

A-32275
Государственный комитет по рыболовству Российской Федерации
Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии

На правах рукописи
УДК 597.08.591.1.6

Микодина Екатерина Викторовна

**Физиолого-биохимические основы регуляции функций у
рыб пептидами энкефалинового ряда**

03.00.10 – ихтиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва -1999

Ротбы - Биохимия

Работа выполнена в лаборатории физиологии и раннего онтогенеза
промысловых рыб Всероссийского научно-исследовательского института
рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Л.Б.Кляшторин

доктор биологических наук, профессор

Н.Н.Немова

доктор биологических наук, профессор

М.И.Шатуновский

Ведущее учреждение: Всероссийский НИИ пресноводного рыбного
хозяйства.

Защита состоится 24 декабря 1999 г. в _____ часов на заседании
Специализированного Ученого Совета Д 117.01.02 по защите диссертаций
на соискание ученой степени доктора биологических наук при
Всероссийском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и
океанографии (ВНИРО) по адресу: 107140, г. Москва, ул. Верхняя
Красносельская, д. 17.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 107140, г. Москва,
ул. Верхняя Красносельская, д. 17, ВНИРО, ученому секретарю
Специализированного совета Д 117.01.02, факс (095) 264-91-87.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИРО
107140, г. Москва, ул. Верхняя Красносельская, д.17.

Автореферат разослан « _____ » _____ 1999 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

 Т.Б.Агафонова

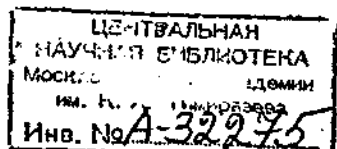
Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы. Как известно, регуляция жизнедеятельности рыб осуществляется нейроэндокринным путем. На ранних стадиях онтогенеза, когда нервная и эндокринная системы еще не сформированы, развитие и метаболизм рыб регулируют нейротрансмиттеры (ацетилхолин, катехоламины, индоллилакиламины), которые с появлением этих систем не исключаются из процесса регуляции, а начинают выполнять в нервной системе другие функции, в частности нейромедиаторов.

В 1973 г. был открыт новый класс биологических регуляторов – опиоидные пептиды, которые у беспозвоночных и позвоночных животных, в том числе и человека, вовлечены в нейроэндокринную регуляцию различных физиологических процессов: размножения, неспецифической адаптации, осморегуляции, регенерации, обучения, обратной связи и других. Изучение особенностей регуляции функций у высших позвоночных животных и человека различными нейропептидами привело к разработке методов их практического использования и широкому внедрению в медицину и сельское хозяйство.

Исследование роли этих биологически активных веществ в регуляции жизнедеятельности рыб начато в 80-х годах, однако, некоторые из них уже используются в рыбном хозяйстве. Например, синтетические аналоги рилизинг-факторов гонадотропных гормонов нашли широкое применение в аквакультуре в качестве индукторов нереста разных видов рыб.

Принципы регуляторного действия опиоидных пептидов у рыб исследованы крайне мало, однако данные о наличии рецепторов к ним в икре и зародышах рыб свидетельствуют об участии эндогенных опиатов в регуляции процессов их жизнедеятельности с самых ранних стадий развития, что ставит их в ряд регуляторов раннего онтогенеза наряду с нейротрансмиттерами. Таким образом, закономерности регуляции функций у рыб с участием эндогенных опиоидных пептидов и, особенно, - при экзогенном введении их стабильных синтетических аналогов, проблема новая и весьма актуальная как с теоретических позиций, так и в плане прикладного использования.



Цель исследования: изучить биологическую активность опиоидных пептидов и их влияние на регуляцию метаболизма у рыб.

Для ее достижения поставлены следующие задачи: 1) оценить биологическую активность опиоидных пептидов на примере синтетических аналогов лейцин-энкефалина у рыб на уровне организма и изучить связь их структурной модификации с биологической активностью; 2) исследовать способ взаимодействия пептидов энкефалинового ряда с клетками-мишенями у рыб, возможности их проникновения в мишень и субклеточную локализацию; 3) изучить влияние аналогов лейцин-энкефалина на морфофизиологические показатели рыб, включая процесс роста, гематологические показатели, развитие и строение половых желез; 4) исследовать влияние пептидов энкефалинового ряда на биохимический состав тела рыб, включая общий биохимический состав, содержание и биосинтез нуклеиновых кислот и белка, активность нуклеаз; 5) оценить влияние опиоидных пептидов на хромосомный аппарат рыб и наследуемость возникающих при одноразовом воздействии энкефалинов изменений; 6) исследовать механизм действия опиоидных пептидов на регуляцию метаболизма в организме рыб; 7) разработать методы применения пептидов энкефалинового ряда в аквакультуре.

Научная новизна. Впервые исследована биологическая активность и регуляторная роль пептидов энкефалинового ряда (на примере лейцин-энкефалина и его 9 синтетических аналогов) в онтогенезе низших позвоночных на примере рыб разных экологических и систематических групп. Выявлено, что среди аналогов энкефалина наибольшей биологической активностью у рыб обладают пептиды с модификацией аминокислот глицина во 2-м положении на Д-аланин и фенилаланина в 4-м положении на его метилированную или Д-форму. Впервые показано, что регуляция метаболизма рыб осуществляется путем воздействия энкефалинов на их геном, что приводит к длительным и наследуемым изменениям обмена веществ. Установлено, что влияние аналогов лей-энкефалина на метаболизм рыб выражается в модуляции их морфофизиологических и биохимических процессов, приводящей к изменению выживаемости и темпа роста.

а направление эффекта зависит от систематического положения, экологических и морфофизиологических особенностей рыб.

Автором показано, что опиоидные пептиды видо- и полостецифически влияют на гонадо- и гаметогенез рыб. Впервые исследовано влияние даларгина на структуру генома, выражающееся как в увеличении частоты определенных типов хромосомных aberrаций, так и доли клеток, несущих более одного нарушения в строении хромосом, что приводит к его дестабилизации, сопровождающейся изменением функционирования информационных макромолекул. Установлено, что воздействие даларгина на геном вызывает увеличение интенсивности синтеза нуклеиновых кислот, сопровождающееся повышением содержания не только ДНК и РНК, но и белка. Показано, что изменение интенсивности синтеза нуклеиновых кислот - признак не только длительно сохраняющийся у организма, подвергнутого воздействию даларгина, но передающийся репродуктивным клеткам и сохраняющийся в потомстве рыб первого поколения с патроклинным характером наследования. Обоснована гипотеза о механизме действия энкефалинов как регуляторов метаболизма у рыб, основанная на прямом взаимодействии пептида с молекулой ДНК.

Практическая значимость. На основании результатов настоящего исследования разработаны и опубликованы «Методические указания по применению даларгина для повышения жизнестойкости икры, личинок, молоди рыб и акселерации их роста». Осуществлено внедрение этой методики на 15 рыбоводных хозяйствах. Использование регуляторных пептидов в рыбоводстве является особенно перспективным в замкнутых системах, поскольку позволяет исключить несанкционированное попадание в естественные водоемы рыб с измененными свойствами.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации были представлены на коллоквиумах лаборатории физиологии и раннего онтогенеза промысловых рыб (1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1989), отчетных сессиях Ученого Совета ВНИРО (1985, 1987, 1989), на 1-м Всесоюзном симпозиуме по экологической биохимии рыб (Ярославль, 1987), Всероссийском симпозиуме

“Возрастная и экологическая физиология рыб” (Борок, 1998), на всесоюзных конференциях: IV Всесоюзной конференции по раннему онтогенезу рыб (Мурманск, 1988), VII Всесоюзной конференции “Экологическая физиология и биохимия рыб” (Ярославль, 1989), 11 Всесоюзной конференции по биологической роли микроэлементов и их применению в сельском хозяйстве и медицине (Самарканд, 1990), всероссийской VIII научной конференции по экологической физиологии и биохимии рыб (Петрозаводск, 1992), I-ом Конгрессе ихтиологов России: (Астрахань, 1997), на VI международной научной конференции “Физиология, биология и паразитология промысловых рыб (Gustrow, 1986), на международных конференциях: “Разведение лососевых рыб и сегов” (Mariánské Lázně, 1989), “Биологически активные пептиды II” (Praha, 1990), “Размножение рыб -92” (Vodňany, 1992) и симпозиумах: “FAO/EIFAC -90” (Praha, 1990) и “Осетровые рыбы” (Москва-Кострома, 1993).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 48 работ.

Структура и объем диссертации. Рукопись диссертации состоит из введения, 13 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 323 страницах машинописного текста, содержит 46 таблиц, 36 рисунков. В списке литературы 530 источников, в том числе - 392 отечественных и 138 иностранных.

Глава 1. Энкефалины как регуляторы физиологических процессов у животных.

В мировой аквакультуре для управления процессами жизнедеятельности у рыб традиционно используется широкий спектр биологически активных веществ и факторов, а внедрение интенсивных биотехнологий на современном этапе развития рыбоводства определяет перспективность активного поиска новых эффективных биорегуляторов. К ним можно отнести нейропептиды и, в частности, энкефалины, биологической роли которых в организме рыб и посвящено настоящее исследование.

В главе приводятся данные литературы о происхождении и химической природе нейропептидов как регуляторов функций животных. Показано, что они образуются в нейросекреторной системе при деградации крупных пептидных

молекул, состоят из относительно небольшого количества аминокислотных остатков и обладают специфической биологической активностью.

Опиоидные пептиды — энкефалины (лейцин-энкефалин и метионин-энкефалин) открыты относительно недавно (Pert and Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973; Goldstein, 1973; Simantov, Snyder, 1976). Они образуются из нескольких белков-предшественников: β -липотропина (Bhargava, 1981), β -эндорфина, динарфина, препроэнкефалина «А», проэнкефалина «В», проопиомеланокортина. В процессинге предшественников принимают участие несколько ферментов: ангиотензин-конвертирующий фермент, дипептидилкарбоксипептидаза (Benuck et al., 1981), катион-чувствительная нейтральная эндопептидаза (Дмитриев, 1982). Основным инициирующим звеном энкефалиногенеза считают систему внутриклеточного протеолиза, в первую очередь кислых катепсина (Петровский, 1991; Эрдос и др., 1981), близкими по характеру действия к катепсину В и трипсину (Ашмарин, Каразеева, 1996).

Энкефалины в гомогенатах тканей или плазме крови высших позвоночных весьма нестабильны и период полужизни молекулы лей-энкефалина равен 2 мин (Чазов и др., 1984). Естественная деградация эндогенных энкефалинов происходит с обоих концов молекулы (Исакова и др., 1985; Исакова и др., 1986). Энкефалиногенез и процесс распада энкефалинов находятся в динамическом равновесии. При этом, протеолитический распад нейропептидов часто является не простым актом уничтожения регулятора, а реакцией образования нового биологически активного пептидного соединения (Ашмарин, Каразеева, 1996).

Энкефалины содержатся практически во всех отделах центральной и периферической нервной системы: в коре больших полушарий мозга, полосатом теле, бледном шаре, аккумбентном и миндалевидном ядрах, преоптической области, гипоталамусе, гипофизе, мозжечке, в нейронах нервных сплетений, синаптических мембранах нервных клеток и нервных волокнах периферических органов, спинномозговой жидкости. Помимо нервной системы, энкефалины определены в нейросекреторных клетках различных отделов желудочно-

кишечного тракта млекопитающих, в том числе и человека, а также выделены из клеток других органов и тканей: крови, плаценты, почек, надпочечников и других. Столь широкое распространение в организме этих регуляторных пептидов явилось свидетельством их исключительной роли в регуляции метаболизма и гомеостаза и привело к выделению самостоятельной пептидэргической регуляторной системы (Мик, Бохан, 1981; Янг и др., 1981; Якубке, Ешкайт, 1985).

