла с регуляторным или аллостерическим центром, причем данный центр должен быть пространственно отделенным от активного центра фермента (Monod et al., 1963, 1965; Уголев, 1974, 1985) с замещением металлокомпонента на другой металл, близкий по атомному строению. Было показано, что ионы некоторых металлов (кобальт, цинк, марганец) способны заменять ионы других металлов в целом ряде энзиматических систем (Калоус, Павличек, 1985; Плакунов, 2001; Неваленный и др., 2005).

По нашему мнению, первый способ взаимодействия ионов металлов с молекулой фермента лежит в основе изменения уровня активности таких ферментов, как α -амилаза, мальтаза и казеинлитические протеиназы. Второй тип взаимодействия характерен для щелочной фосфатазы. В то же время нельзя исключить и того, что в ряде случаев возможен эффект положительной корпоративности.

В середине прошлого века А.В. Войнаром (1960) была отмечена зависимость ответной реакции молекулы фермента на присутствие ионов металлов в зависимости от их положения в периодической таблице химических элементов. Так, было показано, что в ряду металлов, находящихся в IV периоде вспомогательных групп, наибольшее влияние оказывают металлы, находящиеся в начале ряда, а минимальное - в конце.

При исследовании влияния ионов различных металлов на активность щелочной фосфатазы была продемонстрирована четкая зависимость ответной реакции фермента слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб от положения металла в периодической таблице химических элементов. В частности, было показано, что в ряду металлов Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} наибольшее влияние оказывают металлы, расположенные в начале и конце ряда. Причем, металлы, находящиеся в начале периода, оказывают только активирующее действие на активность щелочной фосфатазы, а в конце – угнетающее. Для казеинлитических протеиназ и мальтазы эта зависимость прослеживается не так отчетливо.

Следует также отметить, что установленная закономерность в ответной реакции щелочной фосфатазы характерна как для родительских форм, так и их гибридов. Ранее нами (Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004) были получены аналогичные данные при исследовании половозрелых рыб, питавшихся в естественных условиях и относящихся к сем. Acipenseridae, Esocidae, Cyprinidae, Percidae. Очевидно, что данная закономерность не зависит от систематического положения, стадии развития, образа жизни и экологии вида.

В настоящее время накоплено большое количество данных о влиянии температуры (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003; Коростелев, 2006; Golovanova et al., 2013) и ионов металлов (Туктаров, 2002; Бедняков, 2004; Кузьмина, 2005; Голованова, 2008) на активность пищеварительных ферментов у рыб разных систематических и экологических групп как в условиях *in vitro*, так и

in vivo. Работы, касающиеся совместного влияния этих двух факторов, стали появляться относительно недавно (Кузьмина и др., 1999; Кузьмина, 2005, 2008). В наших экспериментах было установлено, что температура может изменять силу действия металлов на активность щелочной фосфатазы. Так, при низких температурах (0°C) выявлен более выраженный активирующий эффект Mn^{2+} , Fe^{2+} и Co^{2+} , эффекты Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} с увеличением температуры инкубации значительно не изменяются. Увеличение температуры инкубации может нивелировать совместный эффект Ni^{2+} и Zn^{2+} на этот фермент (рис. 13). Так, при температуре инкубации 0 и 25°C Ni^{2+} снижает активность щелочной фосфатазы у белуги в среднем на 8%, при увеличении температуры инкубации до 40°C – не вызывает достоверных изменений (рис. 13А). Zn^{2+} при температуре инкубации 0°C вызывает увеличение активности щелочной фосфатазы на 8% у русского осетра (рис. 13Б), увеличение температуры инкубации до 25 и 40°C не вызывает достоверных изменений. Эти зависимости характерны как для чистых видов, так и для их гибридных форм (рис. 13В).

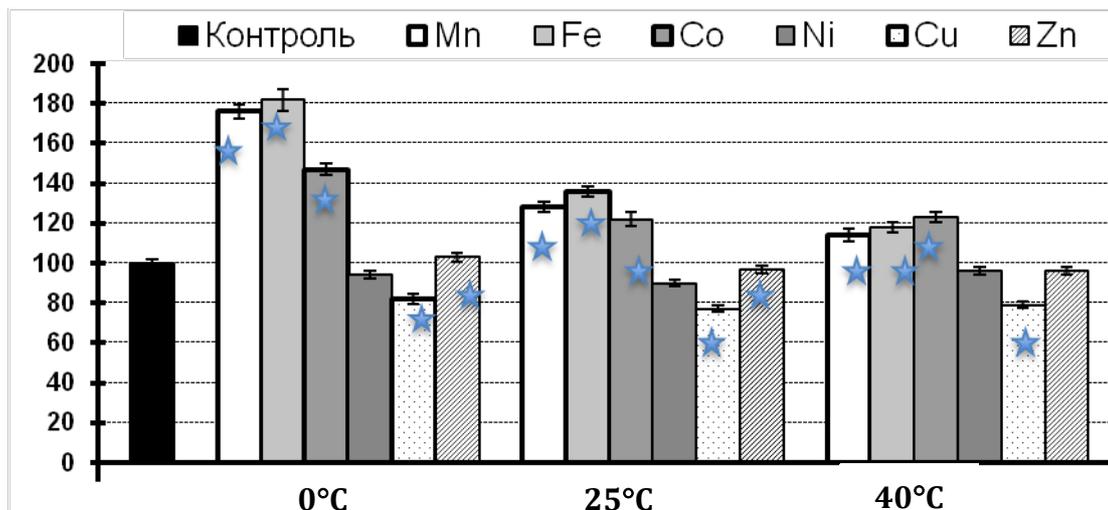
6. Влияние углеводов и аминокислот на уровень активности пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб и их гибридов

К настоящему времени установлено, что практически все изученные собственно кишечные ферменты у животных различных систематических групп являются регулируемые (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004). При этом установлено, что данные вещества могут быть субстратом или продуктом соответствующей ферментативной реакции или не являться таковыми (Уголев, 1972; Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004). У рыб регуляторные свойства пищеварительных ферментов изучены в меньшей степени, чем у высших позвоночных животных. Об этом свидетельствуют исследования последних лет (Неваленный, Коростелев, 2002; Неваленный и др., 2011).

