

Применение опиоидных пептидов для повышения жизнестойкости молоди калуги *Huso Dauricus (Georgi)* в условиях аквакультуры

А.В. Соколов, ведущий инженер –

Институт водных и экологических проблем ДВО РАН (г. Хабаровск),

Д-р мед. наук, профессор **М.Ю. Флешман**,

Д-р мед. наук, **С. С. Тимошин** – Дальневосточный государственный медицинский университет (г. Хабаровск)

@ Falcon1980@yandex.ru; marfl@yandex.ru

Ключевые слова: калуга, искусственное воспроизводство, олигопептиды



Проведено сравнение влияния синтетических опиоидных пептидов при однократной обработке развивающейся икры и предличинок калуги *Huso dauricus (Georgi)* на выживаемость молоди в процессе выращивания на рыбоводном заводе, рост и устойчивость к острым токсическим воздействиям.



Рыбоводный цех Владимировского ОРЗ

Аквакультура – одно из важнейших направлений обеспечения продовольственной безопасности страны [2; 14]. Особую актуальность развитие отечественной аквакультуры приобретает в условиях санкционного режима и необходимости импортозамещения.

Актуальность темы определяется большой практической значимостью состояния популяции амурских осетровых рыб, и калуги *Huso dauricus (Georgi)*, в частности. Однако широкий спектр антропогенных воздействий на экосистему р. Амур диктует необходимость ее искусственного воспроизводства [5; 20]. Искусственное воспроизводство приобрело

исключительную важность для сохранения природного биоразнообразия рыб, и осетровых, в частности [6; 14; 15].

К сожалению, выживаемость молоди в процессе заводского выращивания осетровых невысока. Например, в соответствии с действующими нормативами, от выклева до достижения нормативной массы 3 г доживает в лучшем случае 30% особей калуги [16; 18]. Кроме того, выпускаемая с заводов молодь осетровых, плохо подготовлена к жизни в естественной среде [11]. Повышение жизнестойкости личинок и мальков осетровых позволило бы снизить расход производителей и нагрузку на природную популяцию, а также затраты на выращивание и отход мальков в процессе транспортировки.

Один из способов повышения жизнестойкости и выживаемости молоди в условиях аквакультуры – применение биологически активных препаратов [15]. В настоящее время используется широкий спектр соединений, таких как эпибрассинолид [4], п-аминобензойная кислота [13], трийодтиронин [1], опиоидные пептиды для повышения устойчивости молоди осетровых к неблагоприятным условиям и болезням [7; 8; 12; 16; 18; 19]. Обработка икры стерляди и бестера даларгином приводит к повышению выживаемости, увеличению массы и размеров молоди, нарастанию содержания ДНК и белка в мышцах [7; 8; 12]. Седатин оказывает позитивное влияние на развитие молоди амурского осетра [16; 17; 18].

При получении половых продуктов в полевых условиях не всегда есть возможность обработать

пептидами развивающуюся икру. Поэтому необходимо изучить эффективность обработки предличинок осетровых.

Цель настоящей работы – исследование повышения жизнестойкости и выживаемости молоди калуги путем применения опиоидных пептидов (синтетических производных лей-энкефалина и дерморфина) при разных сроках обработки.

Перед нами стояли следующие задачи:

- изучить влияние обработки пептидами на выживаемость личинок калуги в процессе выращивания;
- сравнить смертность и выживаемость молоди исследуемых групп в растворах модельных токсикантов с летальной концентрацией;
- исследовать влияние опиоидных пептидов на соматометрические показатели в различные этапы онтогенеза молоди калуги;
- сравнить эффект воздействия пептидов при разных сроках обработки.