Действие большинства опиоидных пептидов реализуется через специфические участки связывания – рецепторы (Kosterlitz, Hughes, 1978). Они обнаружены на внешней и внутренней поверхности клеток практически всех органов и тканей животных (Булаев, 1982; Бахарев, 1985), а также в оволировавших неоплодотворенных яйцеклетках и развивающихся эмбрионах рыб (Калужный и др. 1987; Яковлева и др., 1989). Выделяют четыре типа таких рецепторов, специфически связывающих опиоидные пептиды: мю- (μ), каппа- (κ), сигма (σ) и дельта- (δ) (Martin et al., 1976; Бахарев, 1985). Мет-энкефалин наиболее интенсивно связывается с дельта- и каппа- рецепторами (Булаев, 1982; Дубинин, Захарова, 1995), лей-энкефалины - с дельта (Шитин, 1987).

Данные литературы свидетельствуют о том, что функции энкефалинов в организме человека и животных крайне разнообразны. Большинство из опиоидных пептидов обладают более или менее выраженным миметическим (галлюциногенным) и антиноцицептивным (обезболивающим) действием. Кроме этого, они влияют на функциональную активность мозга: снижение или усиление эмоционального поведения, индукцию чувства «удовлетворения», «вознаграждения». Опиоиды служат химическими посредниками между иммунной и нервной системами, регулируя иммунитет (Ашмарин, Каразеева, 1996). Энкефалины являются мощными активаторами разновидности NK-лимфоцитов, убивающих раковые клетки. Синтетические аналоги лей-энкефалинов модулируют пролиферативный ответ лимфоцитов (Чазов, Смирнов и др., 1984). Опиоиды принимают участие в регуляции ряда эндокринных функций, биосинтеза и выделения гормонов, в частности пролактина (Голиков и др., 1985), термо- и ос-

морегуляции, активности ряда ферментов (Ярыгин и др., 1987; Виноградов и др., 1987). Накоплено много фактов, указывающих на роль эндогенных опиоидоподобных пептидов в регуляции пищеварительных функций (Полонский, 1987). Установлено влияние опиоидных нейропептидов на стрессорные реакции (Варганян и др., 1984; Аргинтаев, 1985; Бахарев, 1985), артериальное давление, память, выработку условных рефлексов (Ашмарин, 1984; Витвицкая и др., 1988). Опиаты влияют на процессы регенерации (Ильинский, Спевак, Соловьева и др., 1985; Ильинский, Спевак, Шехтер, 1987; Тимошин и др., 1987). По данным О.Б.Ильинского и соавторов (Ilynsky et al., 1987), энкефалины оказывают стимулирующее влияние на рост нервной ткани в культуре, пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников, а также — на процессы деления клеток (Тимошин, Жданова, 1987). Энкефалины, обладая широким спектром регуляторного влияния на метаболизм в целом, участвуют в поддержании в организме гомеостаза (Ведерникова, Майский, 1981; Вальдман, 1982).

В настоящее время существует большое количество синтетических аналогов энкефалинов. При создании синтетических аналогов природную структуру энкефалинов химически модифицируют для получения соединений со свойствами, аналогичными или превосходящими таковые морфина. Биологическая активность аналога зависит от места и характера химической модификации его структуры (Гайгер, 1981).

Одним из первых отечественных синтетических аналогов лей-энкефалина, является даларгин, полученный в лаборатории синтеза пептидов ВКНЦ АМН России (СССР) под руководством д.х.н. профессора М.И.Титова. Даларгин, как синтетический аналог эндогенного опиоидного пептида лей-энкефалина, обладает всеми присущими последнему свойствами, например анальгетическим (Коробов, 1985), иммунорегуляторным (Бейко, Васильченко, 1985), Виноградов и др., 1984), регенеративным (Шейман и др., 1985, Виноградов и др., 1987; Шитин, 1987; Шехтер и др., 1988), антистрессорным (Лишманов и др., 1985), гипотензивным (Чазов и др., 1983), влияет на уровень АКТГ, кортизола, гормонов гипотизарно-тиреоидного комплекса в крови и содержание циклического АМФ

в тканях надпочечников и тимуса. Это определяется взаимодействием даларгина, как и базового пептида, с дельта-рецепторами, хотя даларгин обладает также сродством к рецепторам мю-типа (Калужный, 1987; Шитин, 1987). Существенно, что он отличается большей устойчивостью к деградации (Исакова и др., 1986) и более высокой биологической активностью (Смагин и др., 1984; Виноградов и др., 1984; Бейко, Васильченко, 1985). Даларгин применяется в клинической практике при лечении различных заболеваний (Чазов и др., 1983; Смагин и др., 1984; Чазов и др., 1984; Лишманов и др., 1985; Виноградов и др., 1987; Левина и др., 1987; Яснецов и др., 1987)

Анализ приведенных выше литературных данных свидетельствует о том, что в животном царстве существует система эндогенных опиоидных пептидов и опиатэргические механизмы регуляции функционирования разнообразных органов и систем, осуществляемые через специфические рецепторы. Диапазон действующих концентраций опиоидных пептидов, их модулирующее действие на физиологические процессы, ряд кинетических особенностей и характер дозовых зависимостей позволяет относить эти биологически активные регуляторы к группе веществ, на которых может распространяться теория действия сверхмалых доз (СМД) биологически активных стимуляторов (Крутова, 1989; Бурлакова, Конрадов, Худяков, 1990; Сазанов, Зайцев, 1992). Однако, в целом ряде случаев, воздействие СМД опиоидных пептидов приводят к возникновению таких эффектов, которые требуют иного объяснения механизма их действия.

Современные представления о регуляторных пептидах животных сводятся в первую очередь к констатации общности пептидэргического материала у животных различных таксономических групп (Ашмарин, 1986, 1988; Карамян, Соллертинская, 1964, 1987; Le Roith, Roith, 1984; Nassel, 1993;) и свидетельствуют о том, что регуляторные пептиды являются наиболее древними регуляторами их функций и метаболизма. Однако, основные закономерности влияния пептидов на физиологические и обменные процессы, в основном, исследованы у высших позвоночных. Вместе с тем, не все регуляторные пептиды высших

позвоночных обнаружены у животных более низких уровней организации (Ашмарин, 1988). Однако, структурный и функциональный параллелизм между животными низших и высших таксонов, прослеживающийся от молекулярного до организменного уровней организации, создает предпосылки и открывает возможности изучения регуляторной роли энкефалинов у животных разных уровней организации. Исследования физиолого-биохимических закономерностей опияэргической регуляции у таких представителей низших позвоночных, как рыбы, важны не только в теоретическом: сравнительно-эволюционном, экологическом, физиологическом, эмбриологическом, биохимическом аспектах, но и в прикладном плане.

Глава 2. Материал и методы.

Основные экспериментальные исследования по теме диссертации выполнены с 1983 по 1999 годы во ВНИРО.

Объектами исследования послужили 8 видов пресноводных и морских рыб: стерлядь *Acipenser ruthenus* и ее гибрид с белугой - бестер, радужная форель *Oncorhynchus mykiss*, балтийский лосось *Salmo salar*, сима *Oncorhynchus masu*, карп *Cyprinus carpio* и его межпородные гибриды, африканский сомик (клариас) *Clarias gariepinus*, полосатый окунь *Morone saxatilis*, спарус или дорада *Sparus auratus*.

Изучали влияние на рыб 10 экзогенных малых регуляторных пептидов, в том числе лейцин-энкефалина (фирма "Сигма") и его 9 дериватов (Табл.1), синтезированных в лаборатории синтеза пептидов Института экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН России (Москва), и в лаборатории синтеза пептидов Института органической и биологической химии Чешской академии наук (Прага). Эмбриологические исследования на живой развивающейся икре рыб и определение стадий развития проводили по общепринятым в ихтиологии методикам (Крыжановский, 1949; Соин, 1963; Игнатьева, 1975; Детлаф, Детлаф, 1960; Черняев, 1968, 1982). Ультраструктуру яйцевых оболочек икры исследовали методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (Микодина 1979, 1987). Гаметогенез рыб изучали общепринятыми гистологическими

методами (Роскин, 1949). Хромосомные aberrации анализировали цитологическим методом при светооптическом анализе метафазных пластинок, получен-

Таблица 1. Аминокислотные последовательности базового пептида лей-энкефалина и его структурных аналогов, использованных в настоящем исследовании.

Название пептида	Аминокислотная последовательность
1. Лейцин-энкефалин	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH
2. (D-Ala) ² , (D-Arg) ⁶ -лей-энкефалин	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-D-Arg
3. Даларгин	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg
Дериваты даларгина	
4. D-Tle ³	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Tle-Arg
5. L-Tle ³	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-L-Tle-Arg
6. D-Neo ⁵	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Neo-Arg
7. L-Neo ⁵	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-L-Neo-Arg
8. MePhe ⁴	Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Leu-Arg
9. D-Phe ⁴	Tyr-D-Ala-Gly-D-Phe-Leu-Arg
10. D-MePhe ⁴	Tyr-D-Ala-Gly-D-MePhe-Leu-Arg

ных после прижизненных колхициновых инъекций (McPheil et al., 1966; Rivling, 1985). Гематологические показатели оценивали по принятым в ихтиологических исследованиях критериям (Справочник..., 1975; Головина, 1975; Волюнкин, 1979; Лиманский и др., 1984). Общий биохимический состав тела рыб изучали по методу Фолча (Folch et al., 1957) в модификации Лапина и Черновой (1976). Содержание нуклеиновых кислот определяли по методу Шмидта-Таннгаузера в модификациях Севастьяновой и др. (1970, 1975) и Филиппович и др. (1982), белка - по методу Лоури (Практикум..., 1979; Мешкова, Северин, 1979; Lowry et al., 1951). Определение включения меченых предшественников (³H-уридина, ³H-тимидина или ³H-глицина) в РНК, ДНК и белок, а также - нуклеазной активности, проводили в соответствии с методами биохимии и молекулярной биологии, используемыми в биологии развития (Гаузе, 1974). Взаимодействия даларгина с развивающимися икринками радужной форели исследовали иммунологически по локализации даларгин-подобной иммунореактивности в их субклеточных фракциях, электронномикроскопически с использовани-

ем иммунофлуоресцентных меток, а также радиоизотопным методам с использованием меченого ^{32}J -даларгина.

Производственную эффективность применения исследуемых регуляторных пептидов оценивали по рыбопродукционным показателям на радужной форели, карпе, севрюге, бестере в 15 рыбоводных хозяйствах.

Результаты исследований обработаны статистически (Плохинский, 1970). Объем исследованного материала представлен в таблице 2.

Таблица 2. Объем исследованного материала.

Исследования.	Число видов	Количество	
		Экспериментов	Определений
Выживаемости, роста	10	960	12480
Биохимические	3	27	6624
Гематологические	2	9	625
Гистологические	2	12	1547
Кариологические	1	6	357
Иммунологические, иммунофлуоресцентные, Радиоизотопные	1	428	10264
Биологический анализ	10	960	288000
Производственные испытания	4	60	540

Автор выражает свою искреннюю благодарность всем коллегам, принявшим участие в организации и проведении исследований, положенных в основу настоящей диссертации: сотрудникам ВНИРО д.б.н. И.А.Шехановой, к.б.н.: Н.Г.Сторожук, М.А.Седовой, А.И.Глубокову, В.А.Арефьеву, В.А.Наволоцкому, В.Н.Широковой, к.б.н. Ю.Л.Волынкину, а также коллективам научных учреждений, принявшим участие в совместных исследованиях: лаборатории синтеза пептидов ВКНЦ РАМН, лаборатории экспериментальной ихтиологии Биологического научно-исследовательского института СПбГУ, кафедры биологической и органической химии МПГУ им. Ленина; Института нормальной физиологии

им.Анохина РАМН. Часть экспериментов проведена совместно с учеными других стран: Института рыбоводства и гидробиологии Юго-Чешского университета (VURN, г. Водняны), Института биологической и органической химии (UOCHB, г. Прага), экспериментальной научной лаборатории «Craine Aquaculture Facility» Университета штата Мериленд (США), экспериментальной рыбоводной станции в г. Менеу Департамента по рыбоводству Министерства сельского хозяйства и природных ресурсов республики Кипр, которых также благодарю за помощь. Особую благодарность выражаю коллективам форелевого хозяйства «Сходня» и Новооскольского зонального рыбопитомника, а также служащим Управления по рыбоводству и рыболовству во внутренних водоемах Росрыбхоза СССР, с помощью и под руководством которых мы проводили производственные испытания.