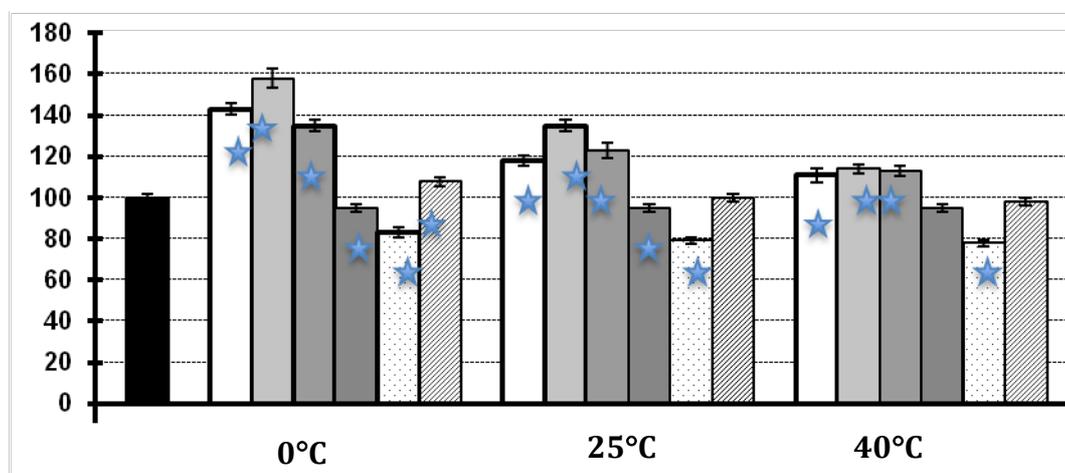
В экспериментах, проведенных на осетрообразных видах рыб и их гибридных формах, обнаружены эффекты взаимодействия ферментов с различными модификаторами (углеводы и аминокислоты). В частности было показано, что продукты гидролиза мальтозы подавляют активность мальтазы слизистой оболочки кишечника на 30-90% как у чистых видов, так и у их гибридных форм (табл. 4).

Аминокислоты (за исключением L-аспарагина) либо увеличивают активность мальтазы, либо не вызывают достоверных изменений (табл. 5). Обращает на себя внимание тот факт, что характер ответной реакции мальтазы на присутствие в инкубационной среде модификатора наследуется, как правило, по отцовской линии. Так, L-глутамин и DL-β-фенил-α-аланин повышают активность мальтазы на 20% у русского осетра, в меньшей степени (около 10%) - у ленского осетра и их гибрида РОЛО. Такая же закономерность отмечена и для гибридов белуги и стерляди – бестера и стербела.

А



Б



В

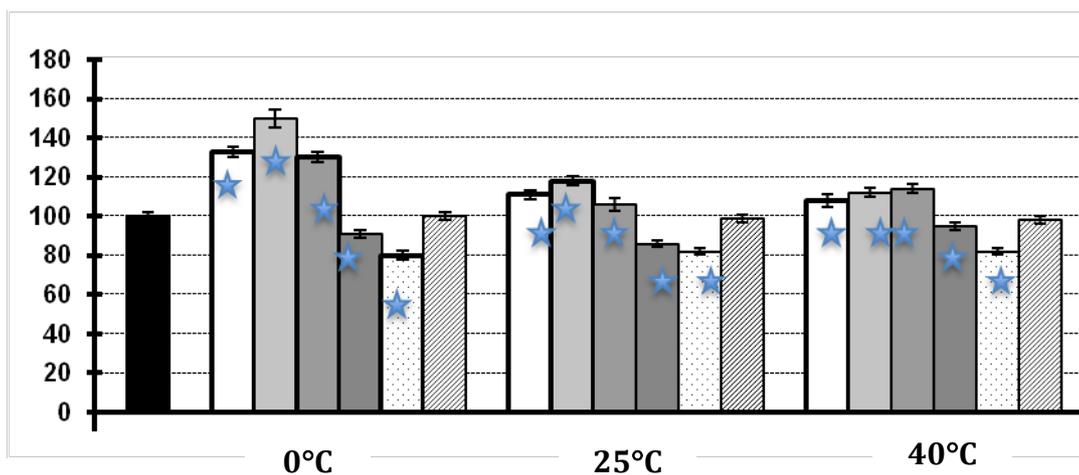


Рис. 13. Совместное влияние ионов металлов в концентрации 10 мг/л и температуры на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника белуги (А), русского осетра (Б) и бестера (В).

Обозначения: по вертикали – уровень активности фермента в процентах от контроля принятого за 100%.

★ – статистически значимые различия по сравнению с контролем, $p < 0.05$.

Таблица 4

Влияние углеводов на активность мальтазы слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб и гибридных форм (мкмоль/гхмин).

Вид	Контроль	Глюкоза	Фруктоза	Глюкоза + фруктоза	Сахароза
Русский осетр	7,03±0,30	2,05±0,17*	7,73±0,27*	4,98±0,13*	7,89±0,17*
Ленский осетр	8,27±0,22	1,96±0,12*	8,82±0,20*	4,05±0,19*	9,12±0,19*
РОЛО	12,08±0,21	3,85±0,24*	13,88±0,24*	5,65±0,17*	14,45±0,13*
Белуга	10,47±0,17	0,97±0,07*	11,04±0,07*	0,83±0,13*	11,67±0,13*
Стерлядь	11,68±0,13	4,59±0,20*	12,34±0,01*	8,23±0,10*	12,17±0,07*
Бестер	18,35±0,12	3,06±0,15*	18,85±0,12*	14,18±0,09*	18,97±0,18*
Стербел	4,29±0,03	0,98±0,03*	4,49±0,03*	2,03±0,05*	4,52±0,07*
Севрюга	10,61±0,07	2,21±0,07*	11,72±0,17*	7,12±0,17*	11,00±0,10*
Веслонос	4,22±0,07	0,94±0,17*	4,82±0,10*	1,54±0,10*	4,35±0,07

Таблица 5

Влияние аминокислот на активности мальтазы слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб и гибридных форм (мкмоль/гхмин).

