

УДК 597.423:639.3.04

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСКУССТВЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА АМУРСКИХ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

© 2009 г. М.Ю. Флейшман¹, А.В. Соколов², В.М. Авласенко³, О.А. Лебедько¹,
Е.Н. Сазонова¹, И.Е. Хованский³, С.С. Тимошин¹

1 – Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск 680000

2 – Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, Хабаровск 680063

3 – Амурское бассейновое управление по рыболовству и сохранению водных
биологических ресурсов (ФГУ «Амуррыбвод»), Хабаровск 680021

Работа посвящена изучению возможностей применения биологически активных веществ для оптимизации искусственного воспроизводства осетровых рыб, обитающих в р. Амур. Рассмотрено влияние синтетических олигопептидов с опиоидной активностью (седатина и даларгина) при однократной обработке развивающейся икры на соматометрические показатели предличинки калуги и амурского осетра, состояние пластической функции гепатоцитов, а также состояние системы свободнорадикального окисления в оплодотворенной икре. Результаты эксперимента показывают повышение у подопытной молоди массы и длины тела, улучшение состояния клеток печени, улучшение состояния системы свободнорадикального окисления в оплодотворенной икре. В целом, обработанная молодь лучше адаптирована к неблагоприятным факторам среды и более подготовлена к выпуску в естественные условия.

ВВЕДЕНИЕ

Широкий спектр антропогенных воздействий на экосистему бассейна р. Амур, разрушение естественной среды обитания и браконьерство диктуют необходимость искусственного воспроизводства амурского осетра и калуги (Новомодный и др., 2004; Krychtin, Svirskiy, 1997). По мнению М.Л. Крыхтина и Э.И. Горбач (1994), для восстановления численности этих рыб следует ежегодно выпускать не менее 11 млн. шт. молоди. Однако, технология искусственного воспроизведения амурских осетровых еще требует значительного усовершенствования (Иванов и др., 2004).

Молодь осетровых рыб, выпускаемая с рыбоводных предприятий, как правило, характеризуется невысокой жизнестойкостью и плохо подготовлена к жизни в естественной среде (Иванов и др., 2004; Никоноров, Витвицкая, 1993). Положение осложняется проблемами загрязнения воды в р. Амур (Новомодный и др., 2004), так как эффективность рыбоводных мероприятий в конечном счете определяется состоянием реки, в которую выпускают молодь (Лихатович, 2004). Этим обусловлена необходимость повышения эффективности рыбоводного процесса для увеличения выживаемости молоди в загрязненной воде.

Одним из способов оптимизации искусственного воспроизводства является применение различных биологически активных веществ (Сазонова и др., 2004; Соколов и др., 2004а, 2007; Соколов, 2005). В настоящее время в рыбоводстве используется широкий спектр препаратов. Осуществляется применение биологически активного вещества класса брассиностероидов – фитогормона эпибрассинолида (Егоров и др., 2000), парааминобензойной кислоты (Сергиенко, Кубышкин, 2000), трийодтиронина для повышения устойчивости личинок и мальков осетровых к неблагоприятным условиям содержания и болезням (Бойко, 2008). Имеется опыт применения регуляторных пептидов, улучшающих показатели искусственного разведения радужной форели и других видов рыб, в том числе – осетровых (Лаптева и др., 1989; Седова, 1990).

Регуляторные пептиды опиоидного ряда выгодно отличаются тем, что они действуют посредством включения каскадных механизмов. Период полураспада этих пептидов очень мал и морфогенетическая активность проявляется в малых концентрациях. Обработка икры радужной форели, стерляди и бестера даларгином (H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH) приводит к повышению выживаемости зародышей, увеличению массы и размеров мальков, нарастанию содержания ДНК и белка в мышечной ткани рыб (Лаптева и др., 1989; Микодина, 1999). Следует учитывать модифицирующее действие даларгина на нуклеиновые кислоты в геноме рыб (Микодина, 1999). В то же время, даларгин является официальным препаратом и широко применяется в медицине. Подобно даларгину, седатин (H-Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH) – синтетический опиоидный аналог дерморфина – обладает морфогенетическими эффектами в отношении млекопитающих и оказывает позитивное влияние на развитие мальков осетровых рыб р. Амур (Флейшман и др., 2004, 2007а, 2007б, патент РФ 2298921). Основная часть исследований была проведена с использованием седатина; кроме того, в экспериментах с обработкой икры калуги, был использован даларгин, эффективность которого в рыборазводном процессе была продемонстрирована ранее (Микодина и др., 1987).

Искусственное воспроизводство осетровых в условиях Хабаровского края осложняется тем, что места забора гамет и инкубации оплодотворенной икры часто разделены большим расстоянием, причем транспортная схема осложнена. Это диктует необходимость разработки технологий, которые наряду с увеличением устойчивости молоди при выпуске в естественную среду обитания, сохраняют и улучшают жизнеспособность икры в процессе транспортировки.