Глава 3. Влияние пептидов энкефалинового ряда на процессы жизнедеятельности рыб на разных этапах онтогенеза.

Биологическая активность пептидов энкефалинового ряда в онтогенезе наглядно проявляется в первую очередь в изменении жизнестойкости рыб. На рис. 1 представлены индексы выживаемости 10 видов рыб показывающие, что после воздействия различными энкефалинами на этапе осеменения икры, ее выживаемость за эмбриональный период изменяется разным образом: у осетровых (в том числе гибридов), лососевых и карповых (исключая гибридов) – увеличивается, а у клариевых, спаровых и серрановых – может снижаться или увеличиваться (Микодина и др., 1986; Микодина, 1987; Шеханова и др., 1987; Микодина и др., 1987а, г; Mikodina, 1987; Mikodina et al., 1989; Kouril, Mikodina, Barth et al., 1990, 1991; Kouril, Mikodina, Hamackova et al., 1990; Kouril, Mikodina, Glubokov et al., 1991; Микодина, 1995). Таким образом, обнаружено видоспецифичное изменение выживаемости рыб в раннем онтогенезе под влиянием опиоидных пептидов с нестабильностью величины и направления эффекта. Нестабильность эффекта при воздействии опиоидными пептидами известна из экспериментов не только на рыбах, но и на животных. Она связана, с одной стороны, с нормализующим влиянием энкефалинов на физиологические про-

цессы при патологических состояниях, с другой – с проявлением дозозависимого эффекта при очень малых концентрациях пептида, при которых различия в способах его проникновения в яйцеклетку оказывают решающее значение. Величина эффекта обусловлена также различной биологической активностью исследованных пептидов.

На рис. 2 представлена величина выживаемости рыб за период эмбриогенеза после воздействия лей-энкефалином и его 9-тью дериватами. Из него следует, что биологическая активность зависит от типа структурной модификации.

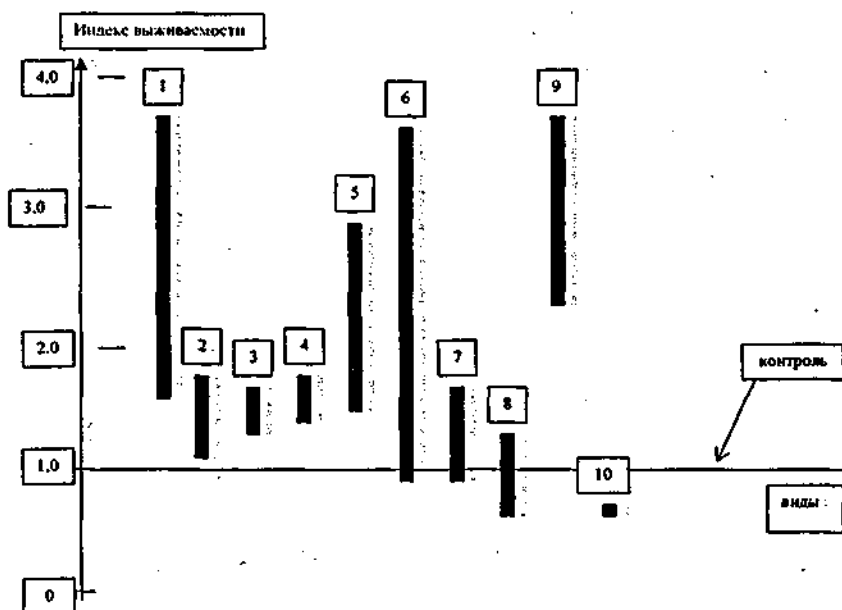


Рис. 1. Диапазон изменения индекса выживаемости в процессе эмбриогенеза (min – max) разных видов рыб: 1 – севрюга, 2 – балтийский лосось, 3 – радужная форель, 4 – сима, 5 – карп, 6 – клариас, 7 – спарус, 8 – полосатый окунь, 9 – бестер, 10 – гибрид карпа, после воздействия опиоидными пептидами: 1, 2, 9 – $(D-Ala)^2$, $(D-Arg)^6$ -лей-энкефалином, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 – даларгином, концентрация 1 мкг/л – 1 час.

аминокислот в их молекулах. У всех структурных аналогов биологическая активность выше, по сравнению с исходным пептидом лей-энкефалином, за исключением аналога под № 10 с заменой лейцина на нехарактерную для этого участка молекулы синтетическую аминокислоту неопентилглицин. Более высокая биологическая активность дериватов лей-энкефалина обусловлена их стабильностью за счет замены глицина во втором положении на Д-аланин и присоединения в 6-е положение аргинина. Другие модификации существенно не

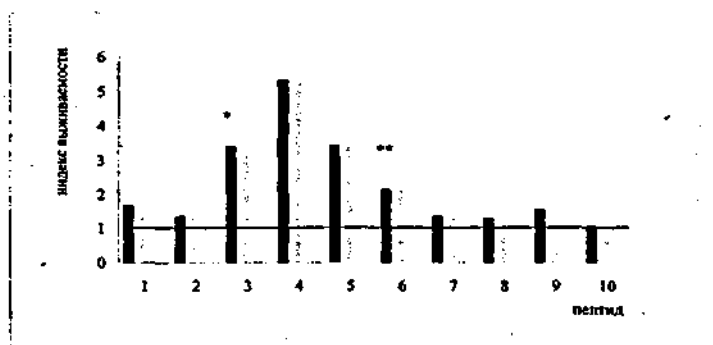


Рис. 2. Максимальная величина индекса выживаемости у рыб после воздействия аналогами лей-энкефалина с различной структурной модификацией молекул. 1 – (D-Ala)², (D-Arg)⁶-лей-энкефалин, 2 – лей-энкефалин, 3 – (D-Ala)², (Arg)⁶-лей-энкефалин (даларгин), 4 – (MePhe)⁴-даларгин, 5 – (D-Phe)⁴-даларгин, 6 – (D-MePhe)⁴-даларгин, 7 – (D-Tle)⁵-даларгин, 8 – (L-Tle)⁵-даларгин, 9 – (D-Neo)⁵-даларгин, 10 – (L-Neo)⁵-даларгин. * – базовый, ** – тератогенный пептид, прямая линия – контроль.

изменяют величины биологической активности пептидов. Однако, замена аминокислоты фенилаланина в 4-м положении на правовращающий стереоизомер и, особенно, на метилированную форму, резко повышают активность пептида, что, по-видимому, приводит к повышению эффективности его связывания с мишенью. Пептид с модификацией фенилаланина на метилированную Д-форму

также высокоактивен, однако он обладает тератогенным действием (Микодина, 1999).

Глава 4. Пути проникновения пептидных регуляторов в организм рыб.

Способы введения экзогенных пептидных регуляторов в организм живых существ различных таксонов с разным уровнем организации многообразны. Для теплокровных животных используют внутривенные и подкожные инъекции, а также внутримышечное, внутримозговое (Полонский и др., 1987), внутрибрюшинное, интраназальное (Батурина и др., 1988) и накожное введение в виде мазей (Виноградов, Смагин, Титов, 1986; Зенгер и др., 1986). Насекомым их вводят в гемолимфу (Минькова, 1999).

Для рыб и их развивающихся яйцеклеток, как водных обитателей, существуют сходные способы введения различных биологически активных агентов, а также используют интракардиальное введения и нанесение аэрозолей на жабры. Специфическим для водных животных является способ аппликации различных биологически активных веществ (лекарственных препаратов, обесклеивающих веществ, анестетиков, антиоксидантов) в водных растворах. Для введения даларгина в организм рыб мы использовали именно способ водной аппликации (Шеханова, Микодина и др., 1987).

4.1. Распределение синтетических опиоидных пептидов в теле рыб.

При воздействии на рыб водными растворами энкефалинов (Микодина и др., 1987) они оказывают свое действие не только путем связывания с рецепторами на мембранах клеток наружных покровов, но и проникают к клеткам органов и тканей. Показано, что меченый тритием даларгин у тилапии в возрасте 2-3 месяца проникает из водных растворов в тело рыбы и через 30 минут обнаруживается в различных органах и тканях: жабрах, пищеварительном тракте, мозге, печени, мышцах (Kouril et al., 1990). Наибольшая удельная радиоактивность выявлена в жабрах и мозге. Эти данные согласуются с исследованиями на животных и человеке (Шитин, 1987), показавшими, что даларгин связывается с рецепторами слизистой оболочки пищеварительного тракта.

Воздействие энкефалинами на неоплодотворенную или оплодотворенную яйцеклетку рыб, то есть на недифференцированный организм, когда его органы и ткани, а также системы регуляции их деятельности, еще не существуют, свидетельствует об их действии не на уровне нейро-эндокринной регуляции, а об ином механизме реализации биологического эффекта. Однако, специального изучения механизма действия энкефалинов ранее не проводилось.

4.2. Проникновение экзогенного пептида в развивающуюся яйцеклетку рыб.

Неоплодотворенные зрелые яйцеклетки рыб отличаются от клеток органов и тканей многоклеточных организмов рядом специфических черт в строении и функционировании. Основное отличие состоит в том, что собственно яйцеклетка заключена в многослойные яйцевые оболочки, пронизанные радиальными канальцами и снабженные одним или несколькими микропиллярными отверстиями. В овулировавшей или развивающейся икринке отверстия радиальных канальцев (поры) могут быть открыты или закрыты (Микодина, 1979). Оболочки икринок расположены поверх цитоплазматической мембраны ооцита и состоят из белков, гликогена, кислых и нейтральных мукополисахаридов (Arndt, 1960; Макеева, Микодина, 1977). Второе отличие заключается в том, что в развивающихся икринках между оболочками и собственно ооцитом находится перивителлиновое пространство. Оно образуется после активации икринки, когда вследствие выброса высокоосмотического содержимого кортикальных альвеол в переооцитарное (подоболочечное) пространство, происходит гидратация (набухание) икринок, сопровождающаяся поступлением воды из внешней среды через оболочки икринок в яйцеклетку. При гидратации икринок большинства пресноводных видов рыб вода из внешней среды поступает в них через поры в яйцевой оболочке и канал микропиле. У морских рыб гидратация ооцитов осуществляется в гонаде самок перед завершением созревания и овуляцией за счет воды овариальной жидкости, а после попадания икринки во внешнюю среду перивителлиновое пространство образуется вследствие выхода воды из желтка. У солоноватоводных рыб, например карпа, эти процессы совмещены (Соин,

1975; 1977). Таким образом, проникновение растворенных веществ из внешней водной среды внутрь икринки, помимо строения яйцевых оболочек, определяется особенностями гидратации икры и ее водно-солевого обмена.

Контакт экзогенных (находящихся в водных растворах) энкефалинов с цитоплазматической мембраной оплодотворенных или развивающихся яйцеклеток рыб, в отличие от такового в клетках органов и тканей многоклеточных организмов, затруднен. Ему предшествует сорбция растворенного пептида яйцевыми оболочками икринок, проникновение сквозь них в перивителлиновое пространство и диффузия через перивителлиновую жидкость к собственно мембране яйца. Лишь только после этого у рыб становится возможным взаимодействие пептидов, достигших цитоплазматической мембраны собственно ооцита, с находящимися на ней опиятными рецепторами (Калюжный и др., 1987; Яковлева и др., 1989). Таким образом, эффективность доступа экзогенного пептида к цитоплазматической мембране развивающейся яйцеклетки рыб тесно взаимосвязана с морфологией оболочек икринок и физиологическими особенностями водно-солевого обмена в икринках разных видов рыб:

4.3. Субклеточная локализация даларгина в развивающихся яйцеклетках радужной форели.