Вид	Контроль	Глицин	L-Аспарагин	L-Лейцин	L-Глутамин	DL-β-фенил-α-аланин
Русский осетр	7,03±0,30	6,82±0,30*	4,54±0,20*	7,99±0,23*	8,60±0,30*	8,39±0,17*
Ленский осетр	8,27±0,22	8,40±0,19	7,51±0,18*	8,95±0,30*	9,34±0,17*	9,19±0,23*
РОЛО	12,08±0,21	11,84±0,13*	11,44±0,07*	12,74±0,17*	12,91±0,17*	12,94±0,10*
Белуга	10,47±0,17	10,81±0,27	4,09±0,07*	12,17±0,10*	12,28±0,13*	12,34±0,14*
Стерлядь	11,68±0,13	11,87±0,13	10,73±0,10*	12,17±0,03*	12,04±0,07*	12,57±0,10*
Бестер	18,35±0,12	17,99±0,31	17,56±0,18*	19,01±0,09*	18,87±0,18*	19,24±0,09*
Стербел	4,29±0,03	4,39±0,07	3,55±0,07*	4,79±0,07*	4,55±0,03*	5,22±0,07*
Севрюга	10,61±0,07	10,47±0,17	9,44±0,07*	10,91±0,07*	10,87±0,07*	11,07±0,07*
Веслонос	4,22±0,07	4,45±0,07*	4,25±0,07	4,22±0,07	4,15±0,07	4,53±0,07*

При исследовании действия модификаторов на казеинлитические протеиназы установлено, что продукты гидролиза белков (аминокислоты) достоверно снижают их активность (табл. 6). В зависимости от вида рыб ингибирование может составлять от 8% (у бестера в присутствии глицина) до 52% (у РОЛО в присутствии L-лейцина). L-лейцин, L-глутамин и DL-β-фенил-α-аланин обладают большим ингибирующим эффектом по сравнению с глицином и L-аспарагином. Присутствие в инкубационной среде продуктов гидролиза углеводов также приводит к уменьшению скорости гидролиза казеина. Например, максимальное снижение до 44% наблюдается у РОЛО в присутствии сахарозы и мальтазы.

Таблица 6

**Влияние аминокислот на ровень активности казеинлитических протеиназ
слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб и гибридных
форм (мкмоль/гхмин).**

Вид	Контроль	Глицин	L-Аспарагин	L-Лейцин	L-Глутамин	DL-β-фенил- α-аланин
Русский осетр	2,71±0,04	2,37±0,06*	2,38±0,06*	2,07±0,02*	1,86±0,04*	1,74±0,04*
Ленский осетр	2,83±0,08	1,98±0,04*	1,97±0,03*	2,03±0,04*	2,00±0,03*	1,93±0,03*
РОЛО	2,72±0,07	2,31±0,09*	2,31±0,09*	1,30±0,04*	1,15±0,04*	1,15±0,04*
Белуга	1,49±0,04	1,22±0,06*	1,24±0,02*	1,22±0,06*	1,20±0,04*	1,28±0,04*
Стерлядь	3,46±0,04	2,99±0,07*	2,99±0,04*	2,89±0,09*	2,76±0,09*	2,89±0,04*
Бестер	3,85±0,04	3,53±0,07*	3,10±0,04*	2,89±0,02*	3,14±0,04*	2,73±0,04*
Стербел	5,79±0,13	4,14±0,11*	4,15±0,13*	3,61±0,11*	3,72±0,06*	3,53±0,06*
Севрюга	2,58±0,04	2,35±0,06*	2,31±0,06*	2,05±0,04*	2,12±0,02*	2,07±0,04*
Веслонос	0,94±0,02	0,77±0,04*	0,84±0,02*	0,66±0,02*	0,66±0,07*	0,64±0,04*

Ранее нами было установлено, что конечные продукты гидролиза биополимера – полисахарида крахмала изменяли скорость его гидролиза под действием адсорбированной α-амилазы. Было показано, что эффект модификатора зависит не только от его природы, но и от видовой принадлежности исследованных рыб (Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004). Аналогичные результаты были получены ранее в экспериментах на крысах (De Laye, 1966; Eggermont, 1968). Исследования влияния модификаторов на уровень активности α-амилазы слизистой оболочки кишечника осетрообразных видов рыб также продемонстрировало, что ответная реакция фермента на присутствие модификатора зависит как от природы самого модификатора, так и от систематического положения рыб. Так, у представителей сем. Acipenseridae наличие в инкубационной среде сахарозы, глицина, а также смеси глюкозы и фруктозы приводит к увеличению скорости гидролиза крахмала, в то время как у представителей сем. Polyodontidae данные модификаторы не вызывают достоверных изменений в уровне активности α-амилазы (табл. 7). Обращает на себя внимание и тот факт, что ни глюкоза, ни фруктоза, присутствуя в инкубационной среде по отдельности, не приводят к изменениям в скорости гидролиза крахмала. Лишь их совместное присутствие приводит к активирующему эффекту, что позволяет предположить присутствие неких эмерджентных свойств.

Исследование действия модификаторов белковой и углеводной природы на активность щелочной фосфатазы показало, что ни у одного из исследованных видов или гибридов не происходит достоверных изменений в уровне активности фермента. Этот факт объясняется тем, что данный фермент является металлозависимы и его регуляция осуществляется посредством действия ионов металлов, что и было описано ранее.