Целью настоящей работы явилась возможность повышения эффективности технологии искусственного разведения осетровых видов рыб р. Амур посредством применения синтетических аргининсодержащих пептидов. Перед нами стояли следующие основные задачи:

1. Изучить характер влияния седатина и даларгина на выживаемость личинок амурских осетровых рыб в процессе выращивания.
2. Исследовать характер влияния исследуемых пептидов на соматометрические показатели в различные этапы развития мальков.
3. С помощью хемолуминесцентного анализа изучить влияние пептидов на процессы свободнорадикального окисления в икре осетровых рыб.
4. С помощью компьютерной морфометрии изучить влияние исследуемых пептидов на состояние ядрышкового организатора хромосом в печени мальков осетровых рыб.

Научная новизна работы заключается в том, что ранее влияние обработки развивающейся оплодотворенной икры амурского осетра и калуги опиоидными пептидами на выживаемость, рост и развитие их молоди не изучалось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на икре и молоди амурского осетра и калуги. Половые продукты амурского осетра были получены в цехе рыболовецкого колхоза «Новоамурский». Икру калуги получали непосредственно в месте отлова производителей (Николаевский район), после оплодотворения и обработки пептидами ее выдерживали до 17-18 стадий, а затем транспортировали на Анюйский ЛРЗ, где проводили доинкубацию и последующее выращивание молоди. Обработка

экспериментального материала осуществлялась в Центральной научно-исследовательской лаборатории Дальневосточного государственного медицинского университета (ЦНИЛ ДВГМУ).

Оплодотворенную икру обрабатывали растворами пептидов с концентрацией 10^{-4} г/дм³ по методике, предложенной И.А. Шехановой и др. (1987), Е.В. Микодиной и др. (1987), через 30-40 мин. после оплодотворения. Обработку осуществляли в тазах при постоянном перемещении в течение 1 ч. Одновременно инкубировали контрольный образец без добавления пептидов. Для минимизации генетических различий все образцы икры были получены от одной самки каждого вида.

После вылупления предличинок поштучно пересаживали по 2 500 особей в бассейны на подращивание. В процессе роста и развития измеряли соматометрические показатели личинок и мальков: полную длину (TL), и массу (m), особей; подсчитывали количество погибших особей.

Для интегральной оценки процессов свободнорадикального окисления в эмбрионах использовали метод хемолуминесценции (ХМЛ). Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50 B «PERKIN ELMER». Сигнал стандартизировали с помощью встроенной программы «Finlab». Определяли спонтанную и индуцированную Fe^{2+} ХМЛ, а также кинетику ХМЛ, индуцированную H_2O_2 в присутствии люминола.

Спонтанную и индуцированную Fe^{2+} ХМЛ определяли и анализировали по трем параметрам: светосумма за 1 мин. спонтанной ХМЛ ($S_{сп.}$), величина которой коррелирует с интенсивностью свободнорадикальных процессов; максимум быстрой вспышки (H1) индуцированной ХМЛ, свидетельствующий о содержании гидроперекисей липидов; светосумма ($S_{инд.}$) за 4 мин. после «быстрой» вспышки, отражающая скорость образования перекисных радикалов.

Кинетику ХМЛ, инициированную H_2O_2 в присутствии люминола, анализировали по двум параметрам: максимуму быстрой вспышки (H2), указывающему на интенсивность радикалообразования в реакциях, подобной реакции Фентона, и светосумме ($S_{инд.}$) за 4 мин., величина которой зависит от активности антиоксидантной антирадикальной систем защиты.

Для оценки влияния регуляторных пептидов на обменные процессы в организме мы использовали изучение ядрышкового организатора (ЯО). Количество ядрышек косвенно отражает уровень синтеза белка в какой-либо конкретной ткани. Изучение ЯО в гепатоцитах позволяет сделать вывод о пластической функции печени как регулятора обмена веществ и оценить состояние организма в целом (Мамаев и др., 1993; Штейн и др., 1999).

Для окрашивания ядрышек в срезах печени использовалось коллоидное серебро. Оно импрегнирует в клетках специфические классы аргентофильных протеинов (в частности, нуклеолин), которые имеют непосредственное отношение к транскрипции в клетках прерибосомной РНК и к биогенезу рибосом. Это позволяет изучить пластическую функцию гепатоцитов. Содержание гранул серебра в ядрышках соответствует количеству работающих в них РНК-полимераз I. Под микроскопом ядрышки окрашиваются в темно-коричневый цвет на фоне светло-коричневых ядер (Мамаев и др., 1993).