Проведено исследование взаимодействия даларгина с развивающимися икринками рыб на примере радужной форели иммунологическим, иммуногистохимическим и радионуклидным методами. Показано, что при добавлении водного раствора даларгина к развивающимся икринкам радужной форели через пять минут после начала воздействия он обнаруживается во фракциях оболочек, перивителлинового пространства, цитозоля (мембранной фракции и желтке) и ядра. Иммуногистохимически с применением иммунофлуоресцентных меток последующей электронной микроскопии показано, основная часть метки на яйцевых оболочках локализуется в области микропила. Поскольку у рыб ооциты и зародыши имеют различные типы опиятных рецепторов (Калюжный и др., 1987), в том числе к даларгину (Яковлева, Никитина, Бурлаков, 1986), даларгин, очевидно, достигая цитоплазматической мембраны активированной яй-

цеклетки, связывается с ними. Показано, что содержание ³²Даларгина в мембранной и ядерной фракциях подопытных икринок в 1,5 раза выше, чем контрольных. Оно достигает максимума в течение первых 30 минут от начала аппликации, в последующие 3 часа снижается, но остается выше, чем в контроле.

Таким образом, приведенные выше результаты доказывают проникновение даларгина из водных растворов внутрь развивающихся яйцеклеток рыб в процессе их гидратации через микропиллярное отверстие и его локализацию в желтке, мембранных структурах и ядре собственно яйца (Mikodina, 1992; Микодина, 1995). Позднее сходные результаты были получены на насекомых с использованием тритированного даларгина (Минькова, 1999).

Глава 5. Влияние опионидных пептидов на рост рыб.

Влияние синтетических аналогов лей-энкефалина на рост пресноводных, анадромных и морских рыб мы исследовали на примерах балтийского лосося, радужной форели, карпа, спаруса, полосатого окуня.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о стимулирующем влиянии даларгина на рост молоди балтийского лосося при однократном воздействии его раствором в концентрации 1 мкг/л как на этапе вылупления предличинки, так и при их переходе на активное питание. Обнаружено весьма длительное сохранение эффекта пептида: свыше 3 месяцев от момента его воздействия (Микодина и др., 1987д).

Поскольку усиление темпа роста балтийского лосося после воздействия даларгином произошло независимо от наличия и степени развития эндокринной системы, представляло интерес выяснить, имеется ли его влияние на этот процесс при ее полном отсутствии.

В связи с этим, изучали темп роста радужной форели после воздействия даларгином на разных этапах раннего онтогенеза: набухания икры, а также в период появления в гонадах ооцитов ранней профазы мейоза и при двойном воздействии на обоих вышеуказанных этапах. Проведенные исследования показали, что воздействие даларгином на этапе набухания икры в дальнейшем онтогенезе сильнее ускоряло рост рыб, чем при воздействии в период появления в

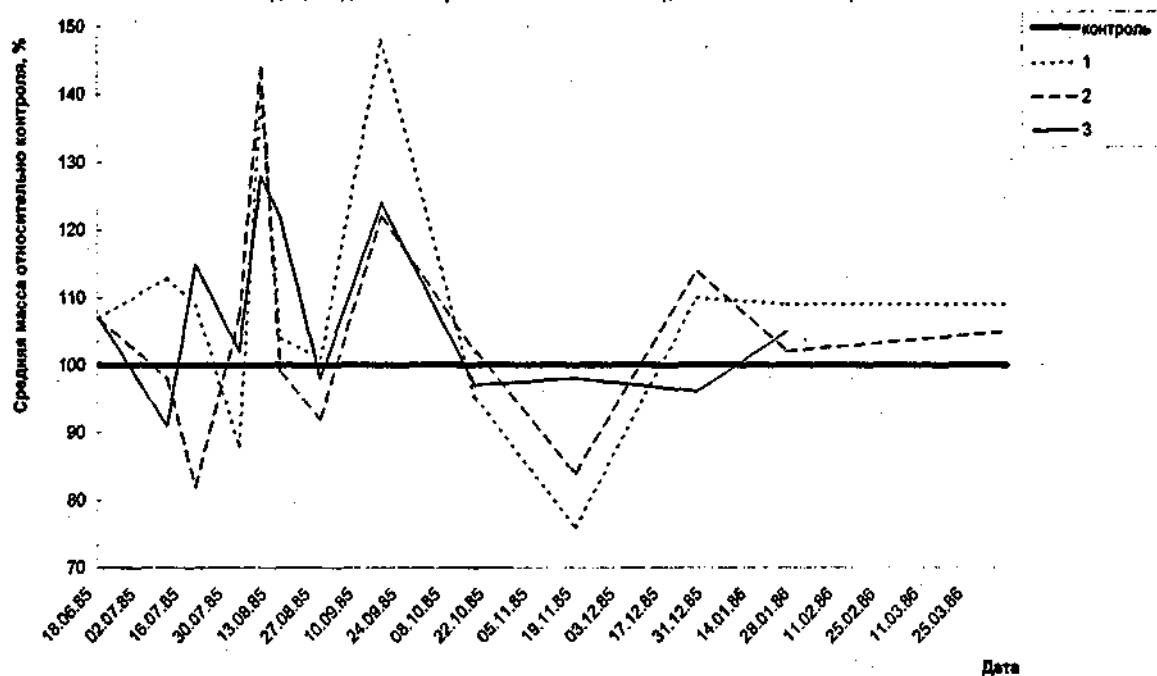
гонадах рыб ооцитов ранней профазы мейоза или двойной обработке (Mikodina et al., 1989).

Отмеченное нами более интенсивное влияние даларгина на рост рыб при его воздействии на недифференцированный организм (зигота) указывает, что при более позднем воздействии, уже на многоклеточный организм, ему подвержены далеко не все клетки. Это согласуется с данными ряда авторов о повышенной тропности даларгина к активно пролиферирующим структурам (Шейман и др., 1985; Тимошин, Жданова, 1987; Тимошин и др., 1987; Ilynsky et al., 1987; Шитин, 1987). Анализ изменения интенсивности роста подопытных рыб относительно контрольных показал наличие колебательного процесса изменения темпа роста рыб после воздействия даларгином относительно контрольных (рис.3). При этом, амплитуда отклонений интенсивности роста массы подопытных рыб относительно контрольных в первые два месяца их выращивания возрастает, а далее снижается, приближаясь к значениям контрольных рыб. Аналогичные процессы выявлены у сими, кижуча и стерляди. Таким образом, даларгин в отношении роста обладает модулирующим эффектом, усиливая те процессы, связанные с ростом, которые усиливаются при нормальном росте, и замедляя процессы, которые в нормальных условиях ингибируют рост.

Исследования, проведенные на карпе трех разных пород (золотом, бесчешуйном и чешуйчатым), генетически отличающихся между собой по темпу роста в течение первого вегетационного сезона, показали, что энкефалины оказывают воздействие только на рыб с исходно низким темпом роста. У рыб с высоким темпом роста энкефалины на ранних этапах онтогенеза отрицательно влияют на рост, однако по мере снижения в онтогенезе темпа роста этот отрицательный эффект исчезает (Kouril, Mikodina, Glubokov et al., 1991).

Воздействие даларгином на икру морских рыб: спаруса и полосатого окуня, осуществляли на ранних этапах эмбрионального развития, причем использовали для спаруса в 5 раз больше, а для полосатого окуня – в 25 раз большие концентрации даларгина, чем для пресноводных рыб. В процессе постэмбрионального развития спаруса нами не обнаружено влияния даларгина, а у полосатого

Рис.3. Динамика отклонений средней массы радужной форели обработанной даларгином на разных этапах раннего онтогенеза (1 - набухания икры, 2 - в период мейотических преобразований в гонадах, 3 - двойная обработка на этапах 1 и 2), относительно контрольной



окуня отмечено отрицательное воздействие его на рост (Микодина, Андреу, Стефаноу, 1992; Микодина, Глубоков, Вудс, 1998). Следовательно, даларгин воздействует на процессы роста не только пресноводных, но и морских рыб, но при большей концентрации из-за меньшей проницаемости структур оболочки икринок у исследованных морских видов. Эти исследования показали, что, в силу более высокого темпа роста исследованных морских рыб, развивающихся за более короткое время и при более высокой температуре воды, чем карповые рыбы и, тем более, лососевые, у них под воздействием пептида наблюдается снижение темпа роста, аналогично выявленным нами закономерностям роста у карпа разных пород с исходно различающимся темпом роста. При этом, в процессе онтогенеза у полосатого окуня также наблюдается по мере снижения темпа роста в онтогенезе уменьшение отрицательного влияния даларгина на рост подопытных рыб. Отрицательное влияние даларгина на рост может также являться следствием использования чрезмерно высокой его концентрации (Микодина, Коуржил, 1997).

Таким образом, применение энкефалинов в раннем онтогенезе влияет на рост рыб в дальнейшем, причем это влияние наиболее выражено при воздействии на недифференцированный организм. Эффективность влияния зависит от проницаемости структур яйцевых оболочек икринок к энкефалинам. Направленность эффекта воздействия зависит от видовых или породных особенностей роста рыб. Чем ниже исходная интенсивность роста рыб, тем сильнее выражен стимулирующий эффект энкефалинов, и, наоборот, чем выше исходный темп роста – тем ниже эффективность влияния энкефалинов на рост вплоть до ингибирующего эффекта.

Механизм воздействия энкефалинов на рост рыб в онтогенезе не опосредован через нейро-эндокринную систему. Следует отметить, что при однократном воздействии этим пептидом на организм рыб наблюдается необычайно длительное проявление его эффекта, наблюдаемое нами в течение трех лет. Этот факт не может быть объяснен только через воздействие пептида на соответствующие клеточные рецепторы, приводящего к активации системы внутрикле-

точных посредников индуцирующего сигнала. Следовательно, механизм действия даларгина на организм принципиально отличается от влияния на него белковых гормонов.

Глава 6. Влияние энкефалинов на морфофизиологические показатели рыб.

Изучено влияние даларгина на гематологические показатели и некоторые морфофизиологические индикаторы рыб после воздействия им на икру рыб (стерляди, карпа, радужной форели) на этапе набухания. Установлено, что у самцов стерляди количество эозинофилов уменьшилось более, чем в три раза, однако у самок количество лимфоцитов и эозинофилов между подопытными и контрольными особями не различалось. У карпа и некоторых его гибридов, обработанных даларгином на этапе смешанного питания, в дальнейшем онтогенезе достоверно снижается содержание белка в плазме и сыворотке крови, увеличивается доля незрелых эритроцитов, концентрация гемоглобина в эритроцитах при уменьшении их объема, повышается суммарное количество лейкоцитов и тромбоцитов. Кроме этого, активизируется лимфопоэз со значительным увеличением числа незрелых форм лимфоцитов.

Таким образом, воздействие энкефалинами на рыб разной систематической принадлежности в их раннем онтогенезе вызывает долговременные изменения ряда гематологических показателей, свидетельствующие об их влиянии на функцию системы крови у рыб.

В связи с тем, что после воздействия синтетических аналогов лей-энкефалина в раннем онтогенезе впоследствии у рыб повышается жизнестойкость и темп роста, проанализированы их некоторые морфофизиологические показатели. Показано, что после обработки даларгином личинок радужной форели в период появления в гонадах самок ооцитов ранней профазы мейоза, у двухгодовалых рыб достоверно увеличивается индекс сердца. У среднерусского карпа и его гибрида с румынским после воздействия даларгина на этапе смешанного питания достоверно снижается индекс печени.

Глава 7. Влияние даларгина на воспроизводительную систему рыб.

Известно, что ряд нейропептидов, в том числе гипоталамические релизинг-гормоны, их синтетические аналоги, инсулиноподобный фактор роста – I, участвуют в регуляции деятельности воспроизводительной системы животных (Прокофьев и др., 1985; Черных и др., 1985) и рыб (Баранникова, 1981; Barnabe, Barnabe-Quet, 1985; Гончаров, 1985, 1998; Kouril et al., 1989; Баранникова, Буковская, 1990; Kouril et al., 1990; Glubokov et al., 1994; Kagawa, Moriyama, 1995). Влияние опиоидных пептидов как на функционирование, так и на развитие и строение половых желез не только у рыб, но и животных других классов, ранее было не исследовано.