Таблица 7

**Влияние углеводов на активности α -амилазы слизистой оболочки
кишечника осетрообразных видов рыб и гибридных форм (мг/г \times мин).**

Вид	Контроль	Глюкоза	Фруктоза	Глюкоза + фруктоза	Мальтоза	Сахароза
Русский осетр	13,17 \pm 0,17	13,58 \pm 0,14*	13,48 \pm 0,26	15,17 \pm 0,18*	14,21 \pm 0,26*	13,78 \pm 0,44
Ленский осетр	10,41 \pm 0,27	10,24 \pm 0,35	9,95 \pm 0,35*	11,76 \pm 0,35*	12,00 \pm 0,44*	10,70 \pm 0,35
РОЛО	12,71 \pm 0,32	13,42 \pm 0,44*	13,16 \pm 0,24	13,50 \pm 0,08*	14,13 \pm 0,24*	13,17 \pm 0,24
Белуга	9,72 \pm 0,10	9,83 \pm 0,40	10,03 \pm 0,30	10,50 \pm 0,20*	10,80 \pm 0,40*	9,80 \pm 0,40
Стерлядь	13,31 \pm 0,32	14,07 \pm 0,40*	13,81 \pm 0,24	14,71 \pm 0,08*	14,63 \pm 0,24*	13,83 \pm 0,24
Бестер	16,53 \pm 0,16	16,89 \pm 0,16*	16,28 \pm 0,16	17,94 \pm 0,16*	17,94 \pm 0,17*	16,62 \pm 0,16
Стербел	9,35 \pm 0,44	9,97 \pm 0,27	10,05 \pm 0,18*	10,80 \pm 0,35*	11,03 \pm 0,27*	10,06 \pm 0,35
Севрюга	11,39 \pm 0,10	11,65 \pm 0,19	11,77 \pm 0,24*	13,91 \pm 0,08*	12,72 \pm 0,29*	11,81 \pm 0,29*
Веслонос	9,22 \pm 0,35	9,21 \pm 0,44	9,30 \pm 0,35	9,13 \pm 0,18	8,87 \pm 0,35*	8,52 \pm 0,26*

Ответная реакция фермента на присутствие в инкубационной среде модификатора зависит от систематического положения исследуемых видов рыб (табл. 5). В частности ответная реакция фермента у рыб семейства *Acipenseridae* отличается от таковой представителя семейства *Polyodontidae*. Такие модификаторы как L-аспарагин, L-лейцин и L-глутамин не вызывали достоверных изменений в уровне активности мальтазы у веслоноса, в то время как у представителей семейства осетровых они приводили к достоверным изменениям. Присутствие данных модификаторов приводит к достоверным изменениям в уровне активности α -амилазы у веслоноса и не вызывает достоверных изменений у представителей семейства *Acipenseridae*. Эти факты свидетельствуют о том, что регуляторные центры ферментов у рыб семейства *Acipenseridae* имеют существенные отличия от таковых семейства *Polyodontidae*. Кроме того, ранее подобная закономерность была описана нами для рыб семейства *Cyprinidae* (Бедняков, 2004). Это может быть связано с тем, что в ходе эволюции каталитические центры ферментов претерпевают меньше изменений в отличие от регуляторных центров.

Для объяснения полученных результатов необходимо обратиться к теории регуляции ферментативной активности. Так, в соответствии с современными представлениями, регуляция ферментативной активности возможна с помощью одного из трех механизмов: 1) гомостерического, 2) изостерического, 3) аллостерического (Диксон, Уэбб, 1982; Уголев, 1985; Плакунов, 2001).

Под изостерическим взаимодействием понимается изменение свойств молекулы фермента, которое возникает в ходе присоединения вещества модификатора непосредственно к активному центру энзима, как правило, из-за структурного сходства с субстратом. Под аллостерическим взаимодействием, напротив, понимается регулирование, которое, как правило, осуществляется веществом, не схожим по структуре с участниками ферментативного процесса. Под гомостерическим взаимодействием понимается ингибирование стереоизомерами (Уголев, 1972, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993).

В случае с достоверным ингибированием мальтазной активности в присутствии глюкозы, а также казеинлитической протеиназы в присутствии аминокислот у всех исследованных видов рыб и их гибридных форм скорее всего наблюдается изостерический эффект, так как продукты реакции являются структурными аналогами субстратов, вследствие чего, может происходить их присоединение к активному центру фермента, что в свою очередь, приводит к ингибированию конкурентного типа (Уголев, 1972). Данное явление было впервые описано Новиком и Сцилардом (Novic, Szilard, 1954), а также Умбаргером (1954) и названо ретроингибированием. Эти исследователи установили, что в цепочке ферментативных реакций конечный продукт может являться ингибитором фермента, катализирующего начальный этап процесса, вследствие чего может возникать отрицательная обратная связь, за счет которой поддерживается постоянство скоростей реакции, которые обеспечиваются данной ферментативной цепочкой.

Обращает на себя внимание тот факт, что наличие в инкубационной среде аминокислот в большинстве случаев приводит к статистически достоверному увеличению активности мальтазы в слизистой оболочке кишечника рыб. Максимальное положительное действие субстратов-регуляторов отмечено у хищных видов рыб (белуги и русского осетра), что можно объяснить явлением индуцированного соответствия (Koshland, 1964; Кошланд, 1967). Так, активность мальтазы у русского осетра увеличилась на 14, 22 и 19% в присутствии L-лейцина, L-глутамина, DL- β -фенил- α -аланина соответственно, у белуги эти же модификаторы вызвали увеличение активности фермента в среднем на 17%. У других видов это увеличение не превышало 13% (табл. 5). Ранее аналогичные результаты были получены нами при исследовании рыб разных экологических и систематических групп, питавшихся в естественных условиях (Бедняков, 2004), что позволяет сделать вывод о том, что данное свойство фермента не зависит от диеты рыб.