Подсчет числа ядрышек в ядрах гепатоцитов, измерение площади ядер и ядрышек проводили с помощью компьютерной системы тонкой микроскопии «МеКоС-Ц» в ЦНИЛ ДВГМУ (Соколов и др., 2004б).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Statistica 5.0. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. При $0,05 < p < 0,1$ отмечали статистическую тенденцию к появлению различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение соматометрических показателей личинок и мальков амурского осетра и калуги проводили в течение 39 суток с момента вылупления и до выпуска в естественные условия. В одной пробе анализировали по 30 особей из каждой группы. В постэмбриональном развитии предличинок и мальков, обработанных растворами пептидов, не наблюдалось каких-либо отклонений от нормы. Активность движений и поведенческие реакции также не отличались от контрольных параметров. На протяжении периода наблюдения каких-либо негативных отклонений соматометрических показателей у подопытных особей зарегистрировано не было. Более того, имеются свидетельства ускоренного роста у мальков подопытных групп (табл. 1, 2).

У молоди амурского осетра в группе особей, развившихся из икры, обработанной седатином, наблюдалось статистически достоверное увеличение средней длины тела по сравнению с особями из контрольной группы на двух сроках измерений из пяти. Достоверное увеличение массы имело место в трех случаях, и, в одном – статистическая тенденция (табл. 1).

Таблица 1. Сравнение длины и массы исследуемых групп молоди амурского осетра в различные периоды жизни.

Table 1. Comparison of length and weight in studied groups of Amur sturgeon's juveniles in different ages.

| Вариант | Показатели | Возраст, сут | | | | |
|----------|------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 18 | 21 | 27 | 31 | 39 |
| Седатин | TL, мм | 27,9±0,6 | 31,5±1,2 | 38,1±0,7** | 42,9±1,5** | 54,2±1,7 |
| | m, мг | 103,0±6,4* | 158,8±20,4 | 268,8±14,5 | 403,1±44,2 | 749,9±61,4 |
| Контроль | TL, мм | 26,7±0,4 | 29,1±1,1 | 34,2±0,7 | 37,9±1,1 | 52,3±1,6 |
| | m, мг | 77,6±4,0 | 116,3±11,1 | 191,9±10,9 | 266,1±22,2 | 656,2±53,2 |

Примечания: TL – длина в мм; m – масса в мг; ** – различия достоверны при $p < 0,05$; * – $0,05 < p < 0,1$.

Note: TL – length in mm; m – weight in mg; ** – differences true with $p < 0,05$; * – $0,05 < p < 0,1$.

Таблица 2. Сравнение длины и массы исследуемых групп молоди калуги в различные периоды жизни.

Table 2. Comparison of length and weight in studied groups of Kaluga sturgeon's juveniles in different ages.

| Вариант | Показатели | Возраст, сут | | | | |
|----------|------------|--------------|-------------|--------------|-------------|---------------|
| | | 18 | 21 | 27 | 31 | 39 |
| Седатин | TL, мм | 27,2±0,5** | 33,0±1,0 | 45,7±1,0** | 55,95±1,9 | 63,20±1,7* |
| | m, мг | 93,0±5,5** | 211,0±16,5* | 532,0±33,2** | 952,5±83,5 | 1519,5±99,2** |
| Контроль | TL, мм | 25,3±0,65 | 32,7±1,1 | 41,6±1,7 | 49,9±2,3 | 57,2±2,5 |
| | m, мг | 71,5±4,8 | 188,5±19,5 | 402,0±52,1 | 731,0±94,3 | 1075,0±136,8 |
| Даларгин | TL, мм | 26,9±0,7 | 33,5±0,8 | 41,5±1,6 | 55,1±1,9 | 62,1±2,8 |
| | m, мг | 87,0±7,4 | 225,5±12,9* | 430,0±46,9 | 967,5±90,2* | 1512,5±171,3* |

Примечания: TL – длина в мм; m – масса в мг; ** – различия достоверны при $p < 0,05$; * – $0,05 < p < 0,1$.

Note: TL – length in mm; m – weight in mg; ** – differences true with $p < 0,05$; * – $0,05 < p < 0,1$.

Длина тела молоди калуги, полученной из икры, обработанной седатином, в 2 случаях из 5 статистически достоверно больше, чем у молоди контрольной группы, и в одном случае наблюдается статистическая тенденция к увеличению длины тела по сравнению с контролем (табл. 2). Масса молоди калуги из группы «седатин» в 3 случаях из 5 достоверно больше, чем масса молоди контрольной группы, и еще в одном случае существует статистическая тенденция к увеличению массы по сравнению с группой «контроль».

У молоди калуги, полученной из икры, обработанной даларгином, средняя длина тела не превышает таковую у особей контрольной группы. Однако масса особей из группы «даларгин» в 3 случаях из 5 демонстрирует статистическую тенденцию к появлению различий в отношении группы «контроль».

Таким образом, обработка икры амурского осетра и калуги растворами исследуемых пептидов не вызывает негативных отклонений в последующие 39 сут., и даже имеют место свидетельства ускоренного роста. Увеличение массы по сравнению с контролем в группе «седатин» выше, чем в группе «даларгин». Увеличение массы у мальков одного возраста оценивается как один из показателей их лучшей адаптированности к условиям выращивания и потенциально лучшей выживаемости (Бойко, 2008).