Влияние даларгина на строение половых клеток и развитие гонад изучали у представителей осетровых и лососевых (стерляди, симы, радужной форели) после воздействия даларгина в раннем онтогенезе, а также у цихловых (тиляпия), подвергнутых воздействию даларгином в разные периоды гаметогенеза. У этих видов рыб после воздействия даларгина, независимо от степени развития гонад, отличий в строении половых клеток между подопытными и контрольными особями не обнаружено. Однако, у стерляди после однократного воздействия даларгином на этапе смешанного питания выявлено изменение темпа гонадо- и гаметогенеза, причем у самок происходит замедление развития гонад, а у самцов – ускорение (Mikodina et al., 1993). И у самок, и у самцов увеличилась асинхронность развития половых клеток в отличие от контрольных рыб. При этом, у части подопытных самцов, гонады достигли IV стадии зрелости, в отличие от контрольных, находившихся только на II.

В связи с выявленным у осетровых замедляющим влиянием даларгина на темп развития яичников, представляло интерес исследовать гаметогенез у представителей других систематических групп рыб, у лососевых, особенно на тех периодах оогенеза, на которых у стерляди происходит замедление развития яичников, а именно: начальных мейотических преобразований и превителлогенеза. Эти исследования проведены на примере симы и радужной форели после обработки даларгином на разных этапах раннего онтогенеза. Показано, что у

симы (Микодина, Седова, 1987) и радужной форели (Седова, 1991) также наблюдается изменение скорости развития яичников на начальных этапах, однако у лососевых, в отличие от осетровых, это выражается в ускорении периода цитологической дифференцировки пола вследствие интенсификации дифференцировки мейоцитов в ооциты протоплазматического роста. Кроме этого, у радужной форели обнаружено достоверное увеличение количества протоплазматических ооцитов, диаметра их ядра и числа ядрышек (Седова, 1991).

В связи с разным характером ответа гонад стерляди и симы на воздействие даларгином в раннем онтогенезе, исследовали его влияние на гамето- и гонадогенез после воздействия даларгином на разных периодах гаметогенеза: наличия в гонадах первичных половых клеток (ППК), размножения гоний, цитологической дифференцировки пола, периоде превителлогенеза. Гистологический анализ гонад не выявил отличий в морфологии половых клеток и времени наступления половозрелости после воздействия даларгина в эти периоды. Однако, введение пептида самкам в период вителлогенеза приводит к сокращению его продолжительности, что затем приводит к уменьшению временных промежутков между последующими нерестами (Чистова и др., 1987; Седова, 1991).

У осетровых, в конечном счете, отмечено уменьшение диаметра превителлогенных ооцитов (Mikodina et al., 1993), у лососевых – их увеличение (Микодина, Седова, 1989), а у цикловых достоверных отличий по размерам ооцитов между подопытными и контрольными самками не обнаружено (Чистова и др., 1987).

Таким образом, оценка строения и функционирования воспроизводительной системы рыб, подвергнувшихся воздействию даларгина, показывает, что этот пептид не оказывает отрицательного влияния на морфологию половых клеток и способность рыб к нересту, однако видо- и полостецифично изменяет темп гаметогенеза и эффективность функционирования половых желез рыб в период нереста. Воздействию даларгина более подвержена воспроизводительная система самцов.

Глава 8. Биохимические изменения в организме рыб при изменении их функционального ответа на воздействие пептидных регуляторов энкефалинового ряда.

Для выявления причин акселерации роста рыб после воздействия энкефалинов нами проведены биохимические исследования.

8.1. Влияние даларгина на общие биохимические показатели рыб.

Исследование общего биохимического состава тела у акселерированной молодки балтийского лосося, симы и радужной форели после воздействия даларгином на различных этапах раннего онтогенеза, проведенное по методу Фолча, практически не выявило достоверных различий в процентном соотношении обезжиренного сухого остатка (ОСО), липидов и воды в теле по сравнению с контрольными рыбами. Результаты не позволили выявить причин акселерации роста у рыб после воздействия даларгина. Это привело к необходимости применения иных методов определения содержания отдельных компонентов тела рыб.

8.2. Влияние даларгина на содержание и интенсивность синтеза нуклеиновых кислот и белка.

Содержание (концентрацию) растворимой фракции белка по Лоури и нуклеиновых кислот по Шмидту-Таннгаузеру определяли у радужной форели, выращенной после воздействия даларгином на разных этапах раннего онтогенеза, указанных в главе 5. Эти показатели оценивали в соматической (белых мышцах) ткани у годовиков, двухлеток, двухгодовиков и трехгодовиков радужной форели, а также - в генеративной (овулировавшие ооциты), у трехгодовалых самок этого вида.

Установлено влияние даларгина на содержание водорастворимой фракции белка в мышцах рыб (табл.3). Как и у интактных рыб, так и после воздействия даларгина, наблюдается снижение содержания растворимой фракции белков в онтогенезе неполовозрелых особей радужной форели (от годовиков к двухлеткам) более, чем в два раза. У нерестующих самок, выросших после однократного воздействия даларгином в раннем онтогенезе, наблюдается резкое снижение

Таблица 3. Влияние даларгина на содержание ДНК, РНК и растворимого белка (мг/г воздушно-сухого веса) в белых мышцах и икре радужной форели разного возраста выращенной после его воздействия на разных этапах раннего онтогенеза.

Возраст	Вариант воздействия				
	Контроль, М±m	На этапе набухания икры		В период мейотических преобразований в гонадах	
		М±m	% к контролю	М±m	% к контролю
	Мышцы				
ДНК					
1 год, N=10	0,351±0,026 0,226-0,465	0,649±0,050*** 0,408-0,940	185	0,582±0,040*** 0,443-0,833	166
2-летки, N=7	0,254±0,012 0,203-0,297	0,304±0,013* 0,248-0,352	119,8	0,313±0,017* 0,240-0,381	123,2
2 года, N=8	0,225±0,008 0,191-0,256	0,238±0,019 0,165-0,311	105,8	0,288±0,011*** 0,241-0,339	128
3 года, N=8	0,130±0,010	0,080±0,010**	61,5	0,110±0,010	84,6
РНК					
1 год, N=10	10,97±0,75 7,26-15,19	6,86±0,50*** 4,28-9,27	62,5	8,44±0,34** 7,45-10,39	76,9
2-летки, N=6	2,82±0,28 1,95-3,63	2,85±0,19 2,25-3,40	101	2,26±0,24 1,17-3,36	80
2 года, N=8	2,35±0,23 1,08-3,03	4,99±0,57*** 3,15-7,81	212,3	5,85±0,48*** 3,86-7,81	248,9
3 года, N=8	1,40±0,14	2,08±0,33	148,6	2,49±0,17***	177,9
Растворимый белок					
1 год, N=10	303,03±10,49 262,29-349,49	280,18±10,42 221,03-332,21	92,5	343,87±12,76 285,00-436,86	114
2-летки, N=6	283,79±21,05 228,57-338,83	376,81±23,15* 294,99-468,72	132,8	323,65±11,06* 279,15-361,60	114,1
2 года, N=8	151,67±6,78 128,77-182,72	135,94±11,14*** 97,77-171,03	89,6	177,84±9,88*** 150,17-229,37	117,3
3 года, N=8	226,61±22,44	56,05±5,38	24,7	94,48±6,47	41,7
Овулировавшая икра трехгодовалых самок					
ДНК					
	0,153	0,406	265,4	0,805	526,1
РНК					
	1,67	1,13	67,7	1,36	81,4
Растворимый белок					
	19,73	30,41	154,1	17,97	91,1

Примечание. Икра – овулировавшая неактивированная икра от 3-годовалых самок, обработанных даларгинном на этапе набухания икры; различия достоверны при: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

содержания растворимых белков в белых мышцах в 2,4-4 раза относительно контрольных. При этом, чем на более раннем этапе развития воздействовали даларгином (на этапе набухания икры), тем более резко снижается содержание растворимых белков в белых мышцах самок.

Содержание растворимых белков в овулировавшей, не активированной икре подопытных самок в 1,5 раза выше относительно контрольных, причем только в икре рыб, обработанных даларгином в самый начальный период их онтогенеза - на этапе набухания (Микодина, Лаптева, 1989; Mikodina, Lapteva, 1989).

Содержание ДНК в мышцах радужной форели как при однократном воздействии даларгином на икру (этап набухания перед началом дробления), так и на мальков, в момент, когда ооциты в их гонадах находятся на ранней профазе мейоза, достоверно увеличивается к годовалому возрасту, по сравнению с контролем. При этом, чем раньше осуществлено воздействие даларгином, тем больше влияние даларгина на содержание ДНК у годовиков.

Установлено, что содержание ДНК в белых мышцах у контрольных особей радужной форели и у рыб, подвергнутых воздействию даларгином в раннем онтогенезе, в процессе дальнейших двух лет выращивания постоянно снижается, причем уменьшение концентрации ДНК выражено сильнее у рыб, обработанных даларгином на более раннем этапе онтогенеза.

Содержание ДНК в овулировавшей икре, полученной от подопытных самок, в 2,6-5,2 раза выше, чем в икре контрольных рыб. При этом, содержание ДНК в икре самок, подвергнутых воздействию даларгином в период мейотических преобразований в гонадах мальков, вдвое выше, чем в икре рыб, обработанных даларгином на этапе набухания икры, что, по-видимому, связано с воздействием пептидом в период активизации генеративного обмена (Лаптева и др., 1989).

Даларгин также оказывает достоверное влияние на содержание РНК в белых мышцах радужной форели. В процессе онтогенеза как у интактных, так и у обработанных даларгином в раннем онтогенезе рыб наблюдается падение содержания РНК с более высоких значений у годовиков к более низким у трехгодовиков, что соответствует полученным нами данным об аналогичном снижении

содержания ДНК. Однако, эта тенденция подвержена колебаниям, аналогичным, отмеченным нами при анализе роста рыб, подвергнутых воздействию даларгина.

Таким образом, однократное воздействие даларгина на рыб в раннем онтогенезе сопровождается необычайно длительным сохранением влияния на обмен нуклеиновых кислот и белка в течение по меньшей мере следующих 3-х лет жизни. Воздействие даларгина в раннем онтогенезе рыб оказывает влияние на содержание ДНК, РНК и белка не только в соматических клетках организма, но и в яйцеклетках (Микодина, Лаптева, 1990а).

Проведено изучение интенсивности включения ^3H -тимидина в ДНК и ^3H -уридина в РНК икринок и личинок радужной форели, интактных и обработанных даларгинам (табл.4). Разница между интенсивностью включения меченых предшественников в опыте и контроле более выражена у личинок, чем у эмбрионов, что свидетельствует о нарастании эффекта в онтогенезе. Синтетическая активность ДНК у интактных личинок всего лишь на 39% выше, чем у икры. В процессе эмбрионально-личиночного развития радужной форели, обработанной даларгинам, наблюдается постоянный суточный прирост синтетической активности ДНК, достигающий 9,6% к моменту перехода личинок на активное питание. При этом четкой корреляции между увеличением радиоактивности ДНК и митотическим индексом не обнаружено (Микодина, Лаптева, 1990 б).

Обнаружено также влияние даларгина на интенсивность включения ^3H -уридина в РНК икринок и тела личинок радужной форели. Показано, что под действием даларгина резко увеличено включение метки в РНК: в икре примерно в 2 раза, а у личинок — в 3,5 раза по сравнению с контролем. Нами также отмечена тенденция к снижению включения метки в РНК через 24 часа в процессе инкубации с предшественником. Эти данные, видимо, указывают на значительную активность РНКаз в эмбрионально-личиночном развитии.

