

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГИДРОБИОНТОВ

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

Д. А. Бедняков, А. С. Мартьянов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ИНКУБАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ РУССКОГО ОСЕТРА, ЛЕНСКОГО ОСЕТРА И ИХ ГИБРИДА МЕТОДОМ МНОГОМЕРНОГО ШКАЛИРОВАНИЯ

D. A. Bednyakov, A. S. Martyanov

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF INCUBATION TEMPERATURE ON THE ACTIVITY OF THE COMPLEX OF DIGESTIVE ENZYMES OF RUSSIAN STURGEON, SIBERIAN STURGEON AND THEIR HYBRID BY MEANS OF MULTIDIMENSIONAL SCALING

Цель исследований – сравнительный анализ температурных воздействий на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и их гибрида РОЛО. Исследовались четыре фермента – α -амилаза, мальтаза, щелочная фосфатаза, суммарная протеиназа в диапазоне значений температуры от 0 до 60 °С. Основным методом обработки данных с целью анализа являлось многомерное шкалирование. В качестве способа вычисления расстояний между многомерными переменными, содержащими информацию об уровне активности ферментов при температурном воздействии, использовалось расстояние городских кварталов. После обработки методом неметрического многомерного шкалирования экспериментальных данных совокупность изучаемых многомерных переменных была представлена в виде двумерной карты. Значения функции стресса и коэффициента отчуждения составили 0,045 и 0,059 соответственно, что свидетельствует о корректно выполненном преобразовании исходно вычисленных расстояний. Установлено, что реакции пищеварительных ферментов РОЛО при воздействии различных значений температуры среды наиболее сходны с реакциями энзимов русского осетра. Во всех случаях данные, содержащие информацию о воздействии умеренной и низкой температуры на ферменты и данные по аналогичному влиянию высокой температуры, выделены в разные кластеры, что свидетельствует о значительных изменениях адаптивных реакций энзимов. Данные по воздействию температуры 60 °С удалены от основного массива исследуемых переменных. Сделан вывод о существенных перспективах применения многомерного шкалирования для комплексного анализа данных в задачах экологической физиологии при обработке многомерных массивов экспериментальных данных.

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

The aim of this work is to compare the temperature influence on activity level of the digestive enzymes of the intestinal mucous tunic of Russian sturgeon, Siberian sturgeon and their hybrid ROLO. There have been studied four enzymes – α -amylase, maltase, alkaline phosphatase and total proteinases researched in the temperature range from 0 to 60 °C. The main method of the data processing was multidimensional scaling. In the capacity of the method of estimation of the distances between multidimensional variables which contain information about activity level under the temperature influence the city-block distance was used. After the data processing by nonmetric multidimensional scaling of the experimental data studied variables were plotted on the two-dimensional map. Values of the stress-function and alienation coefficient were 0.045 and 0.059 accordingly which is indicative of correctly computed conversion of the initial distances. There has been demonstrated that reactions of the digestive enzymes of the hybrid under the influence of different temperature are the most similar with the enzymes of Russian sturgeon. In all cases data containing information about influence of moderate and low temperature on enzymes and analogical data about high temperature are in different clusters which signify about essential changes of adap-

tive reactions of the enzymes. Data of influence of temperature 60 °C are moved away from the main data array. The conclusion about prospects of application of multidimensional scaling for the complex data analysis in the ecological physiology when multidimensional experimental data array processing is made.

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

Введение

К настоящему времени достаточно подробно изучено значительное число проблем, связанных с механизмами мембранного пищеварения рыб, а также с различными адаптациями пищеварительной системы. Одним из важнейших объектов исследования в данной области являются осетровые [1–3]. Однако остается ряд невыясненных аспектов относительно особенностей адаптаций на уровне ферментных систем. Изучение воздействия экологических факторов на функциональные характеристики мембранно-связанных ферментных систем требует применения статистических методов обработки массивов данных, сочетающих возможность комплексного анализа многомерных данных с удобным и лаконичным представлением результатов исследования. Одним из подобных методов является многомерное шкалирование – математический инструментальный, предназначенный для обработки данных о попарных сходствах, связях или отношениях между анализируемыми объектами с целью представления этих объектов в виде точек некоторого координатного пространства [4]. Данный метод прикладной статистики в настоящее время чаще всего используется в современных социологических исследованиях [5, 6]. В биологических науках этот метод применяется относительно редко, а его основным назначением, как правило, является визуализация многомерных массивов данных [7–12].