Впервые изучено влияние обработки опиоидными пептидами (синтетические производные лей-энкефалина и дерморфина), в *разные периоды онтогенеза*, на выживаемость, рост и развитие молоди калуги. Кроме того, впервые проанализировано влияние обработки пептидами на динамику смертности молоди за период заводского выращивания. Результаты могут быть внедрены на предприятиях, занимающихся как искусственным воспроизводством, так и товарным разведением осетровых рыб. Обработка пептидами молоди калуги может использоваться при транспортировке рыб для зарыбления водоемов.

| Материалы и методы исследований |

Полевые исследования на молоди калуги проводились в 2008-2009 гг., лабораторные – в 2010-2011 годы. Половые продукты получали в полевых условиях непосредственно в месте отлова производителей (Николаевский район). После оплодотворения и обработки пептидами, икру транспортировали на Анюйский ЛРЗ (с. Найхин, Нанайский р-н) и Владимировский ОРЗ (с. Владимировка, Сидовичский р-н), где проводили доинкубацию и выращивание молоди. Обработка материала осуществлялась в Центральной научно-исследовательской лаборатории Дальневосточного государственного медицинского университета (ЦНИЛ ДВГМУ).

Оплодотворенную икру (17-18 стадии) обрабатывали растворами пептидов – синтетических производных дерморфина (пептид 1) и лей-энкефалина (пептид 2) с концентрацией 10^{-4} г/дм³ по методике, предложенной И.А. Шехановой и др. [19], Е. В. Микодиной и др. [9]. Обработку осуществляли в тазях, при постоянном перемещении в течение 1 часа. Одновременно инкубировали контрольный образец без добавления пептидов. Обработку предли-



Бассейн с мальками калуги

чинок (35-37 стадии) проводили непосредственно в бассейнах.

В процессе выращивания измеряли соматометрические показатели личинок и мальков: полную длину (TL), и массу (m), особей. Измерение длины производили бесконтактным способом по цифровым фотографиям. Для определения выживаемости и смертности молоди, регулярно производили ее подсчет по фотоснимкам с помощью программы Surfer 8.

Для оценки устойчивости к острым токсическим воздействиям использовали выдерживание в растворе модельного токсиканта ($ZnSO_4$). Концентрация (0,2 г/дм³) подобрана в ходе пилотного



Икра калуги оплодотворенная

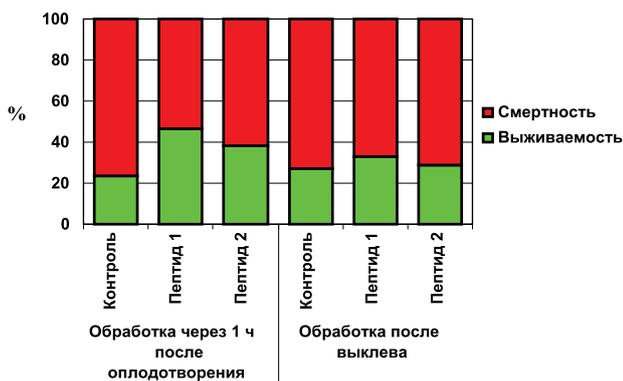


Рисунок 1. Сравнение смертности молоди калуги за период выращивания при обработке на разных стадиях онтогенеза

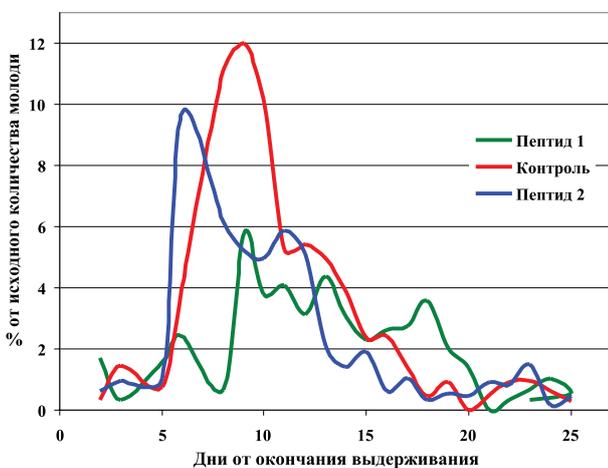


Рисунок 2. Динамика смертности молоди в процессе выращивания

эксперимента таким образом, чтобы гибель всех особей наступала не позднее 3ч. от начала опыта (для уменьшения влияния накопления в воде продуктов обмена). Растворы помещали в аквариумы емкостью 10 л, по вариантам опыта, куда подсаживали по 50 особей 31-суточной калуги. Воду непрерывно аэрировали. Через одинаковые промежутки времени (20') подсчитывали количество погибших