Полученные данные указывают, что влияние даларгина на белковый обмен рыб не является прямым, а опосредовано через изменение метаболизма нуклеиновых кислот.

Таблица 4. Радиоактивность нуклеиновых кислот бластомер и личинок после обработки далаггином (число распадов в мин на один эмбрион).

Стадия Развития, №*	Воздействие далаггина на стадии (время с момента обработки, сут)	Время инкубации с предшественником, час	ДНК**			РНК***		
			контроль	опыт	% к контролю	Контроль	Опыт	% к контролю
№ 17	набухания икры (9)	3	390	530	136	10809	9571	88,5
		18	1484	2049	138	22570	42619	189
		24	1550	2033	131	26175	31492	120
№ 32	набухания икры (66)	3	1313	1390	106	7623	6899	90,5
		18	1867	13057	699	19477	68142	350
		24	2149	15823	736	9988	23423	235

Примечание. * - стадии развития по Г.М. Игнатъевой. (1975); ** - с ^3H -тимидином (ДНК),

*** - с ^3H -уридином (РНК).

8.3. Влияние энкефалинов на активность нуклеаз у рыб.

Активность нуклеаз изучали в мышцах двухгодовиков радужной форели, выращенных после обработки даларгином на этапе набухания икры и в период появления в гонадах мальков ооцитов ранней профазы мейоза.

Однократное воздействие даларгином в раннем онтогенезе радужной форели, вызывает длительное достоверное уменьшение средних значений активности кислой РНКазы на 41% по сравнению с контролем (табл.5), причем только у рыб, которые подверглись воздействию даларгина в раннем онтогенезе на этапе набухания икры. Эти результаты дают основание высказать предположение,

Таблица 5. Активность нуклеаз в мышечной ткани двухгодовиков радужной форели, выращенных после воздействия даларгином на разных этапах раннего онтогенеза.

Показатель	Воздействие пептидом		
	Контроль	на этапе набухания икры	в период мейотических преобразований
Кислая РНКазы	0.888 ± 0.101 0,500-1,196	$0.520 \pm 0.064^*$ 0,255-0,851	0.792 ± 0.074 0,526-1,151
N	6	9	7
Щелочная ДНКазы	3.052 ± 0.288 1,971-4,250	3.300 ± 0.363 2,005-4,871	3.563 ± 0.410 2,264-4,597
N	8	7	6
Кислая ДНКазы	3.880 ± 0.404 2,756-5,046	3.537 ± 0.257 3,009-4,470	3.275 ± 0.340 1,940-4,390
N	5	5	6

Примечание. * - различия достоверны при $p < 0,01$.

что увеличение содержания РНК в мышцах двухгодовиков радужной форели под влиянием даларгина, может быть вызвано уменьшением активности кислой РНКазы. Различия по активности как кислой, так и щелочной ДНКазы, между подопытными и контрольными рыбами недостоверны.

Таким образом, результаты наших исследований указывают на индуцированное даларгином долговременное влияние на информационные макромолекулы

рыб, проявляющееся в изменении обмена нуклеиновых кислот и их ферментов, а также белка на последующих этапах онтогенеза. Эти данные объясняют установленное нами влияние этого нейропептида на акселерацию роста рыб в дальнейшем онтогенезе.

Полученные результаты привели к необходимости исследования влияния опнатов на морфологию ядерного аппарата клетки.

Глава 9. Исследование воздействия даларгина на хромосомный аппарат рыб.

В связи с выявленным ускорением роста рыб и изменением содержания и синтеза ДНК под влиянием даларгина предпринята попытка выяснить являются ли эти процессы следствием ускорения деления клеток или связаны с изменениями в хромосомном аппарате.

Величины общего митотического и индексов других фаз клеточного цикла показывают влияние даларгина на изменение продолжительности некоторых периодов клеточного цикла, что выражается в замедлении процесса репликации хромосом и ускорение их расхождения в телофазе, однако общего ускорения деления клеток не происходит (Микодина, Лаптева, 1990 б).

Нашими исследованиями показано, что воздействие даларгина на радужную форель в раннем онтогенезе вызывает длительный мутагенный эффект, характеризующийся существенным повышением уровня хромосомных нарушений и сохраняющийся по меньшей мере 6,5 месяцев. Об этом свидетельствует наблюдающееся 2-2,5 кратное увеличение частоты хромосомных aberrаций в клетках передней части туловищной почки у сеголетков радужной форели. Кроме этого, в различной степени происходит увеличение частоты отдельных редких видов нарушений, а число клеток с двумя и более типами aberrаций возрастает в 5,5 раз. Существенно, что в кариограммах клеток предпочки радужной форели увеличено количество таких нарушений, как фрагменты, спутники, гэллы (Арефьев, Микодина, 1989).

**Глава 10. Исследование влияния даларгина на метаболизм
нуклеиновых кислот у потомков радужной форели, обработанной
даларгином в раннем онтогенезе.**

Ранее было установлено, что воздействие даларгином в раннем онтогенезе рыб приводит к сокращению продолжительности эмбрионального развития, повышению выживаемости, стимуляции роста (Шеханова и др., 1987; Микодина и др., 1987в; Седова, 1991). Нами установлено, что продолжительность эмбрионального развития потомства подопытных производителей, выращенных из икры, обработанной даларгином, оказалась меньше, чем в контроле на 3 суток (10 %). Этот эффект даларгина сохранился в потомстве 1 поколения, независимо от пола участвовавших в эксперименте производителей.

При воздействии энкефалинами в эмбриональном или мальковом периоде, выращенные рыбы имеют большую массу, чем контрольные (Микодина и др., 1987). В потомстве, полученном от обработанных в раннем онтогенезе даларгином производителей, этот эффект не только сохраняется, но передается, причем только в том случае, если в скрещивании участвует или подопытная самка, или подопытный самец.

При однократном воздействии пептида его влияние на интенсивность синтеза ДНК более выражено, чем на РНК, однако эффект нарастает по мере роста рыб (глава 8). Оценка этих показателей у потомков производителей, обработанных даларгином в раннем онтогенезе, показывает сохранение данного эффекта, но передача его потомству происходит только по патроклинному пути, при этом скорость синтеза ДНК у потомков увеличена незначительно: всего на 17%, тогда как РНК – на 1381% (Mikodina, 1992).

Следует отметить, что контрольные особи были пигментированы слабее, чем потомки во всех вариантах скрещивания подопытных рыб между собой и с контрольными. При этом, наиболее сильно пигментированными оказались особи из варианта с обоими подопытными производителями. Эти данные могут указывать на вовлечение энкефалинов в передающуюся по наследству регуляцию не

только различных процессов жизнедеятельности организма, но и функционального состояния меланофоров.

Таким образом, однократное воздействие энкефалинов на икру рыб в период ее осеменения вызывает необычайно долговременное влияние на аппарат наследственности, которое выявляется не только в последующие периоды онтогенеза рыб, но сохраняется и нарастает в потомстве первого поколения, особенно у полученного с участием обработанных этими пептидами самцов. Очевидно, что воздействие даларгина в раннем онтогенезе рыб вызывает в геноме самцов наследуемые изменения.

Глава 11. К вопросу о механизме действия энкефалинов.

11.1. Механизм воздействия даларгина на субклеточном уровне.

Учитывая данные по долговременной стимуляции даларгином темпа роста рыб, изменению скорости гаметогенеза и ряда морфофизиологических показателей, прямому проникновению даларгина в ядро, изменению содержания и синтеза ДНК, РНК и белка, увеличению уровня хромосомных aberrаций у рыб, нами была выдвинута гипотеза о взаимодействии этого пептида с ДНК (Микодина, 1988; Микодина, Микулин, 1990).

Учитывая невозможность непосредственного проникновения энкефалинов через липидный слой мембраны клеток, наличие как у развивающихся эмбрионов рыб, так и на поверхности овулировавших неоплодотворенных яиц (Яковлева, Никитина, Бурлаков, 1986; Калюжный, 1987) мю- и дельта-опиатных рецепторов, образование даларгином лиганд-рецепторного комплекса является необходимым этапом для проникновения в клетку.

Нами показано, что однократное воздействие на рыб даларгином на ранних стадиях эмбриогенеза приводит к сокращению сроков эмбрионального развития, повышенной жизнестойкости икринок в процессе инкубации, личинок и молодых рыб в процессе выращивания, акселерации их роста, ускорению дифференциации мейоцитов в ооциты в период превителлогенеза.

Наличие специфических отдаленных эффектов после одноразового попадания энкефалинов в организм, обнаруживаемых на рыбах как на организменном,

так и на физиолого-биохимическом уровне (Лаптева и др., 1987), трудно объяснить лишь связыванием лиганда с рецептором на клеточной мембране, поскольку корреляция между родством к мю-опиатным рецепторам производных энкефалина и их активностью отсутствует (Кусень, Стойка, 1985). Различия в степени выраженности эффектов в ответ на рецепцию энкефалина и его аналогов не могут быть объяснены только через воздействие на биохимические процессы в клетке вторичных мессенджеров: лиганд-рецепторного комплекса (Schreiber et al., 1981; Bowen-Pope, Rubin, 1983). В связи с этим необходимо рассмотреть вероятность непосредственного проникновения энкефалинов внутрь клетки и дополнительного влияния именно их на клеточный метаболизм.

Известно, что лиганд-рецепторные комплексы стероидных и пептидных гормонов проникают внутрь клеток-мишеней. Эндоцитоз этих комплексов осуществляется в основном путем инвагинации плазматической мембраны и образования эндоцитозных везикул. В дальнейшем везикулы, содержащие лиганд-рецепторный комплекс, сливаются с элементами аппарата Гольджи, лизосомами и другими внутриклеточными структурами.

Интернализация даларгина нами установлена прямым обнаружением меченого йодом-32 даларгина и его иммунореактивности в цитоплазме и ядре развивающихся икринок радужной форели (Mikodina, 1992; Микодина, 1995; Микодина, Глубоков, 1996).

Значительная продолжительность существования эффектов в ряду клеточных поколений после однократного воздействия даларгина, его влияние на изменение продолжительности отдельных периодов клеточного цикла, усиление включения меченых предшественников в нуклеиновые кислоты (Микодина, Лаптева, 1990), изменение содержания в тканях количества ДНК и РНК (Лаптева и др., 1989), усиление даларгином активности орнитиндекарбоксилазы (Шитин, 1987), акселерация роста организмов под его действием (Микодина, 1987) позволяют предположить возможность прямого взаимодействия даларгина (или продуктов его деградации) с ДНК. Данные о преимущественной локализации

интернализированного даларгина в ядерной фракции развивающихся икринок рыб, приведенные в диссертации, подтверждают это предположение.

По данным А.А.Замятнина (1984), необходимыми элементами для сохранения опиоидной активности олигопептидов являются циклические группировки, в частности тирозина и фенилаланина, благодаря которым пептиды могут принимать участие в межмолекулярном взаимодействии с рецептором и с рядом других молекул. По нашему мнению, именно за счет циклических группировок тирозина и фенилаланина осуществляется взаимодействие даларгина (или его производных) с ДНК.

Известно, что модельные трипептиды, содержащие во втором положении тирозин или фенилаланин, способны интеркалировать между основаниями ДНК, причем лучшей способностью к интеркаляции обладают пептиды с менее полярным фенилаланином (Пермогоров и др., 1986). Гидрофобное окружение фенилаланина в молекуле даларгина, по-видимому, способствует его взаимодействию с внутренними, гидрофобными участками ДНК. Известно, что интеркаляция ароматических аминокислот вызывает дестабилизацию участков ДНК, обогащенных А-Т парами, и способствует ослаблению водородных связей между парами оснований (Пермогоров и др., 1986).

Аналогичный механизм взаимодействия с ДНК свойственен многим мутагенам и канцерогенам (Ладик, 1975; Кузнецова, Калинин, 1983).