Результаты учета гибели молоди калуги за время выращивания (45 сут.) до нормативной массы представлены на рисунке 1.

В процессе выращивания в контрольной группе молоди смертность была очень высокой (выше норматива, который составляет 70%) и составила 76,5%. Это связано с низким качеством икры и, соответственно, плохой устойчивостью молоди к неоптимальным условиям выращивания (Детлаф и др., 1981). В то же время, смертность в группе особей, обработанных пептидами (седатином и даларгином), была значительно ниже и составила соответственно 53,5 и 62,0%, то есть была ниже нормативной. Очевидно, это связано с тем, что исследуемые пептиды активируют в организме рыб механизмы неспецифической устойчивости к различным неблагоприятным факторам.

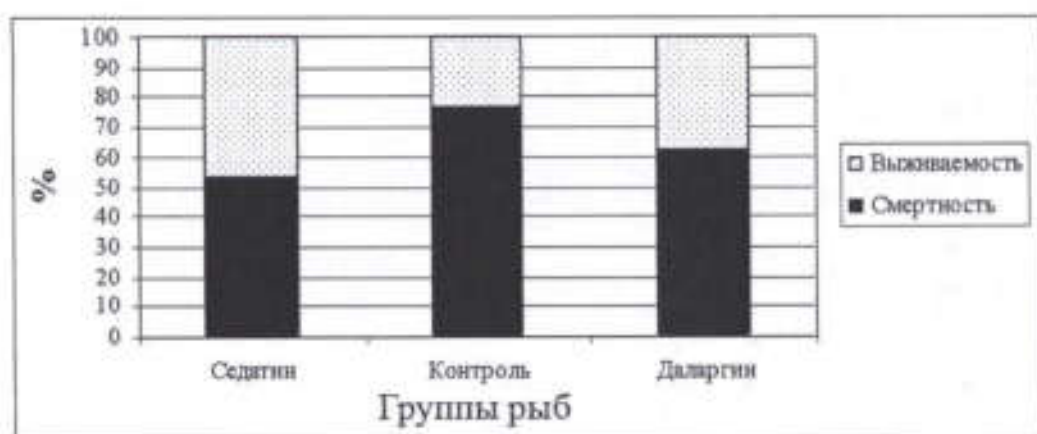


Рис. 1. Смертность молоди калуги за период выращивания.

Fig. 1. General mortality of Kaluga sturgeon's juveniles during the growing period.

Анализ хемолуминесцентных показателей (табл. 3) продемонстрировал, что при воздействии седатина на инкубируемую икру амурского осетра происходит увеличение буферной емкости антиоксидантной антирадикальной системы защиты (APC3): в сравнении с контролем величина $S2_{\text{вкл}}$ статистически значимо снизилась в 1,6 раза. При этом наблюдается падение уровня образования гидроксил-радикалов ($H2$

снизился в 2,1 раза) и замедление процесса генерации перекисных радикалов ($SI_{ind.}$ снизилась в 1,5 раза). Повышение активности защитных систем не отразилось на содержании гидроперекисей липидов (уровень $H1$ практически не изменился).

Таблица 3. Влияние пептидов на показатели хемотроминесценции оплодотворенной икры калуги и амурского осетра.

Table 3. Influence of peptides on indices of chemoluminescence in impregnated eggs of Kaluga and Amur sturgeon.

| Вид | Показатели, мВ | Контроль | Седатин | Даларгин |
|----------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|
| Калуга | $S_{cl.}$ | $0,0128 \pm 0,0010$ | $0,0102 \pm 0,0011$ | $0,0070 \pm 0,0006^{*,**}$ |
| | Индукционная ХМЛ ($FeSO_4$) | | | |
| | $H1$ | $0,0190 \pm 0,0012$ | $0,0180 \pm 0,0014$ | $0,0106 \pm 0,0009^{*,**}$ |
| | $SI_{ind.}$ | $0,0505 \pm 0,0040$ | $0,0330 \pm 0,0025^*$ | $0,0240 \pm 0,0016^{*,**}$ |
| | Индукционная ХМЛ (H_2O_2) | | | |
| | $H2$ | $0,0221 \pm 0,0017$ | $0,0156 \pm 0,0011^*$ | $0,0097 \pm 0,0008^{*,**}$ |
| | $S2_{ind.}$ | $0,0470 \pm 0,0030$ | $0,0288 \pm 0,0020^*$ | $0,0204 \pm 0,0019^{*,**}$ |
| Амурский осетр | $S_{cl.}$ | $0,0120 \pm 0,0010$ | $0,0098 \pm 0,0012$ | |
| | Индукционная ХМЛ ($FeSO_4$) | | | |
| | $H1$ | $0,0180 \pm 0,0014$ | $0,0150 \pm 0,0017$ | |
| | $SI_{ind.}$ | $0,0489 \pm 0,0039$ | $0,0330 \pm 0,0027^*$ | |
| | Индукционная ХМЛ (H_2O_2) | | | |
| | $H2$ | $0,0210 \pm 0,0018$ | $0,0100 \pm 0,0007^*$ | |
| | $S2_{ind.}$ | $0,0455 \pm 0,0030$ | $0,0280 \pm 0,0023^*$ | |

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль»; ** – $p < 0,05$ по отношению к группе «седатин».