особей. Гибель рыб диагностировали по остановке сердца. Определяли время гибели первой особи (T_0), время гибели половины особей (T_{50}), время гибели всех особей (T_{100}) и среднее время жизни особей в растворе (T_{cp}).

Упитанность особей оценивали по методу А. В. Морозова и К. П. Дубровской (1951), который является более точным, чем коэффициенты упитанности по Фультону [10]. Зависимость массы от длины тела приводили в соответствии с уравнением:

$$m = a \cdot L^b \quad (1),$$

где m – масса тела, мг; L – полная длина тела, мм. Для этого уравнение преобразовывали:

$$\lg m = \lg a + b \cdot \lg L \quad (2),$$

а затем, по измерениям особей контрольной группы, строили график $\log m (\log L)$. По графику находили коэффициенты a и b (a – расстояние от O до пересечения с осью y ; b – тангенс угла наклона к оси x) и подставляли в уравнение (1). По нему для особей каждой группы вычисляли расчетную массу, подставляя длину тела. Затем рассчитывали относительную упитанность:

$$K = m_{\text{эмп}} / m_{\text{теор}} \quad (3),$$

где $m_{\text{эмп}}$ – эмпирическая (измеренная) масса особи, $m_{\text{теор}}$ – расчетная масса (по уравнению (1)). Величина K позволяет сравнить по упитанности подопытные группы рыб с контрольной.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Statistica 5.0. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

| Результаты и обсуждение |

В процессе выращивания (от выклева предличинок до выпуска) в контрольной группе молоди смертность достигала 76,5%, то есть превышала норматив, составляющий 70% (рис. 1). Это связано с низким качеством икры и, соответственно, пло-

Таблица 1. Сравнение длины тела (в мм) исследуемых групп молоди калуги в различные периоды жизни

Возраст, сут.	Варианты		
	Пептид 1	Контроль	Пептид 2
15	24,25±0,47	23,55±0,45	24,20±0,34
18	27,15±0,52**	25,30±0,55	26,90±0,68
21	33,00±1,01	32,70±1,14	33,45±0,78
24	40,85±1,68	37,30±1,40	39,75±1,39
27	45,65±1,04**	41,55±1,65	41,50±1,60
30	55,85±1,93	49,90±2,27	55,10±1,99
33	59,80±2,02	56,20±2,59	60,05±2,04
39	63,20±1,68*	57,200±2,53	62,10±2,81

Примечания: ** - различия достоверны при $p < 0,01$, * - при $p < 0,05$



Инкубационный аппарат

хой устойчивостью молоди к неоптимальным условиям выращивания [3].

В то же время, смертность особей, обработанных пептидами на стадии оплодотворенной икры (17-18 стадии), была значительно ниже, чем в контроле, и составила соответственно 53,5 и 62,0%. Эти показатели смертности ниже нормативных. Очевидно, исследуемые пептиды активируют в организме рыб механизмы неспецифической устойчивости к различным неблагоприятным факторам.

Смертность в группах, обработанных пептидами на стадии предличинки (35-37 стадии), также была несколько ниже контроля и составила соот-

ветственно 67,2 и 71,1%. Однако эффект пептидов менее значителен, чем при обработке пептидами оплодотворенной икры.