Полярный N-концевой тирозин молекулы даларгина, видимо, не может взаимодействовать с внутренней гидрофобной частью ДНК по сходному с фенилаланином принципу. Более вероятно его взаимодействие с внешней, гидрофильной частью молекулы ДНК. В этом случае характер взаимодействия тирозина с молекулой ДНК, по-видимому, может быть сходным с взаимодействием радикала тирозина, находящегося в активном центре фермента ДНК-топоизомеразы, где за счет ОН-группировки кольца тирозина происходит разрыв фосфодиэфирной связи между нуклеозидами одной из нитей двойной спирали ДНК с образованием нуклеозид-фосфо-тирозинового комплекса. Такой разрыв способствует раскручиванию двойной спирали ДНК за счет вращения вокруг фос-

фодизфирной связи противоположной цепи двойной спирали, и предшествует репликации ДНК (Албертис и др., 1986).

Таким образом, видимо, даларгин участвует в инициации процесса добавочной аномальной репликации отдельных участков ДНК, подвергшихся раскручиванию под воздействием пептида. Такая достройка, не позволяет сразу восстановить исходный разрыв оставшейся цепи двойной спирали, за счет образования добавочного фрагмента. Возможность протекания такого процесса подтверждается данными об увеличении включения в ДНК меченого тимидина под действием даларгина как в процессе эмбрионально-личиночного развития рыб (Микодина, Лаптева, 1990), так и у личинок или имаго насекомых (Минькова, 1999), а также увеличение под действием лей-энкефалина и даларгина ДНК-полимеразной активности (Минькова, 1999).

При одновременном попадании даларгина в близкие участки обеих цепей двойной спирали ДНК возможен ее разрыв с образованием микрохромосом, фрагментов, спутников различной величины. Этот процесс нами обнаружен (Арефьев, Микодина, 1989). При отсутствии таких разрывов возникающие «хвосты» удаляются из нативной ДНК и их судьба может быть различной. Они могут уничтожаться под действием ДНКаз, что подтверждается обнаруженным нами увеличением активности щелочной ДНКазы в ответ на воздействие даларгина. Кроме этого, полученные фрагменты могут существовать самостоятельно.

Наши данные показали, что под действием даларгина достоверно увеличивается количество ядрышек в ооцитах рыб (Седова, 1991). Поскольку ядрышки в ооцитах рыб и некоторых других животных содержат ДНК, комплементарную рибосомной РНК (Нейфах, Тимофеева, 1977), увеличение их количества после воздействия на самок даларгином может указывать на усиление амплификации рДНК под действием опииатов. С другой стороны, нами отмечено, что ускоренный темп роста, а также изменение синтеза ДНК, РНК и белка, индуцированные даларгином, передаются потомкам по патерналистскому пути наследования (Mikodina, 1992).

Мы полагаем, что при случайном распределении энкефалинов по экспрессируемым участкам ДНК и взаимодействии с ними, несомненно, основную роль в амплификации опнаты будут играть в участках, ответственных за производство рибосом в силу их множественности, составляющей от нескольких сот до нескольких тысяч последовательностей. В конечном счете, это выражается в усилении синтеза белка и увеличении темпа роста. Учитывая, что даларгин вызывает усиление роста рыб не только при воздействии им на ранних стадиях эмбриогенеза, но и на личинок, можно полагать, что опнаты вызывают амплификацию рибосомальной ДНК не только в генеративных, но и в соматических клетках.

Таким образом, выдвигаемая нами гипотеза объясняет роль энкефалинов (на примере стабильного аналога лейцин-энкефалина даларгина, а возможно, и других нейропептидов) как регуляторов генной экспрессии, осуществляемой через их непосредственное взаимодействие с информационными макромолекулами.

11.2. Анализ эффектов воздействия даларгина на уровне организма : с позиций механизма его действия..

Выдвигаемая нами гипотеза механизма действия энкефалинов путем прямого взаимодействия пептида с ДНК, позволяет объяснить всю совокупность полученных нами результатов, таких как: отдаленность эффектов воздействия даларгина во времени, как результат прямого воздействия пептида с ДНК; эффект акселерации, как результат увеличения количества рРНК; оптимум концентрации действия даларгина, как результат амплификации участка хромосомы, соизмеримого с включенной в него информацией; модуляционный эффект, обусловленный неоднозначностью состояния ДНК на разных стадиях развития, а также в разные периоды клеточного цикла на момент воздействия пептида; эффекты даларгина на морфофизиологические и биохимические показатели рыб, как результат воздействия пептида на активно экспрессируемые участки ДНК; нарушения в генетическом аппарате клетки, как результат интеркаляции пепти-

да в двойную спираль ДНК; наследуемость эффектов даларгина, как результат передачи по наследству измененного генетического аппарата.

Предлагаемая гипотеза позволяет объяснить экспериментально полученные эффекты даларгина, не прибегая к помощи иных допущений и предположений, например таких как теория сверхмалых доз действия биологически активных регуляторов.

Глава 12. Энкефалины как эндогенные регуляторы адаптивного ответа рыб на изменения факторов внешней среды.

Значительные изменения условий среды часто отрицательно влияют на численность популяции рыб. К таким изменениям среды должны были выработаться вполне определенные адаптивные механизмы, выражающиеся в: 1) повышении жизнестойкости уцелевшего потомства; 2) повышении популяционной плодовитости за счет увеличения темпа роста молоди, ускорении процессов созревания, сокращении промежутков между нерестами (для тропических рыб); 3) увеличении разнокачественности потомства – материала для направленного отбора.

Известно, что в ответ на воздействие различных стрессовых факторов резко возрастает производство и выброс энкефалинов (Хайдарлиу, 1984; Дмитриева, 1985; Аргинтаев, 1985).

Одним из проявлений влияния энкефалинов, продемонстрированных в настоящей работе, является увеличение разнокачественности организмов, в том числе и в потомстве, что характерно для воздействия веществ и физических факторов с мутагенными свойствами.

Обнаруженное нами усиление роста и ускорение созревания рыб под действием энкефалинов, сокращение промежутков между нерестами (тилапия), повышение выживаемости потомства также являются приспособительными факторами к повышению численности в условиях возрастания смертности при резком изменении условий существования.

Учитывая данные о наследуемости эффектов, вызванных энкефалинами, а также участия энкефалинов в целом комплексе ответных антистрессовых реак-

ций, мы можем полагать, что именно энкефалины обеспечивают наследуемость адаптивных реакций, возникших в ответ на изменение внешних факторов среды.

Таким образом, роль энкефалинов в эволюционном процессе - это усиление приспособительных реакций организма на стрессовые воздействия факторов внешней среды, выражающиеся в увеличении выживаемости и повышении популяционной плодовитости той части популяции, которая наиболее приспособлена к данным факторам среды. Можно полагать, что энкефалины способствуют ускорению процесса отбора благоприятных признаков, одновременно усиливая разнокачественность потомства и обеспечивая материалом дальнейший отбор.

Следует отметить, что при воздействии в экспериментальных условиях даларгина на яйцеклетки или личинок рыб до завершения процессов дифференцировки их первичнополовых клеток, нами обнаружена передача по наследству такого признака, как повышенный темп роста. При этом наследование осуществляется по патроклинному пути, что, видимо, носит адаптивный характер.

Глава 13. Использование пептидных регуляторов в различных областях народного хозяйства и оценка возможности их применения в аквакультуре.

Выявленные регуляторные (модулирующие) свойства нейропептидов позволяют использовать их в различных областях народного хозяйства, в первую очередь в медицине. Как лекарственные препараты они применяются при лечении различных заболеваний человека (Чазов и др., 1984; Чазов и др., 1984 а; Полонский и др., 1987; Шитин, 1987; Левина и др., 1987; Яснецов и др., 1987). Их используют для регуляции воспроизводительной функции самок сельскохозяйственных животных (Прокофьев и др., 1985; Черных и др., 1985). Обсуждаются перспективы применения даларгина в качестве регулятора роста и численности насекомых (Минькова, 1999).

В рыбохозяйственной практике в настоящее время уже активно используются в качестве индукторов нереста такие нейропептиды, как рилизинг-фактор

гонадотропного гормона и его синтетические аналоги (Barnabe, Barnabe-Quet, 1985; Гончаров, 1985; 1998; Kouril et al., 1989, 1990; Glubokov et al., 1994). Некоторые нейропептиды (пептид дельта-сна, даларгин) можно использовать также в качестве корректоров стресса у рыб (Лебедева, Головкина, 1993; Лебедева, Микодина, Головкина 1996). Фрагмент пептидного гормона АКТГ не только нормализует нарушенное при стрессе поведение рыб, но и улучшает их обучаемость, повышая тем самым адаптивные возможности ее центральной нервной системы, что позволяет рекомендовать его применение в аквакультуре, поскольку первые этапы онтогенеза рыб проходят в условиях известной экологической депривации (Витвицкая и др., 1987; Лебедева и др., 1989). Показано стимулирующее влияние на развитие ценных видов рыб таких нейропептидов, как бремазацин, соматостатин, бомбезин, меланостатин, тиролиберин, а также не только энкефалинов, но и морфина и антагониста опиатных рецепторов - налоксона (Бурлаков, Бурлакова, 1991).

На основании наших экспериментальных данных, подтвержденных многочисленными публикациями и защищенных тремя авторскими свидетельствами (Шеханова и др., 1987; Kouril, Mikodina et al., 1991, 1991 а), предложено использовать синтетический аналог лей-энкефалина - даларгин при товарном выращивании рыб (Микодина, 1988). Разработаны и опубликованы «Краткая инструкция по применению даларгина в рыбоводстве» и «Методические указания по применению даларгина для повышения жизнестойкости икры, предличиннок, молоди рыб и акселерации их роста» (Микодина и др., 1987). Производственные испытания подтвердили увеличение эффективности выращивания объектов аквакультуры при использовании этой методики, что нашло отражение в двух специальных информационных выпусках (1986, 1987 г.г.) Белгородского центра технической информации (МТЦИП).

Экономические расчеты показывают, что использование энкефалинов в аквакультуре повышает эффективность работы рыбоводных хозяйств. В частности, при выращивании радужной форели, даларгин приводит к увеличению прироста ихтиомассы в процессе выращивания по сравнению с контролем на 29,1 % с

одновременным снижением затрат кормов на 3,8 % и себестоимости на 22,6 % (Микодина, Панченков, Яблоков, 1990).

Проведено централизованное внедрение разработанной для практического применения методики на 15 рыбоводных хозяйствах России. Разработка экспонировалась в 1988 г. на ВДНХ СССР, за что коллектив авторов под руководством Е.В.Микодиной удостоен серебряной медали ВДНХ. Работа была также представлена на международной рыбохозяйственной выставке «Ирыбпром-90».

Выводы.

1. Биологическая активность исследованных экзогенных синтетических аналогов лей-энкефалина зависит от типа структурной модификации аминокислот в их молекулах. Замены глицина во втором положении на Д-аланин и фенилаланина в 4-ом положении на его метилированную или Д-форму увеличивают биологическую активность пептида. Такого рода модификации защищают пептиды от протеолиза, не нарушая при этом пространственного расположения функционально важных группировок тирозина и фенилаланина, ответственных за реализацию их биологического эффекта.

2. Регуляция метаболизма рыб энкефалинами осуществляется путем их проникновения в клеточное ядро, что вызывает длительные изменения обмена веществ.

3. Регуляторное влияние энкефалинов на метаболизм рыб выражается в модуляции ими морфофизиологических и биохимических процессов, приводящей к изменению выживаемости и темпа роста, а направление эффекта зависит от систематического положения, экологических и морфофизиологических особенностей рыб.

4. Энкефалины изменяют темп формирования гонад и развития половых клеток у рыб. На завершающих этапах созревания наблюдается ускорение и синхронизация нереста и увеличение продукционных характеристик производителей.

5. Воздействие даларгина в раннем онтогенезе рыб вызывает долговременное сохранение высокой частоты хромосомных нарушений, при этом возрастает доля клеток, несущих более одного типа нарушений, в наибольшей степени - с хроматидными разрывами, а также увеличивается число фрагментов, спутничных элементов, негомологичных ассоциаций хромосом и некоторых редких aberrаций.