Целью наших исследований являлся сравнительный анализ температурных воздействий на пищеварительные ферменты слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и их гибрида РОЛО.

Материал и методы исследований

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

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

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

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

Для обработки данных использовался комбинированный алгоритм неметрического многомерного шкалирования по методикам Гутмана и Краскала. Для вычисления функции стресса использовалась формула Краскала:

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

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

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

Результаты исследований

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

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

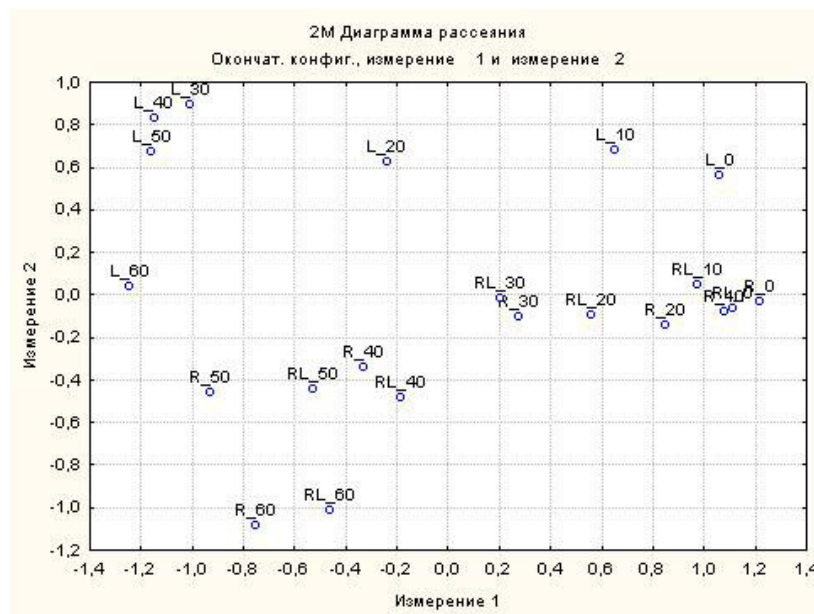


Рис. 1. Результаты многомерного шкалирования.

Индекс R в имени переменной означает данные по русскому осетру, индекс L – по ленскому осетру, RL – по РОЛО, числа в имени переменной обозначают температуру инкубации

Значения этих показателей составили 0,045 и 0,059 соответственно. Это свидетельствует о высокой степени соответствия полученной и исходной структур данных и, следовательно, об адекватности полученных результатов [1]. С целью дополнительного изучения качества выполненных преобразований по результатам обработки была построена диаграмма Шепарда (рис. 2), отображающая зависимость воспроизведенных расстояний от исходных. Данные диаграммы также свидетельствуют о хорошем соответствии исходных данных конечной конфигурации точек.

По результатам многомерного шкалирования прежде всего можно выделить характерную особенность: переменные, содержащие информацию о воздействии 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.

Не образуют компактной группы, хотя и могут быть выделены в отдельный кластер, данные по воздействию температуры в диапазоне 0–20 °C на пищеварительные ферменты ленского осетра. Остальные анализируемые данные образуют три относительно компактных множества переменных. Первый кластер включает в себя все переменные, содержащие информацию о воздействии температуры на ферменты русского осетра и РОЛО в диапазоне 0–20 °C. Другой – аналогичные данные для температурного диапазона 40–50 °C. Наконец, третий кластер наиболее сильно удален как от первых двух, так и от не образующих компактных групп переменных и содержит данные по воздействию исследуемого фактора в диапазоне 30–50 °C на изучаемые энзимы ленского осетра. Первые два выделенных кластера переменных вытянуты параллельно измерению 1 в конечной конфигурации, таким образом, для этих множеств внутренняя структура кластера (расстояния между включенными в кластер переменными) в большей степени определяется значениями координат измерения 1, тогда как межгрупповые отличия примерно в равной мере обусловлены координатами по обоим измерениям; аналогичная картина возникнет

и в случае выделения в отдельный кластер данных по воздействию низких и умеренных значений температуры на ферменты ленского осетра.