Кроме того, данные, полученные при исследовании влияния модификаторов на уровень активности α -амилазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ, демонстрируют схожую реакцию ферментов на присутствие субстрата-регулятора у рыб в пределах одного семейства. Это, в свою очередь, может быть связано с тем, что ферменты у рыб в пределах семейства могут иметь близкую структуру регуляторных центров. Кроме того, показано, что одни и те же модификаторы у рыб семейства Acipenseridae и Polyodontidae могут вызывать противоположный эффект. Ранее нами аналогичная закономерность была продемонстрирована при сравнении рыб семейства Acipenseridae и Cyprinidae (Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004). Это дает возможность сделать предположение о том, что у рыб разных систематических групп структура регуляторных центров одноименных ферментов существенно различается.

7. Взаимодействие пищевых веществ в процессе пищеварения в слизистой оболочке кишечника осетрообразных видов рыб и их гибридов

Тонкая приспособляемость пищеварительной системы к типу и качеству пищи является одной из важнейших биологических закономерностей, обнаруженной еще на рубеже XIX-XX вв. в классических работах И.П. Павлова (1951). В дальнейшем данная закономерность получила свое подтверждение и развитие (Уголев, 1961, 1985; Corring, 1980; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Неваленный и др., 2003, Кузьмина, 2005).

В реальном пищеварительном процессе одновременно перевариваются углеводы, белки и жиры, причем эти компоненты могут оказывать существенное влияние друг на друга, что достаточно подробно описано для высших позвоночных животных (Уголев, 1972; Кушак, 1983). Отдельные аспекты проблемы по взаимодействию пищевых веществ исследованы и для процесса пищеварения у рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004). При этом, в исследованиях полисубстратных процессов, как правило, используют простую модель одновременного взаимодействия двух субстратов. Для того, чтобы максимально приблизиться к естественным условиям, мы исследовали не только бисубстратные, но и трисубстратные взаимодействия пищевых веществ. В результате сопоставления интенсивности гидролиза казеина, мальтозы и эфира фосфорной кислоты, как по отдельности, так и в присутствии одного или двух веществ, нами был выявлен эффект взаимодействия субстратов ферментативных процессов. Установлено, что при бисубстратных взаимодействиях одно и то же вещество может являться ингибитором для одного ферментативного процесса и активатором для другого. Например, п-нитрофенилфосфат Na у большинства исследованных видов вызывал снижение активности мальтазы на 5–10% и увеличение активности казеинлитических протеиназ на 10–30%. Крайне интересен и тот факт, что эффекты трисубстратных процессов не являются простой суммой бисубстратных эффектов. Более того, они всегда приводят к значительному усилению гидролиза всех исследованных пищевых субстратов. Так, одновременное присутствие всех трех субстратов приводило к увеличению активности мальтазы от 24% у белуги до 150% у стерляди, щелочной фосфатазы от 15% у веслоноса до 220% у стербела, казеинлитических протеиназ от 15% у стербела и веслоноса до 38% у севрюги. Как видно из представленных результатов, данные эффекты характерны как для чистых видов, так и для гибридных форм.

Предположение о том, что существует возможность взаимных влияний, при переваривании различных пищевых веществ было высказано еще И.П. Павловым (1951), однако подтвердить это предположение стало возможным только в конце 50-х годов 20 века после открытия А.М. Уголевым (1961, 1972) мембранного пищеварения, поскольку именно на этом этапе происходит процесс взаимодействия между разными компонентами пищи.

Пищеварение является типичным ферментативным процессом. Данные об изменении скорости гидролитических процессов при одновременном нахождении

в инкубационной среде нескольких субстратов демонстрируют изменения в уровне активности ферментов, или их регулирование посредством модификаторов. Таким образом, взаимодействие пищевых субстратов в процессе мембранного пищеварения есть ничто иное, как регуляция на уровне пищеварительной активности и, следовательно, она может быть описана с помощью имеющихся в настоящее время теорий. Так, согласно современным представлениям, регуляция ферментативной активности возможна на двух уровнях. Первый уровень, применительно к собственно кишечным ферментам, связан с процессом синтеза молекулы фермента и дальнейшей его транслокации в мембрану энтероцита. Второй уровень связан с изменением структуры уже имеющихся молекул белка (Хочачка, Сомеро, 1977, 1988; Уголев, 1985; Озернюк, Нечаев, 2002; Неваленный и др., 2003). В случае полисубстратных взаимодействий происходит регуляция ферментативной активности, которая не связана с синтезом ферментативного белка, так как на это необходимо определенное время. В эксперименте изменение активности происходит очень быстро, очевидно, за счет изменения ферментативной активности в результате связывания регуляторного центра фермента с субстратом-регулятором или модификатором.

Описанные нами процессы ди- и трисубстратных взаимодействий имеют важное значение для понимания механизмов реализации процессов пищеварения у рыб. За счет этих взаимодействий происходит тесное сопряжение работы различных ферментативных цепочек, благодаря чему достигается определенный автоматизм в работе пищеварительной системы и ее подстройка к качеству пищи. Из этого следует, что на уровне регуляции активности пищеварительных ферментов достигается определенная последовательность в обработке пищи, и, скорее всего, интеграция гидролитических и транспортных процессов.

При исследовании представителей отряда *Acipenseriformes*, а также их гибридов, выявлены некоторые закономерности полисубстратных взаимодействий, принципиально близких к ранее описанным для высших позвоночных животных (Уголев, 1972, 1985; Кушак, 1983), а также для рыб других систематических и экологических групп (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004). Установлено, что щелочная фосфатаза, α -амилаза, мальтаза и казеинлитические протеиназы, обеспечивающие процессы мембранного пищеварения у рыб, способны изменять активность под воздействием различных компонентов пищи, т.е. они являются регулируемы. Сопоставление в идентичных методических условиях взаимодействий фермента и модификатора показало, что у рыб разных видов результирующие эффекты могут существенно отличаться. У рыб и, вероятно, других пойкилотермных животных эффект взаимодействия модификатора и фермента может существенно варьироваться в силу большей гибкости макромолекул, фермент-мембранного комплекса по сравнению с гомойотермными животными (Егорова и др., 1974; Уголев, 1985; Неваленный, 1996; Неваленный и др., 2003; Коростелев, 2006).