В течение периода выращивания на заводе, гибель личинок и мальков не была равномерной. Рассмотрим сравнение динамики гибели молоди калуги, обработанной пептидами на стадии оплодотворенной яйцеклетки, с интактной молодью (рис. 2).

Кривые, описывающие динамику гибели молоди, во всех трех вариантах сходны, кроме участков с 5 по 12 день. Этот промежуток времени приблизительно соответствует переходу молоди калуги на активное питание. В контрольной группе на этот

Таблица 2. Сравнение массы тела (в мг) исследуемых групп молоди калуги в различные периоды жизни

Возраст, сут.	Варианты		
	Пептид 1	Контроль	Пептид 2
15	64,50±4,38**	50,50±3,80	63,50±3,50**
18	93,00±5,53**	71,50±4,77	87,00±7,37
21	211,00±16,49*	188,50±19,48	225,50±12,92*
24	415,00±40,39**	306,5±36,70	372,00±32,83
27	532,00±33,16**	402,00±52,14	430,00±46,85
30	952,50±83,48	731,00±94,34	967,50±90,21*
33	1083,50±81,79	900,00±105,66	1154,00±100,44
39	1519,50±99,19**	1075,00±136,84	1512,50±171,33*

Примечания: ** - различия достоверны при $p < 0,01$, * - при $p < 0,05$



Личинки калуги

период наблюдается наибольший отход. «Пик» приходится на 9 день и составляет 12% от исходного количества предличинки. Это является естественным процессом и отражено в биотехнических нормативах. Переход на активное питание – один из «критических периодов» в жизни рыб [3]. Однако в группе «пептид 1» процент гибели молоди в указанный период существенно меньше и не превышает 6% в день. Это свидетельствует об «адаптогенном» влиянии пептида 1, позволяющем большей доле молоди перейти на активное питание. Вероятно,

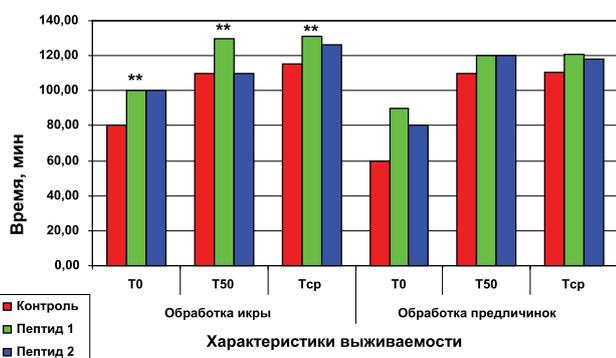


Рисунок 3. Динамика гибели молоди калуги в растворе $ZnSO_4$
Примечание. Время гибели, мин: Т0 – первой особи, мин; Т50 – половины особей; Тср – среднее. ** - различия достоверны при $p < 0,01$.

пептид 1 активизирует в организме процессы, снижающие смертность в «критические периоды».

В группе, обработанной пептидом 2, процент гибели молоди в указанный период также существенно меньше, чем в контроле, однако выше, чем в группе «пептид 1». Это свидетельствует об «адаптогенном» влиянии пептида 2, позволяющем большей доле молоди перейти на активное питание. Вероятно, пептид 2 также активизирует в организме процессы, снижающие смертность в «критические периоды». Однако его эффект менее выражен, чем у пептида 1, что доказывается меньшим снижением смертности.

Гибель молоди калуги обеих экспериментальных групп, обработанных пептидами на стадии оплодотворенной икры, в исследуемом растворе $ZnSO_4$ начинается на 20 мин. позже, чем у особей контрольной группы (рис. 3). В обработанных группах 50% и 100% рыб погибает также несколько позднее, чем в контроле.

Среднее время выживания особей, обработанных пептидом 1, превышает этот показатель на 15 мин. (это различие статистически достоверно), а у особей, обработанных пептидом 2 – не менее чем на 10 минут. Следовательно, молодь, обработанная растворами изученных пептидов, в воде, загрязненной летальными дозами токсикантов, выживает дольше, чем необработанная. Это свидетельствует о повышении устойчивости организма к острым токсическим воздействиям.