Note: * – $p < 0,05$ concerning «control»; ** – $p < 0,05$ concerning «sedatine» group.

Аналогичные результаты получены при воздействии седатина на развивающуюся икру калуги. Происходит увеличение буферной емкости антиоксидантной антирадикальной системы защиты, а также замедление процессов образования и накопления перекисных радикалов липидной природы. Повышение активности защитных систем не отразилось на содержании гидроперекисей липидов.

Как у амурского осетра, так и у калуги выявленные при воздействии седатина изменения в системах, генерирующих активные кислородные метаболиты (АКМ) и нейтрализующих последние, в целом на редокс-потенциал исследуемых образцов не влияли: величина $S_{cl.}$ не имела достоверных отличий от контрольного уровня. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что после обработки седатином устойчивость оплодотворенной икры осетра амурского к оксидативному стрессу повышается.

В отличие от седатина, даларгин в данной экспериментальной ситуации обладал более выраженным антиоксидантным антирадикальным эффектом. В группе молоди калуги «даларгин» все исследуемые ХМЛ-показатели свободнорадикального статуса статистически значимо снизились в сравнении, как с контрольными величинами, так и с группой «седатин». Так, буферная емкость АРСЗ увеличилась, соответственно, в 2,30 и 1,44 раза; перекисная резистентность – в 2,28 и 1,44 раза; скорость образования и накопления перекисных радикалов снизилась, соответственно, в 2,10 и 1,38 раза; концентрация гидроперекисей липидов уменьшилась, соответственно, в 1,79 и 1,67 раза. В оплодотворенной икре,

обработанной даларгином, величина $S_{\text{ср.}}$ уменьшилась, соответственно, в 1,83 и 1,45 раза в сравнении с контролем и группой «седатин». Таким образом, имело место угнетение продукции активных кислородных метаболитов радикальной и нерадикальной природы.

В целом, даларгин проявил себя в данной экспериментальной ситуации как более активный антиоксидант. Это следует иметь в виду при транспортировке икры. Однако, на более поздних этапах онтогенеза седатин, не столь кардинально менявший биогенез АКМ оплодотворенной икры, продемонстрировал более выраженные эффекты.

Этим и объясняется, что смертность в группе особей, обработанных седатином, была на 23% ниже, чем в контроле, и на 8,5% – чем у особей группы «даларгин». Увеличение под воздействием седатина буферной емкости антиоксидантных антирадикальных систем защиты активизирует механизмы неспецифической устойчивости более эффективно, чем при воздействии даларгина, резко подавляющего продукцию АКМ. До определенного уровня АКМ являются необходимым компонентом фагоцитоза, деградации и элиминации ксенобиотиков.

Результаты изучения морфометрических показателей печени исследуемых групп молоди амурского осетра представлены в таблице 4.

Таблица 4. Сравнение морфометрических показателей гепатоцитов молоди исследуемых групп амурского осетра и калуги в возрасте 31 сут.

Table 4. Comparison of liver cells' morphometric indices from 31-days juveniles of Kaluga and Amur sturgeon in studied groups.

| В ид | Вариант опыта | Показатели ЯО | Среднее значение | Ошибка среднего |
|----------------|---------------|---------------------------------|---------------------|--------------------|
| Амурский осетр | Контроль | Площадь ядра, мкм^2 | 40,050 | 1,304 |
| | | Площадь ядрышек, мкм^2 | 4,980 | 0,235 |
| | | Кол-во ядрышек | 3,040 | 0,054 |
| | Седатин | Площадь ядра, мкм^2 | 57,470** | 1,139 |
| | | Площадь ядрышек, мкм^2 | 10,070** | 0,373 |
| | | Кол-во ядрышек | 4,250** | 0,043 |
| Калуга | Контроль | Площадь ядра, мкм^2 | 39,700 | 2,120 |
| | | Площадь ядрышек, мкм^2 | 4,050 | 0,240 |
| | | Кол-во ядрышек | 3,321 | 0,127 |
| | Седатин | Площадь ядра, мкм^2 | 53,400* | 3,450 |
| | | Площадь ядрышек, мкм^2 | 7,210* | 0,57 |
| | | Кол-во ядрышек | 3,340 | 0,080 |
| | Даларгин | Площадь ядра, мкм^2 | - | - |
| | | Площадь ядрышек, мкм^2 | - | - |
| | | Кол-во ядрышек | 3,380 | 0,040 |

Примечания: ** – различия достоверны при $p < 0,05$; * – $0,05 < p < 0,1$.

Note: ** – differences true with $p < 0,05$; * – $0,05 < p < 0,1$.