Таким образом, в работе показано, что свойства пищеварительных ферментов у рыб отряда Acipenseriformes значительно адаптированы к условиям функционирования. Установлено, что пищеварительные ферменты обладают характеристиками как общими для всех исследованных ранее рыб, так и специфичными, характерными только для исследованных семейств. Установлено также, что на характеристики пищеварительных ферментов гибрида может оказывать влияние как материнский, так и отцовский вид. Характер влияния проявляется неодинаково для разных ферментов и может существенно изменяться при воздействии различных факторов.

ВЫВОДЫ

1. Эпителий среднего отдела кишечника имеет ультраструктурные характеристики, как общие для всех изученных осетровых видов рыб, так и видоспецифичные. В составе эпителиального пласта клеток русского осетра, ленского осетра и их гибрида РОЛО обнаружены клетки, несущие на апикальной поверхности не только микроворсинки, но и реснички, что считается примитивным признаком, унаследованным от древних предков. Впервые у осетровых видов рыб выявлены клетки, аналогичные М-клеткам млекопитающих, обеспечивающие первичный иммунный ответ. Особенности ультраструктурного строения кишечного эпителия родительских видов отмечаются и у гибридных особей.

2. Сопоставление рН-функций пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб выявило широкую зону оптимальных значений рН: для щелочной фосфатазы 7,0 - 9,0, для α -амилазы и мальтазы 7,0 - 8,0, для казеинлитических протеиназ 9,0 – 11,0. рН-функция данной группы рыб имеет характеристики, присущие как морским, так и пресноводным видам.

3. Показано, что температурные оптимумы пищеварительных ферментов осетрообразных видов рыб на 10° выше, чем у рыб, обитающих в сходных экологических условиях. Собственно кишечные ферменты осетрообразных сохраняют высокую относительную активность в широком диапазоне температур, что может свидетельствовать о продолжающейся адаптации к современным условиям среды обитания. Полученные данные подтверждают представление о том, что температурные оптимумы ферментов могут отражать условия существования и эволюции вида в далеком прошлом. При исследовании влияния температуры на уровень активности пищеварительных ферментов установлено преобладающее влияние материнского вида над отцовским на характер протекания гидролитических процессов.

4. Сравнительный анализа факториальных воздействий на пищеварительные ферменты родительских видов и их гибридных форм показал, что гибриды наследуют характеристики пищеварительных ферментов от обоих родителей, влияние родительских видов на ферментные системы гибрида может существенно изменяться при разных значениях температуры и рН инкубационной среды.

5. Выявлено, что присутствие ионов металлов (Mn, Fe, Co, Ni, Cu и Zn) в инкубационной среде приводит к достоверному ($p < 0,05$) изменению активности пищеварительных ферментов. Ответная реакция ферментов на действие ионов металлов зависит от его положения в периодической таблице химических элементов. Наибольшее влияние оказывают металлы, располагающиеся в начале и конце ряда: первые оказывают активирующее действие, а вторые - угнетающее. Описанная закономерность характерна как для родительских видов, так и для их гибридов и не зависит от систематического положения, стадии развития, образа жизни и экологии рыб.

6. Показана идентичная ответная реакция пищеварительных ферментов на присутствие в инкубационной среде углеводов и аминокислот в рамках семейства, что может свидетельствовать о близкой структуре регуляторных центров пищеварительных ферментов у представителей сем. Acipenseridae. Регуляторные центры у рыб сем. Acipenseridae имеют существенные отличия от таковых у рыб сем. Polyodontidae, что свидетельствует о том, что в ходе эволюции каталитические центры ферментов претерпевают меньшие изменения в отличие от регуляторных центров.

7. Закономерности взаимодействия продуктов гидролитических реакций с пищеварительными ферментами демонстрируют явление ретроингибирования у осетрообразных видов рыб и их гибридов. Активность мальтазы слизистой оболочки кишечника у осетрообразных видов рыб снижается на 60-80% в присутствии продуктов гидролиза мальтозы. Наличие в инкубационной среде свободных аминокислот приводит к снижению уровня активности казеинлитических протеиназ на 10-60%.

8. Установлены процессы взаимодействия в условиях *in vitro* субстратов ферментативных реакций для всех исследованных групп пищевых веществ. В случае трисубстратных взаимодействий у осетрообразных видов рыб и их гибридов отмечен только активирующий эффект. Ранее данная закономерность была описана для рыб различных систематических и экологических групп, что свидетельствует о фундаментальном характере данной закономерности.

9. Ферменты, обеспечивающие процессы мембранного пищеварения у осетрообразных видов рыб и их гибридов обладают как характеристиками, присущими всему классу Osteichthyes, так и специфическими характеристиками, присущими конкретному отряду. Установлено, что гибридные формы наследуют характеристики ферментных систем родительских видов.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

I. В рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Неваленный, А.Н. Модификационное регулирование уровня активности пищеварительных ферментов рыб / А.Н. Неваленный, Д.А. Бедняков // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2005. -№2 (12). - С. 83-85.

2. Неваленный, А.Н. Сопоставление уровня активности некоторых ферментов в слизистой оболочке кишечника рыб / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков** // Вестник Астраханского государственного технического университета. – 2005. -№4(27). - С. 32-34.

3. Неваленный, А.Н. Влияние углеводов и аминокислот на уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника представителей семейства *Acipenseriformes* / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, В.Ю. Новинский // Бюллетень Московского общества естествоиспытателей природы. Отдел биологический. - 2009. -Т.114. -Вып.3. -Часть 2. - С.102-105.