Гибель молоди группы, обработанной пептидом 1 на стадии выклева предличинки, начинается на 30 мин. позже, чем у особей контрольной группы, а в группе «пептид 2» – на 20 мин. позже. В обработанных группах 50% рыб погибает также несколько позднее, чем в контроле. Среднее время выживания особей, обработанных пептидом 1, превышает этот показатель на 10 мин., а у особей, обработанных пептидом 2 – не менее чем на 8 минут. Таким образом, эффект от обработки изученными веществами на стадии предличинки значительно менее выражен, чем на стадии оплодотворенной яйцеклетки.

Измерение соматометрических показателей личинок и мальков калуги проводили в течение 39 сут. с момента выклева и до выпуска в естественные условия. За время наблюдения негативных отклонений соматометрических показателей у подопытных особей не наблюдалось. Более того, у них имеются свидетельства ускоренного роста (табл. 1, 2).

Длина тела молоди калуги, полученной из икры, обработанной пептидом 1, больше, чем у молоди контрольной группы. В некоторых случаях это различие оказалось статистически достоверным (табл. 1). Масса молоди калуги из группы «пептид 1» в большинстве случаев достоверно больше, чем масса молоди контрольной группы (табл. 2).

У молоди калуги, полученной из икры, обработанной пептидом 2, средняя длина тела не имеет статистически достоверных отличий от контрольной группы. Однако средняя масса особей из груп-

Таблица 3. Сравнение относительной упитанности (по Морозову и Дубровской) исследуемых групп молоди калуги в различные периоды жизни

Возраст, сут.	Варианты		
	Пептид 1	Контроль	Пептид 2
15	0,92±0,02	0,91±0,02	0,91±0,02
18	0,85±0,02	0,85±0,02	0,83±0,01
21	1,00±0,05	0,89±0,03	1,00±0,03
24	1,34±0,14	1,12±0,03	1,23±0,05
30	1,22±0,18	1,29±0,04	1,18±0,05
39	1,21±0,13	1,06±0,02	1,04±0,03



Калужонок

пы «пептид 2» в 1 случае из 8 достоверно отличается от контроля, а в 3 случаях демонстрирует статистическую тенденцию к появлению различий от группы «контроль».

По результатам массовых измерений разновозрастной молоди в группе «контроль», был построен график $\lg m$ ($\lg L$) (рис. 4). По графику нашли, что функция зависимости массы молоди калуги от длины тела имеет следующий вид: $m = 0.00434 \cdot L^3$ (4).

С помощью этой зависимости вычислили относительную упитанность молоди калуги в различных группах изученных рыб (табл. 3). Несмотря на наблюдаемое увеличение длины и массы тела, статистически достоверных различий по относительной упитанности между исследуемыми группами не зарегистрировано. Это показывает, что накопление массы тела происходит в пределах физиологической нормы и даже при некотором ускорении роста у особей подопытных групп, отклонения в сторону алиментарных нарушений (ожирения или дистрофии) отсутствуют.

Увеличение массы у мальков одного возраста оценивается как один из показателей их лучшей адаптированности к условиям выращивания и потенциально лучшей жизнестойкости [1]. Аналогичные результаты получены нами при изучении влияния опиоидных пептидов на рост и развитие молоди амурского осетра [16].

| Заключение |

Полученные результаты свидетельствуют о повышении жизнестойкости и снижении смертности

молоди калуги в период заводского выращивания (45 сут.) под влиянием однократной обработки пептидами опиоидного ряда.

Смертность молоди калуги в группе особей, обработанных на стадии оплодотворенной яйцеклетки синтетическим производным дерморфина (пептид 1), была на 23% ниже, чем в контроле, и на 8,5% – чем у особей группы «пептид 2». В обеих группах, обработанных пептидами, показатели смертности были ниже, а в контроле – выше нормативных показателей. Смертность молоди, обработанной пептидами на стадии предличинки, также была ниже контроля, но эффект был менее выражен.