Анализ ЯО в печени 31-суточной молоди амурского осетра показал, что среднее количество ядрышек на 1 ядро в гепатоцитах молоди амурского осетра группы, обработанной седатином ($4,250 \pm 0,043$), статистически достоверно увеличено по сравнению с контролем ($3,040 \pm 0,054$).

Кроме того, наблюдаются достоверные отличия от контроля по средней площади ядрышек в ядре. Площадь ядер в варианте «седатин» также достоверно больше, чем в контроле.

Анализ ЯО в печени 31-суточной молоди калуги, подвергнутых воздействию опиоидных пептидов, не выявил каких-либо достоверных изменений показателей. Количество ядрышек в ядрах гепатоцитов и их распределение достоверно не отличались от контрольных параметров (табл. 4, рис. 2). Вместе с тем, при анализе гистограмм распределения гепатоцитов у калуги по количеству ядрышек можно отметить некоторое уменьшение числа ядер гепатоцитов с 1-2 ядрышками и увеличение числа ядер гепатоцитов с 3-4 ядрышками у обработанных седатином и даларгином рыб, а также и с 6 – у даларгиновых (рис. 2). Аналогичное влияние даларгина на ядрышковый аппарат протоплазматических ооцитов радужной форели было отмечено М.А. Седовой (1991).

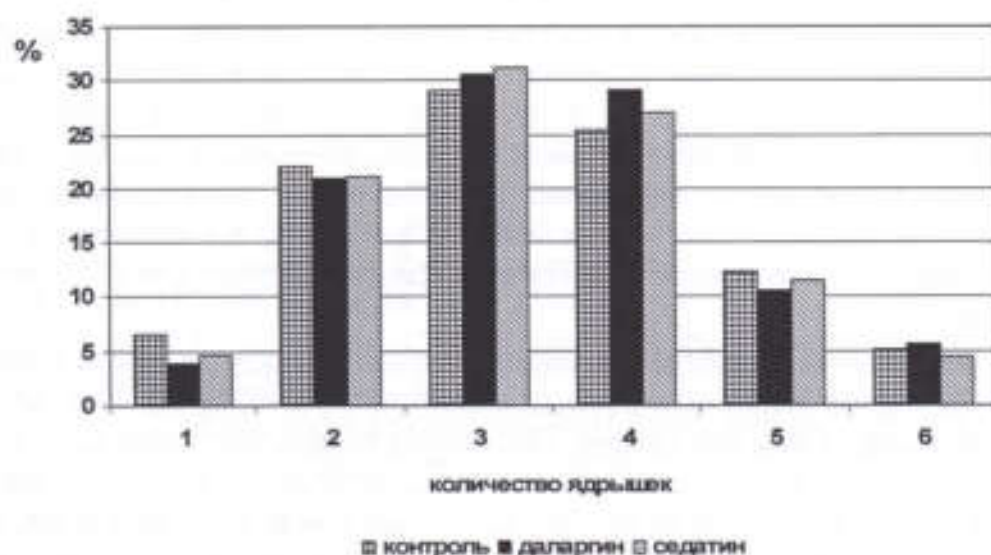


Рис. 2. Распределение ядер гепатоцитов по количеству ядрышек у 31-суточной молоди калуги.

Fig. 2. Distribution of liver cells' nuclei by quantity of nucleoli in liver cells from 31-days juveniles of Kaluga and Amur sturgeon in studied groups.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о повышении белоксинтетической активности гепатоцитов молоди амурского осетра и, в несколько меньшей степени, калуги, после обработки икры седатином. Результаты исследования свидетельствуют о повышении функциональных резервов печени подопытных особей. Вероятно, с этим влиянием пептидов на пластический обмен связано и увеличение массы молоди калуги и амурского осетра подопытных групп по сравнению с контролем.

Изменение морфометрических показателей в сторону уменьшения наблюдаются при неблагоприятных воздействиях (гипоксия, отравление, температурный стресс и т.д.). Улучшение условий роста организма на ранних этапах онтогенеза способствует активации ядрышкового аппарата (Штейн и др., 1999). Так как условия содержания подопытных и контрольных групп в заводских условиях

полностью одинаковы, то увеличение средних значений упомянутых показателей у обработанной опиидами молоди свидетельствует о повышении ее устойчивости к неблагоприятным воздействиям. Вероятно, с этим связано снижение смертности молоди подопытных групп за период выращивания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о позитивном влиянии пептидов опиоидного ряда – седатина и даларгина – на развитие молоди амурского осетра и калуги в первые 39 суток жизни. Однократная обработка оплодотворенной икры в растворе данных пептидов в течение 1 ч привела к некоторому ускорению соматического роста по сравнению с особями контрольной группы. Это проявлялось в увеличении у рыб подопытных групп длины и массы тела. Данный факт можно интерпретировать как косвенное свидетельство повышения устойчивости обработанной молоди к неоптимальным условиям выращивания.