4. **Бедняков, Д.А.** Особенности морфологии кишечника рыб семейства *Acipenseriformes* / Д.А. Бедняков, Л.А. Неваленная, Н.Н. Федорова // Бюллетень Московского общества естествоиспытателей природы. Отдел биологический. - 2009. -Т.114. -Вып.3. -Часть 1. - С.69.

5. **Бедняков, Д.А.** Температурные адаптации ферментов слизистой оболочки некоторых представителей отряда *Acipenseriformes* / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский // Вестник Волгоградского государственного университета. -Серия 3. Экономика, Экология. - 2009. -№1. - С.244-247.

6. **Бедняков, Д.А.** Воздействие ионов металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника осетровых видов рыб и их гибридов / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный // Бюллетень Московского общества естествоиспытателей природы. Отдел биологический. - 2009. -Т.114. -Вып.3. -Часть 1. - С.70-72.

7. **Бедняков, Д.А.** Температурные адаптации ферментов слизистой оболочки кишечника русского и ленского осетров и их гибрида / Д.А. Бедняков // Юг России. Экология, развитие. - 2010. №4. - С.49-52.

8. **Бедняков, Д.А.** Совместное влияние температуры и ионов металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника белуги, стерляди и их гибрида / Д.А. Бедняков // Юг России. Экология, развитие. - 2010. - №4. - С.53-55.

9. **Бедняков Д.А.** Модификационное регулирование уровня активности пищеварительных ферментов осетровых видов рыб и их гибридов / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный // Юг России. Экология, развитие. - 2010. -№4. - С. 56-58.

10. Неваленный, А.Н. Исследование некоторых характеристик ферментов, обеспечивающих процесс мембранного пищеварения у веслоноса и русского осетра / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, В.Ю. Новинский // Юг России. Экология, развитие. - 2010. -№4. - С.66-70.

11. Неваленный, А.Н. Исследование некоторых характеристик ферментов, обеспечивающих процесс мембранного пищеварения у веслоноса *Polyodon Spathula* / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, В.Ю. Новинский // Вопр. ихтиологии. - 2010. -Т.50. -№3. - С.400-404.

12. Неваленный, А.Н. Влияние модификаторов на пищеварительные гидролазы у рыб различных систематических групп / А.Н. Неваленный, **Д.А.**

Бедняков, В.Ю. Новинский, С.Г. Коростелев // *Вопр. ихтиологии.* -2011. -Т.51. - №3. - С.1-6.

13. Корнева, Ж.В. Сравнительная характеристика ультраструктуры кишечного эпителия осетровых рыб / Ж.В. Корнева, **Д.А. Бедняков** // *Биология внутренних вод.* - 2011. -№4. - С.48-57.

14. **Бедняков, Д.А.** Влияние ионов металлов на ферменты мембранного пищеварения белуги, стерляди и их гибридов – бестера и стербела / Д.А. Бедняков, Л.А. Неваленная, В.Ю. Новинский // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2011. №2. - С. 74-77.

15. **Бедняков, Д.А.** Комплексное исследование особенностей процессов мембранного пищеварения у севрюги / Д.А. Бедняков, Л.А. Неваленная, В.Ю. Новинский // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2011. -№2. - С. 93-98.

16. **Бедняков, Д.А.** Сравнительная характеристика гистологического строения кишечного эпителия осетровых рыб и их гибридов / Д.А. Бедняков, Н.Н. Федорова, Л.А. Неваленная // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2012. - №1. - С.121-124.

17. Неваленный, А.Н. Совместное влияние температуры и ионов металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника у рыб сем. *Acipenseridae* / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, С.Г. Коростелев // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2012. -№2. - С. 131-135.

18. **Бедняков, Д.А.** Нейросетевое моделирование воздействия осмотического давления на уровень активности α -амилазы слизистой оболочки кишечника русского осетра / Д.А. Бедняков, А.С. Мартьянов, А.А. Неваленная // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2012. -№2. - С. 136-139.

19. **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. Мартьянов // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2013. -№1. - С. 118-123.

20. **Бедняков, Д.А.** Влияние температуры и рН на уровень активности пищеварительных ферментов ленского осетра (*Acipenser baerii*) / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2013. -№1. - С. 124-128.

21. **Бедняков, Д.А.** Сравнительный анализ воздействия рН среды на уровень активности пищеварительных ферментов русского осетра, ленского осетра и их гибрида с помощью неметрического многомерного шкалирования / Д.А. Бедняков, А.С. Мартьянов // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2013. -№2. - С. 145-149.

22. **Бедняков, Д.А.** Влияние температуры и рН на уровень активности пищеварительных ферментов русского осетра (*Acipenser guldenstadii* В.) / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный // *Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство.* - 2013. - №2. - С. 150-154.

II. Учебные пособия:

23. Неваленный, А.Н. Энзимология / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, И.С. Дзержинская: Учеб. пособие. Астрахан. гос. техн. ун-т. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2005. -85с.

III. Статьи и тезисы в других изданиях:

24. Неваленный, А.Н. Уровень активности липазы слизистой оболочки кишечника осетровых рыб / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков** // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем». - СПб., 2008. - С. 149.

25. Неваленный, А.Н. Исследование процессов мембранного пищеварения у рыб различных экологических групп / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, А.В. Туктаров // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем». – СПб., 2008. - С.150.

26. Неваленный, А.Н. Исследование уровня активности мальтазы слизистой оболочки кишечника осетровых видов и их гибридов / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, В.Ю. Новинский, В.А. Володин // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем». – СПб., 2008. - С.18.

27. **Бедняков, Д.А.** Влияние температуры и концентрации водородных ионов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса (*Polyodon spathula* Walbaum) / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский, В.А. Володин // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем». – СПб., 2008. - С.157.

28. **Бедняков, Д.А.** Влияние температуры на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника стерляди (*Acipenser Ruthenus* L.) / Д.А. Бедняков, В.А. Володин // *Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения К.В. Горбунова.* - Астрахань: ООО «КПЦ «ПолиграфКом», 2008. - С.38-39.