Гибель молоди в течение периода выращивания происходит неравномерно. Снижение смертности под влиянием пептида 1 и пептида 2 наиболее выражено в «критические периоды» онтогенеза, в частности, при переходе на активное питание.

Молодь, обработанная растворами пептидов на стадии оплодотворенной яйцеклетки, в воде, загрязненной летальными дозами модельного токсиканта, выживает достоверно дольше, чем необработанная. Это свидетельствует о повышении устойчивости организма к острым токсическим воздействиям. Достоверного повышения устойчивости к токсиканту молоди, обработанной на стадии предличинки, не выявлено (хотя некоторая тенденция имеется).

Обработка пептидами привела к некоторому ускорению соматического роста по сравнению с особями

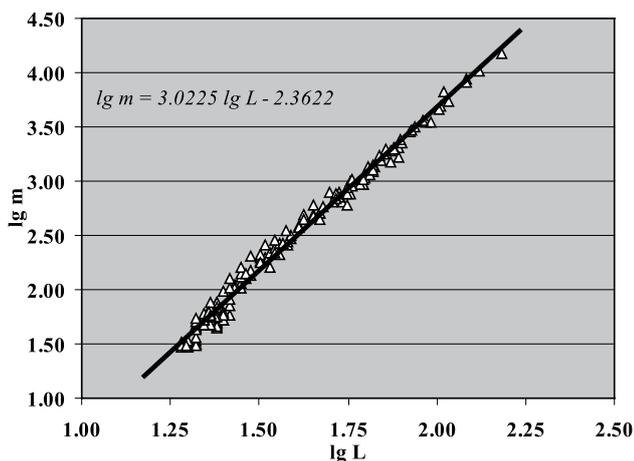


Рисунок 4. График зависимости $\lg m$ ($\lg L$) для группы «контроль»

контрольной группы, что проявлялось в увеличении у рыб подопытных групп длины и массы тела. Однако это не привело к статистически достоверному увеличению относительной упитанности, что свидетельствует об отсутствии алиментарных нарушений. Данный факт можно интерпретировать как косвенное свидетельство повышения устойчивости обработанной молоди к неоптимальным условиям выращивания.

Обработка на стадии оплодотворенной яйцеклетки (17-18 стадии) более эффективна, чем на стадии выклева предличинки (35-37 стадии), так как повышение устойчивости к неблагоприятным факторам (включая токсические воздействия) более выражено. Пептид 1 действует значительно эффективнее, чем пептид 2.

Результаты исследований позволяют рекомендовать применение изученных пептидов в искусственном воспроизводстве и товарном разведении осетровых и других хозяйственно ценных видов рыб. Кроме того, обработку пептидами можно производить для транспортировки мальков рыб. Повышение жизнестойкости, снижение смертности и ускорение достижения молодью нормативной массы позволяют снизить издержки для рыболовных предприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко Н.Е. Физиологические механизмы адаптивных функций в раннем онтогенезе русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt. Автореферат диссертации на соискание ученой степе-