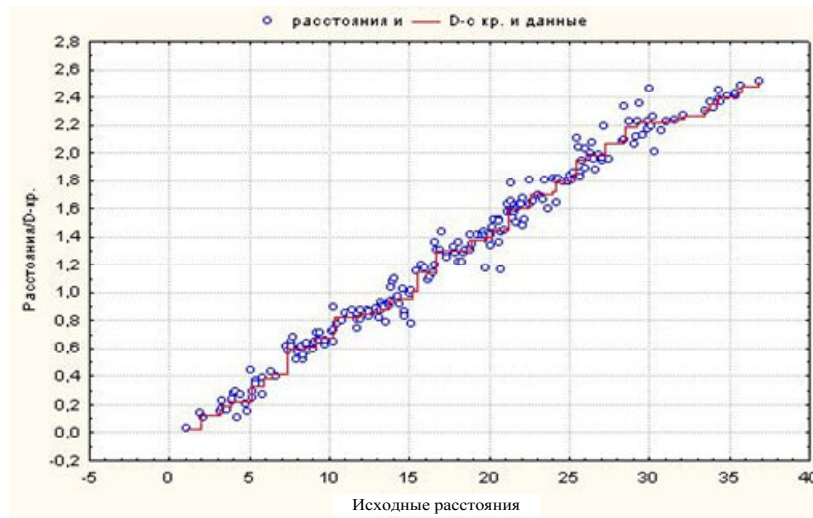


Рис. 2. Диаграмма Шепарда: по горизонтали – исходные расстояния между данными, по вертикали – воспроизведенные в конечной конфигурации, приведенной на рис. 1

Вероятно, разброс переменных в выделенных кластерах вдоль измерения 1 связан с пластичностью адаптивных реакций ферментной системы на температурные воздействия, тогда как межгрупповые отличия по измерению 2 отражают перестройку ферментного комплекса, а также межвидовые отличия реакций.

Заключение

В целом можно с уверенностью полагать, что адаптивные реакции пищеварительных ферментов РОЛО к воздействию различных значений температуры среды наиболее сходны в основных тенденциях с реакциями энзимов русского осетра, при этом в диапазоне 30–40 °С происходит резкое изменение реакций в обоих случаях. Переменные, содержащие информацию о воздействии на ферменты температуры 60 °С, удалены от основного массива данных, однако и здесь заметно существенное сходство между ферментами русского осетра и ферментами РОЛО. Переменные, содержащие данные по ленскому осетру, образуют два отдельных кластера, в одном из которых находятся переменные низкого температурного диапазона, значительно удаленные друг от друга, в другом – существенно более сходные между собой данные по воздействию температуры 30–50 °С. Наконец, данные по воздействию на этот вид температуры 60 °С удалены от основного массива и не принадлежат ни одному кластеру. Таким образом, у ленского осетра также отмечено существенное отличие реакций ферментного комплекса между низким – умеренным и верхним диапазоном значений температуры, кроме того, очевидно, его адаптивные особенности существенно отличаются от особенностей как русского осетра, так и РОЛО.

Выводы

1. Установлено, что наиболее сходны между собой реакции энзимов на воздействие температуры у русского осетра и РОЛО.
2. Реакции на воздействие температуры у ленского осетра существенно отличны от реакций не только у русского осетра, но и у гибрида.
3. Вместе с тем во всех исследованных случаях данные, содержащие информацию о воздействии умеренной и низкой температуры на ферменты и данные по аналогичному влиянию высокой температуры, выделены в разные кластеры, что свидетельствует о значительных изменениях адаптивных реакций энзимов.
4. С точки зрения перспектив применения многомерное шкалирование является эффективным методом комплексного анализа данных в задачах экологической физиологии при обработке многомерных массивов экспериментальных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