За период выращивания (45 сут.) до выпуска в естественные условия смертность молоди калуги в группе особей, обработанных седатином, была на 23% ниже, чем в контроле, и на 8,5% – чем у особей группы «даларгин». В обеих группах, обработанных пептидами, показатели смертности были ниже нормативно допустимых, тогда как в контроле смертность молоди была выше нормативных показателей.

Морфометрическое изучение клеток печени исследуемой 31-суточной молоди осетровых выявляет достоверное увеличение площади ядер и ядрышек, а у амурского осетра – и количества ядрышек на ядро, в группе, обработанной седатином. Это свидетельствует об усилении пластической функции печени и организма в целом, чем и объясняется наблюдаемое ускорение роста. Данные изменения предполагают лучшую подготовленность подопытных мальков к выпуску в естественные условия и более выраженную устойчивость к неблагоприятным условиям среды (в том числе к токсикантам).

При воздействии седатина на оплодотворенную икру осетровых происходит увеличение буферной емкости антиоксидантной антирадикальной системы защиты. При этом наблюдается падение уровня образования гидроксил-радикалов и замедление процесса генерации перекисных радикалов, но содержание гидроперекисей липидов практически не меняется. Даларгин проявляет более выраженный антиоксидантный эффект, под воздействием которого все исследуемые ХМП-показатели свободнорадикального статуса у особей 2 видов амурских осетровых статистически значимо снизились не только в сравнении с контролем, но и по отношению к группе «седатин» (в том числе редокс-потенциал образцов в целом).

Результаты исследований позволяют рекомендовать применение изученных пептидов в искусственном воспроизводстве осетровых рыб. При этом даларгин, обладающий более сильным антиоксидантным эффектом, целесообразно применять для обработки икры при транспортировке на большие расстояния. Седатин, обладающий более выраженным ростостимулирующим эффектом, подходит для использования с целью повышения устойчивости молоди к неблагоприятным факторам, снижения смертности и ускорения достижения нормативной массы для выпуска в естественные условия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бойко Н.Е. Физиологические механизмы адаптивных функций в раннем онтогенезе русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt. Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб: ГосНИОРХ, 2008. 32 с.

Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.И. Развитие осетровых рыб. М.: Наука, 1981. 224 с.

Егоров М.А., Витвицкая Л.В., Никоноров С.И., Теплый Д.Л. Некоторые итоги и перспективы исследования феноменологии и физиологических механизмов действия эфирбассинолида на раннее развитие осетровых. Сб. Осетровые на рубеже 21 века. Астрахань: КаспНИРХ, 2000. С. 237-238.

Иванов С.А., Литовченко Ж.С., Кошелев В.Н. Искусственное воспроизводство осетровых рыб как способ сохранения и увеличения их запасов. Сб. Четвертые Гродековские чтения. Мат. регион. науч.-практ. конф. Хабаровск: ХККМ им. Гродекова, 2004. С. 290-293.

Крыхтин М.Л., Горбач Э.И. Осетровые рыбы Дальнего Востока // Экономическая жизнь Дальнего Востока. 1994. №1(3). С. 86-91.

Лаптева Т.И., Микодина Е.В., Фомина Г.Т., Филиппович Ю.Б. Влияние синтетического аналога лей-энкефалина даларгина на содержание белка и нуклеиновых кислот в мышцах радужной форели // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1989. Т. 107. №4. С. 473-475.

Лихатович Дж. Лосось без рек. Владивосток: ИД «Дальний Восток», 2004. 376 с.

Мамаев Н.Н., Ковалева О.В., Аминева Х.К. Оценка пластической функции кардиомиоцитов методом серебрения ядрышек у оперируемых больных ишемической болезнью сердца // Архив патологии. 1993. №3. С. 43-45.

Микодина Е.В. Физиолого-биохимические основы регуляции функций у рыб пептидами энкефалинового ряда: Автореф. диссерт. на соиск. уч. степени докт. биол. наук. М.: ВНИРО, 1999. 49 с.

Микодина Е.В., Седова М.А., Глубоков А.И., Наволоцкий В.А. Методические указания по применению даларгина для повышения жизнестойкости икры, предличинки, молоди рыб и акселерации их роста. М.: ВНИРО, 1987. 13с.

Никоноров С.И., Витвицкая Л.В. Эколого-генетические проблемы воспроизводства осетровых и лососевых рыб. М.: Наука, 1993. 254 с.

Новомодный Г.В., Золотухин С.Ф., Шаров П.О. Рыбы Амура: богатство и кризис. Владивосток: Апельсин, 2004. 64 с.

Патент РФ 2298921, дата публикации 2007.05.20, «Способ стимуляции развития осетровых рыб», авторы: Флейшман М.Ю., Тимошин С.С., Сазонова Е.Н., Дейгин В.И., Ярова Е.П.