ни доктора биологических наук. СПб: ГосНИОРХ, 2008. 32 с.
 2. Бочаров Л. Н. Особенности и проблемы развития отечественной аквакультуры на Дальнем Востоке // Рыбное хозяйство. 2016. №1. с. 70-73.
 3. Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.И. Развитие осетровых рыб. М.: Наука, 1981. 224 с.
 4. Егоров М.А., Витвицкая Л.В., Никоноров С.И., Теплый Д.Л. Некоторые итоги и перспективы исследования феноменологии и физиологических механизмов действия эпибрасинолида на раннее развитие осетровых // Осетровые на рубеже 21 века. Астрахань: КаспНИРХ, 2000. С. 237-238.
 5. Крыттин М.Л., Горбач Э.И. Осетровые рыбы Дальнего Востока // Экономическая жизнь Дальнего Востока. 1994. № 1(3). С. 86-91.
 6. Лабенец А. В., Бубунец Э. В., Новосадова А. В. Репродуктивные показатели самок русского осетра и особенности продуцируемой ими икры в условиях культивирования // Рыбное хозяйство. 2013, №1, с. 83-89.
 7. 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.
 8. Микодина Е.В. Физиолого-биохимические основы регуляции функций у рыб пептидами энкефалинового ряда. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. М.: ВНИРО, 1999. 49 с.
 9. Микодина Е.В., Седова М.А., Глубоков А.И. Методические указания по применению даларгина для повышения жизнестойкости икры, предличинок, молоди рыб и акселерации их роста. М.: ВНИРО, 1987. 13с.
 10. Морозов А. В., Дубровская К. П. О коэффициенте упитанности рыб // Зоологический журнал. 1951. №3. – С. 267-273.
 11. Никоноров С.И., Витвицкая Л.В. Эколого-генетические проблемы воспроизводства осетровых и лососевых рыб. М.: Наука, 1993. 254 с.
 12. Седова М.А. Использование даларгина для повышения жизнестойкости икры и личинок рыб при искусственном воспроизводстве // Эколого-физиологические и токсикологические аспекты и методы рыбохозяйственных исследований. М.: ВНИРО, 1990. С. 143-151.
 13. Сергиенко Л.Л., Кубышкин В.И. Применение пара-аминобензойной кислоты в осетроводстве // Осетровые на рубеже 21 века. Астрахань: КаспНИРХ, 2000. С. 273-274.
 14. Слапогузова З. В., Сытова М. В., Бурлаченко И. В. Аквакультура – важнейшее направление обеспечения продовольственной безопасности страны // Рыбное хозяйство. 2014. №5. с. 3-8
 15. Соколов А.В. К проблеме сохранения и восстановления запасов осетровых бассейна Амура // Материалы международных научных чтений «Приморские зори – 2005», посвященные 10-летию со дня образования ТАНЭБ. Владивосток: ТАНЭБ, 2005. С. 183-187.
 16. Соколов А.В., Флейшман М.Ю., Сазонова Е.Н. Олигопептиды с опиоидной активностью и повышение эффективности искусственного воспроизводства амурских осетровых рыб // Вестник ДВО РАН. 2007а. № 6. С. 116-130.
 17. 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 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2007.Т. 144 № 10. С. 420-423.
 18. Флейшман М. Ю., Соколов А. В., Авласенко В. М., Лебедько О. А., Сазонова Е. Н., Хованский И. Е., Тимошин С. С. Опыт применения опиоидных пептидов для повышения эффективности искусственного воспроизводства амурских осетровых рыб // Вопросы рыболовства. 2009. т. 10, №3(39), с. 564-574.
 19. 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 // Бюллетень изобретений. 1987. №4. Авт. свид. №1286138. С. 6-14.
 20. 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. P. 231-239.



OPIOID PEPTIDES AS A WAY TO INCREASE VITALITY OF YOUNG KALUGA STURGEON *HUSO DAURICUS* (GEORGI) IN FRAMES OF AQUACULTURE

Sokolov A.V. – Institute of Water and Environmental Problems, Falcon1980@yandex.ru
 Fleishman M.Yu., Doctor of Sciences, [Timoshin S.S.](mailto:Timoshin.S.S.), Doctor of Sciences, Professor – Far Eastern State Medical University, marfl@yandex.ru

A comparison of synthetic opioid peptides influence under a single treatment of developing eggs and prelarvae of Kaluga sturgeon *Huso dauricus* (Georgi) on survivability of juveniles during growth in hatcheries and resistance to the acute toxic effects was carried on.

Keywords: Kaluga sturgeon, artificial propagation, oligopeptides