REFERENCES

1. Nevalenyyi A. N., Bedniakov D. A., Novinskii V. Yu. Kompleksnoe issledovanie osobennostei protsessov membrannogo pishchevarenia u sevyriugi [Complex study of the peculiarities of the processes of membrane digestion of sterlate]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2011, no. 2, pp. 93–98.
2. Bedniakov D. A., Nevalenyyi A. N., Korostelev S. G. Sovmestnoe vliianie temperatury i ionov metallov na uroven' aktivnosti shchelochnoi fosfatazy slizistoi obolochki kishechnika u ryb semeystva Acipenseridae [Joint influence of temperature and metal ions on the level of activity of alkaline phosphatase of intestinal mucosa of fish belonging to the family Acipenseridae]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2012, no. 2, pp. 131–135.
3. Mart'ianov A. S., Nevalennaia A. A., Nevalennaia L. A. Nchetko-neironnoe modelirovanie izmenenii urovnia aktivnosti karbogidraz piloricheskoi zhelezy russkogo osetra pod vozdeistviem osmoliarnosti sredy [Fuzzy-neural modeling of changes of the level of the activity of carbohydrases of Russian sturgeon pyloric glands under the influence of environment osmolarity]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Rybnoe khoziaistvo*, 2012, no. 1, pp. 93–98.
4. Deivison M. *Mnogomernoe shkalirovanie: metody nagliadnogo predstavleniia dannykh* [Multidimensional scaling: methods of illustrative representation of data]. Moscow, Finansy i statistika Publ., 1988. 254 p.
5. Terekhina A. Yu. *Analiz dannykh metodami mnogomernogo shkalirovaniia* [Analysis of data using methods of multidimensional scaling]. Moscow, Nauka Publ., 1986. 168 p.
6. Tolstova Yu. N. *Osnovy mnogomernogo shkalirovaniia* [Basics of multidimensional scaling]. Moscow, KDU, 2006. 160 p.
7. Tsipileva T. A. *Metody avtomaticheskoi klassifikatsii v szhatii ekologicheskoi informatsii* [Methods of automation classification in ecological data compression]. *Algoritmicheskoe i informatsionnoe obespechenie sistem ekoinformatsii*. Tomsk, SO AN SSSR, 1989, pp. 23–61.
8. Shitikov V. K., Rozenberg G. S., Zinchenko T. D. *Kolichestvennaia gidroekologiya: metody sistemnoi identifikatsii* [Quantitative hydroecology: methods of system identification]. Tolyatti, IEVB RAN, 2003. 463 p.
9. Khrustaleva A. M. *Geneticheskaiia differentsiatsiia nerki (Oncorhynchus nerka) aziatskikh stad. Avtoreferat diss. kand. biol. nauk* [Genetic differentiation of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) of Asian stocks. Abstract of dis. can. biol. sci.]. Moscow, 2007. 25 p.

10. Prokofev A. M. O proiskhozhdenii solovetskoj riapushki Coregonus albula i koriushki Osmerus eperlanus Siamozera [On the origin of Sovki whitefish (Coregonus albula) and Syamozer smelt (Osmerus eperlanus)]. *Voprosy ikhtiologii*, 2009, vol. 49, no. 1, pp. 15–28.

11. Novakovskii A. B. Metody ordinatsii v sovremennoi geobotanike [Methods of ordination in modern geobotanics]. *Vestnik Instituta biologii Komi NTs UrO RAN*, 2008, no. 10 (132), pp. 2–8.

12. Diripasko O. A. Populatsionnaia struktura pilengasa Liza haematocheila (Mugiliformes, Mugilidae), akklimatizirovannogo v basseine Azovskogo moria [Population structure of haarder acclimatized in the basin of the Azov Sea]. *Voprosy ikhtiologii*, 2007, vol. 47, no. 4, pp. 476–474.

13. Nevalennyi A. N., Bedniakov D. A., Dzerzhinskaia I. S. *Enzimologiya* [Enzymology]. Astrakhan, Izd-vo AGTU, 2005. 84 p.

Статья поступила в редакцию 7.03.2013

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Бедняков Дмитрий Андреевич – Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук, доцент; доцент кафедры «Социально-культурный сервис и туризм»; bednyakovd@rambler.ru.

Bednyakov Dmitriy Andreevich – Astrakhan State Technical University; Candidate of Biological Sciences, Assistant Professor; Assistant Professor of the Department "Social-Cultural Service and Tourism"; bednyakovd@rambler.ru.

Мартянов Александр Сергеевич – Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук; ассистент кафедры «Гидробиология и общая экология»; martyanovas1729@yandex.ru.

Martianov Alexander Sergeevich – Astrakhan State Technical University; Candidate of Biological Sciences; Assistant of the Department "Hydrobiology and Common Ecology"; martyanovas1729@yandex.ru.