Сазонова Е.Н., Флейшман М.Ю., Соколов А.В. Некоторые аспекты оптимизации искусственного воспроизводства осетровых рыб. Сб. Природные ресурсы Хабаровского края: проблемы науки и образования. Хабаровск: ХГПУ, 2004. С. 92-97.

Седова М.А. Использование даларгина для повышения жизнестойкости икры и личинок рыб при искусственном воспроизводстве. Сб. Эколого-физиологические и токсикологические аспекты и методы рыбохозяйственных исследований. М.: ВНИРО, 1990. С. 143-151.

Седова М.А. Влияние олигопептида даларгина на морфофизиологические показатели рыб. Дис. канд. биол. наук. М.: ВНИРО, 1991. 136 с.

Сергиенко Л.Л., Кубышкин В.И. Применение пара-аминобензойной кислоты в осетроводстве. Сб. Осетровые на рубеже 21 века. Астрахань: КаспНИРХ, 2000. С. 273-274.

Соколов А.В. К проблеме сохранения и восстановления запасов осетровых бассейна Амура. Сб. Мат. Междунар. науч. чтений «Приморские зори – 2005», посвященные 10-летию со дня образования ТАНЭБ. Владивосток: ТАНЭБ, 2005. С. 183-187.

Соколов А.В., Сазонова Е.Н., Флейшман М.Ю. Некоторые аспекты оптимизации искусственного воспроизводства амурского осетра *Acipenser schrenckii* // Новые исследования (Биология. Экология. Образование). Вып. 5. Хабаровск: ХГПУ, 2004а. С. 25-30.

Соколов А.В., Флейшман М.Ю., Сазонова Е.Н. Влияние регуляторных пептидов на состояние печени амурского осетра (*Acipenser schrenckii*). Сб. Природные ресурсы Хабаровского края: проблемы науки и образования. Хабаровск: ХГПУ, 2004б. С. 115-119.

Соколов А.В., Флейшман М.Ю., Сазонова Е.Н. Олигопептиды с опиоидной активностью и повышение эффективности искусственного воспроизводства амурских осетровых рыб // Вестник ДВО РАН. 2007. №6. С. 116-130.

Флейшман М.Ю., Кузнецов А.В., Дейгин В.И., Тимошин С.С. Влияние аргининсодержащего μ - δ -агониста опиатных рецепторов седатина на процессы синтеза ДНК в эпителии фундального отдела желудка белых крыс // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2004. Т. 137. №3. С. 265-268.

Флейшман М.Ю., Животова Е.Ю., Лебедько О.А., Дейгин В.И., Тимошин С.С. Анализ механизмов влияния аргининсодержащего аналога дерморфина на процессы пролиферации в слизистой оболочке желудка белых крыс // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2007а. Т. 144. №9. С. 282-284.

Флейшман М.Ю., Сазонова Е.Н., Лебедько О.А., Дейгин В.И., Тимошин С.С. Влияние седатина – синтетического аналога дерморфина – на развитие мальков осетра амурского // БЭБиМ, 2007б. Т. 144. №10. С. 420-423.

Шеханова И.А., Микодина Е.В., Сторожук Н.Г., Седова М.А., Широкова Е.Н. Способ стимуляции физиологических процессов у рыб на ранних стадиях развития // Бюлл. изобрет. 1987. №4. Авт. свид. №1286138. С. 6-14.

Штейн Г.И., Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н. Изменение морфометрических параметров окрашенных серебром ядрышек гепатоцитов крыс при циррозе печени и в процессе ее реабилитации // Цитология. 1999. №7. С. 574-579.

Krychtin M.L., Svirskiy V.G. Endemic sturgeons of Amur river: kaluga, *Huso dauricus*, and Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* // Envir. Biol. of Fishes. 1997. V. 48. Pp. 231-239.

OPIOIDIC PEPTIDES AS AGENTS HEIGHTENING VIABILITY OF ARTIFICIALLY PROPAGATED AMUR STURGEONS

© 2009 y. M.Y. Fleishman¹, A.V. Sokolov², V.M. Avlasenko³, O.A. Lebedko¹, E.N. Sazonova¹, I.E. Khovansky³, S.S. Timoshin¹

1 – Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

2 – Institute of Aquatic Resources and Ecological problems, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Khabarovsk

3 – The Amur State Regional Department for reproduction of water biological resources and fisheries management (FSD «Amurbyvod»), Khabarovsk

The paper discusses the ways certain biologically active substances can be used to optimize the process of artificial propagation of the sturgeons. The effect of one shot impregnation of roe eggs in progress with opioidically active synthetic oligopeptides (sedatine and dalargine), on the somatometry of Kaluga and Amur sturgeon prolarvae, the hepatocytes' plasticity, and the free radical oxidation in the fertilized roe-eggs has been examined. The results of the experiments show that the experimental young fishes gain both in weight and length while the condition of the liver cells and the free radical oxidation system in the fertilized roe eggs improve. On the whole, the processed juvenile come more easily adjusted to unfavorable environment and are better prepared to be released to the natural environment.