29. Неваленный, А.Н. Сопоставление уровней активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника белуги (*Huso huso* L.) и веслоноса (*Polyodon spathula* W.) / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, В.Ю. Новинский, В.А. Володин // - Сборник трудов международной конференции «Молекулярные механизмы адаптаций». - Махачкала, 2008. - С.53-55.

30. **Бедняков, Д.А.** Влияние температуры на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой кишечника веслоноса (*Polyodon spathula* W.) и белуги (*Huso huso* L.) / Д.А. Бедняков, В.Ю. Новинский, А.Н. Неваленный, В.А. Володин // *Сборник материалов международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоэкологии», 21-24 октября 2008.* – М., 2008. - С.63-64.

31. **Бедняков, Д.А.** Влияние ионов некоторых металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника гибрида стерляди и белуги (стербел) / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский, В.А. Володин // *Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения К.В. Горбунова.* - Астрахань: ООО «КПЦ «ПолиграфКом», 2008. - С.183-185.

32. **Бедняков, Д.А.** Влияние температуры и концентрации водородных ионов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника севрюги (*Acipenser stellatus*) и русского осетра (*Acipenser guldenstadti*) / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский, В.А. Володин // VI Международная научно-практическая конференция «Проблемы сохранения и рационального использования биоразнообразия Прикаспия и сопредельных регионов». - Элиста: КалмГУ, 2009. - С.116-117.

33. **Бедняков, Д.А.** Влияние ионов металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника осетрообразных рыб и их гибридов / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский // *Механизмы функционирования висцеральных систем: VII Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 160-летию со дня рождения И.П. Павлова. Тезисы докладов.* -СПб.: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2009. - С.50-51.

34. **Бедняков, Д.А.** Морфологические особенности кишечника осетровых видов рыб и их гибридов / Д.А. Бедняков, Л.А. Неваленная, Н.Н. Федорова // *Механизмы функционирования висцеральных систем: VII Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 160-летию со дня рождения И.П. Павлова. Тезисы докладов.* - СПб.: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2009. - С.51.

35. **Bednyakov, D.A.** Influence of carbohydrates and amino acids on the activity level of in vitro digestive enzyme activities of in the mucous membrane of intestines of beluga, starred sturgeon and their hybrids in the conditions in vitro / D.A. Bednyakov // 6th International symposium on sturgeon. "Harmonizing the relationships between human activities and nature: the case of sturgeons", book of abstracts, - Wuhan, 2009. - P.161-163.

36. Неваленный, А.Н. Влияние концентрации водородных ионов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов белуги, стерляди и их гибрида (бестера) / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, В.Ю. Новинский // *Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана: Матер. Междунар. науч.-техн. конф.: в 2-х ч. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2010. - Ч.1. - С.25-28.*

37. Неваленный, А.Н. Влияние ионов металлов на уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и их гибрида / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, В.Ю. Новинский // *Материалы VII Международной научно-практической конференции «Татищевские чтения:*

актуальные проблемы науки и практики». Актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды. – Тольятти: Волжский университет им. В.Н. Татищева, 2010. - С.17-19.

38. **Бедняков, Д.А.** Исследование особенностей характеристик ферментов, обеспечивающих процесс мембранного пищеварения у веслоноса / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский // XXI Съезд физиологического общества имени И.П. Павлова. Тезисы докладов. - М.-Калуга: Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. - С.433.

39. **Бедняков, Д.А.** Влияние температуры на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов белуги / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной науки и образования». Биологические науки. Т.П. - Уфа: РИЦ БашГУ, 2010. - С.468-470.

40. Неваленный, А.Н. Физиолого-биохимический статус стерляди Нижней Волги / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, В.Ю. Новинский // Современное состояние биоресурсов внутренних водоемов. Материалы докладов I Всероссийской конференции с международным участием. 12-16 сентября 2011 г., Борок, Россия. –М.: АКВАРОС, 2011. -Т.2. - С. 581-585.

41. Неваленный, А.Н. Влияние ионов некоторых металлов на уровень активности мальтазы, казеинлитических протеиназ и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса / А.Н. Неваленный, **Д.А. Бедняков**, Л.А. Неваленная, В.Ю. Новинский // Материалы 7 Международной Биогеохимической школы «Фундаментальные и инновационные аспекты биогеохимии». (Астрахань, 12-15 сентября 2011) – М.: ГЕОХИ РАН, 2011. – С. 192-195.

42. **Бедняков, Д.А.** Исследование некоторых характеристик ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у веслоноса и стерляди / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов». - Борок, 2012. - С.36-39.

43. **Бедняков, Д.А.** Влияние модификаторов углеводной и белковой природы на уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника осетровых и их гибридов / Д.А. Бедняков, А.Н. Неваленный, В.Ю. Новинский, А.А. Неваленная // Материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем». -С-Пб.: 2012. - С.37.

44. **Бедняков, Д.А.** Характеристика ультраструктуры кишечного эпителия осетровых видов рыб и их гибридов / Д.А. Бедняков, Л.А. Неваленная // Материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем». – СПб., 2012. - С.37.

45. Мартыянов, А.С. Моделирование воздействия температуры среды на уровень активности альфа-амилазы слизистой оболочки кишечника русского осетра / А.С. Мартыянов, **Д.А. Бедняков**, К.А. Тарасенко // Материалы II

Международной научной интернет-конференции «Математическое и компьютерное моделирование в биологии и химии. Перспективы развития». – Казань, 2013. - Т. 1. – С. 123-127.

46. **Бедняков, Д.А.** Моделирование воздействия осмолярности среды на уровень активности ферментов рыб на примере альфа-амилазы слизистой оболочки кишечника русского осетра / Д.А. Бедняков, А.С. Мартьянов // Материалы Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием «Физические процессы в биологических системах». – Казань, 2014. – С. 8-10.