6. Энкефалины, участвуя в регуляции биохимических процессов у рыб, вызывают долговременные и наследуемые изменения метаболизма нуклеиновых кислот и белков.

7. Обоснована гипотеза о механизме действия экзогенных опиоидных пептидов как регуляторов метаболизма у рыб, заключающаяся в: а) их проникновении в ядро и прямом взаимодействии с ДНК; б) усилении процессов фрагментации (амплификации) одной или обеих нитей ДНК; в) усилении процессов транскрипции с преимущественным образованием рибосомальной РНК; г) усилении производства рибосом; д) усилении процессов трансляции РНК и модуляции синтеза белка.

8. На основании результатов исследования создана и внедрена методика использования синтетических пептидов энкефалинового ряда для оптимизации процессов искусственного воспроизводства рыб с целью повышения эффективности товарного выращивания.

Основные публикации по теме диссертации.

1. Микодина Е.В. 1980. Структура яйцевых оболочек зрелых яиц некоторых костистых рыб // Онтогенез. Т. 11. № 1. С. 101-106.

2. Микодина Е.В., Макеева А.П. 1980. Строение и некоторые свойства яйцевых оболочек пресноводных пелагофильных рыб // Вопросы ихтиологии. Т. 20. Вып. 2 (121). С. 298-306.

3. Микодина Е.В., Седова М.А., Волынкина Н.В., Троицкий Б.Н., Борисов А.Г. 1986. Применение препарата даларгин для обработки личинок карпа // Информ. листок № 71-86. Белгород: МПЦИП. С.1-2.

4. Микодина Е.В. 1987а. О стимуляции даларгином некоторых физиологических процессов у карпа // Тр. ВНИРО "Вопросы физиологии морских и проходных рыб". С. 80-86.
5. Микодина Е.В. 1987б. О структуре поверхности оболочек икринок костистых рыб // Вopr. ихтиологии. Т.27. Вып.1. С.106-113.
6. Микодина Е.В., Лаптева Т.И., Фомина Г.И. 1987. Оценка влияния даларгина на содержание нуклеиновых кислот и белка у радужной форели // Тез. докл. 1-го Всес. симп. по экологической биохимии рыб. Ярославль. С. 54-55.
7. Шеханова И.А., Микодина Е.В., Сторожук Н.Г., Седова М.А., Широкова Е.Н. 1987. Способ стимуляции физиологических процессов у рыб на ранних стадиях развития // Авт. свид. №1286138. Бюлл. изобрет. №4. С.6-14.
8. Микодина Е.В., Седова М.А. 1987. Реакция половых желез симы на воздействие синтетического аналога лей-энкефалина // Тр. ВНИРО "Вопросы физиологии морских и проходных рыб". С. 86-98.
9. Микодина Е.В., Седова М.А., Глубоков А.И., Наволоцкий В.А. 1987. Методические указания по применению даларгина для повышения жизнестойкости икры, предличинок, молоди рыб и акселерации их роста. М.: ВНИРО. 13 с.
10. Микодина Е.В., Седова М.А., Троицкий Б.Н., Троицкая Н.В., Фрикин В.В. 1987. Влияние биологически активного препарата даларгин на рыбопродуктивность выростных прудов // Информ. листок №85-87. Белгород: МТЦТИП. С.1-2.
11. Микодина Е.В., Сторожук Н.Г., Седова М.А., Широкова Е.Н. 1987. Влияние даларгина на рост молоди балтийского лосося // Рыбн. хоз-во. № 5. С. 27-29.
12. Mikodina E.V. 1987. Nutzung von Neuropeptiden zur Steigerung des Überlebens von Karpfen in der frühen Ontogenese // Physiol., Biol. und Parasitol. von Nutzfischen (VI Wissenschaftliche Konferenz vom 29 Sept. bis 1 Okt. 1986 in Gustrow). Rostok: Wilhelm-Pieck Univ. S. 92-94.
13. Микодина Е.В. 1988. Некоторые сведения о даларгине - синтетическом суперактивном аналоге лей-энкефалина, предложенного для интенсификации

рыбоводного процесса // Тр. ВНИРО "Водная токсикология и оптимизация биопродукционных процессов. М.: ВНИРО. С.121-130.

14. Микодина Е.В., Сторожук Н.Г. 1988. Изучение обмена микроэлементов у радужной форели с применением синтетического гексапептида даларгина // Тез. докл. IV Всес. конф. по раннему онтогенезу рыб", Ч. II. Мурманск. С. 64.

15. Арефьев В.А., Микодина Е.В. 1989. Нарушения метафазных хромосомных наборов стальноголового лосося после воздействия олигопептида даларгина // Генетика. Т. 25. №11. С. 2083-2089.

16. Микодина Е.В., Лаптева Т.И. 1989. Интенсивность синтеза нуклеиновых кислот и белка в раннем эмбриогенезе лососевых рыб под влиянием синтетического аналога лей-энкефалина даларгина // Тез. докл. VII Всес. конф. "Экологическая физиология и биохимия рыб". Ч. II. Ярославль. С. 22.

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

18. Mikodina E.V., Lapteva T.I. 1989. Vliv syntetického analogu leu-enkefalinu dalarginu na zmeny nukleovych kyselín a bílkovin u pstruže duhového // Chov lososovitých ryb včetně sihu. CSSR, Mariánské Lázně. 22-24 Okt. S. 109-115.

19. Mikodina E.V., Sedova M.A., Glubokov A.I., Navolotski V.A. 1989. Využití neuropeptidu při intenzifikaci odchovu lososovitých ryb // Chov lososovitých ryb včetně sihu. CSSR, Mariánské Lázně. 22-24 Okt., S. 22-24.

20. Микодина Е.В., Лаптева Т.И. 1990а. Влияние даларгина на содержание нуклеиновых кислот и белка в белых мышцах и икре радужной форели // Тр. ВНИРО "Эколого-физиологические и токсикологические аспекты и методы рыбохозяйственных исследований". М.: ВНИРО. С. 124-129.

21. Микодина Е.В., Лаптева Т.И. 1990 б. Синтез нуклеиновых кислот в онтогенезе радужной форели, индуцированный синтетическим аналогом лей-энкефалина даларгином // Вопросы ихтиологии. Т. 30. Вып. 4. С. 158-161.

22. Микодина Е.В., Микулин А.Е. 1990. Анализ механизма воздействия да-
ларгина на физиологические процессы в организме рыб // Тр. ВНИРО
"Эколого-физиологические и токсикологические аспекты и методы рыбохозяй-
ственных исследований". М.: ВНИРО. С. 130-142.

23. Микодина Е.В., Панченков Г.Т., Яблоков К.А. 1990. Оценка эффектив-
ности применения оплодотворяющих растворов при воспроизводстве радужной
форели // Рыбн. хоз-во. № 8. С. 38-40.

24. Микодина Е.В., Сторожук Н.Г. 1990. Совместное действие микроэлемен-
тов и пептидных биорегуляторов // Тез. докл. 11 Всес. конф. по биологической
роли микроэлементов и их применению в сельском хозяйстве и медицине. Т. II.
Самарканд. С.198-200.

25. Kouril J., Mikodina E.V, Barth T., Kvasnicka P., Hamackova J., Mikodina
E.V, Glubokov A.I., Pospisek J., Prikryl I. 1990. Influence of the treatment with
short-term bathing in solutions of two leu-enkephalin derivates on Tinca tinca larvae
survival and grows during the first year // Abstr. FAO/EIFAC -90. Symp. E.4. P. 42.

26. Kouril J., Mikodina E.V., Hamackova J., Barth T., Kvasnicka P., Glubokov
A.I., Pospisek J., Prikryl I. 1990. Vliv osetreni vackoveho pludku kapra a lina pomoci
kratkodobe koupeli v rostoku galarginu a jeho analogu na preziti a rust u prvnim roce
zivota // Konf. "Biologicky Aktivni Peptidy II." CSSR. Praha. S.20.

27. Kouril J., Mikodina E.V, Glubokov A.I., Sedova M.A., Hamackova J., Jarigin
K.A., Pospisek J., Navolotsky V.A., Barth T., Kochta V., Vachta R. 1991. Spusob
osetreni raneho pludku kapra a lina. P.L.N.6867.

28. Kouril J., Mikodina E.V, Glubokov A.I., Sedova M.A., Navolotsky V.A.,
Hamackova J., Vachta R., Pospisek J., Kochta V., Jarigin K.A., Kvasnicka P. 1991.
Prostrodek pro snyseni preziti pludku kaprovitych ryb. P.L. N. 2-6965.

29. Kouril J., Mikodina E.V, Barth T., Kvasnicka P., Hamackova J., Glubokov
A.I., Pospisek J., Prikryl I. 1991. Influence of the treatment with short-term bathing
in solutions of two leu-enkephalin derivates on Tinca tinca larvae survival and grows
during the first year // Proc. FAO/EIFAC Symp. on Production Enhancement in Still-
water Pond Culture. CSSR, Vodnany. V.II. P.355-360.

30. Микодина Е.В., Микулин А.Е. 1992. Спермация самцов рыб под действием олигопептида даларгина // Тез. докл. VIII Научн. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. Петрозаводск. Т.2. С. 8-9.

31. Микодина Е.В., Андреу Л., Стефаноу Д. 1992. Реакция *Sparus auratus* на воздействие гексапептида даларгина // Тез. докл. VIII науч. конф. по экол. физиол. и биохимии рыб. Т.2. Петрозаводск. С. 6-7.

32. Mikodina E.V. 1992. Physiological and biochemical specificity of the effects of dalargin and its analogues on hatchability of fish eggs // Proc. Intern. Conf. Fish reproduction'92. CSSR. Vodnany. P.103-105.

33. Mikodina E.V., Sedova M.A., Chistova M.N. 1993. Effect of "Dalargine", a synthetic Leu-enkephaline analogue, on growth and gonad Development of sterlet, *Acipenser ruthenus* // Absr. Bull. Intern. Symp. on Sturgeons. Sept. 6-11. Russia, Moscow, VNIRO. P. 95-96.

34. Микодина Е.В. 1995. Интенсификация форелеводства. Опыт и физиологические основы внедрения малых регуляторных пептидов // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Информ. пакет ВНИЭРХ. Вып. 1. С. 1-20.

35. Linhart O., Kudo S., Billard R., Slechte V., Mikodina E. 1995. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review // Aquaculture. V.129. P.75-93.

36. Микодина Е.В., Глубоков А.И. 1996. Итоги и перспективы российско-чешского сотрудничества в области аквакультуры // Информ. пакет ВНИЭРХ. Сер. Аквакультура. Вып. 4. С. 1-20.

37. Арефьев В.А., Микодина Е.В., Душкина Л.А. 1996. Стальноголовый лосось (радужная форель) как возможный тест-объект для цитогенетического мониторинга в аквакультуре // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Информ. пакет ВНИЭРХ. Вып. 1. С. 15-35.

38. Микодина Е.В., Коуржил Я. 1997. Лейцин-энкефалин и его синтетические дериваты как модуляторы раннего онтогенеза // Тез. докл. Первого Конгресса ихтиологов России. М.: ВНИРО. С. 255.

39. Микодина Е.В., Широкова Е.Н. 1997. Биологические основы и биотехника аквакультуры африканского сомика *Clarias gariepinus* // Рыбное хозяйство. Сер. "Аквакультура": Информ. пакет ВНИЭРХ. Вып. 2. С. 1-44.

40. Микодина Е.В., Глубоков А.И. 1998. Управление физиологическими процессами у рыб биологически активными веществами и факторами // Биологические основы мариккультуры. М.: ВНИРО. С. 177-178.

41. Микодина Е.В., Глубоков А.И., Вудс К.Л. 1998. Влияние синтетического пептида даларгина на ранний онтогенез рыб различных систематических групп // Тез. докл. Всеросс. симп. "Возрастная и экологическая физиология рыб". Борок. С. 67.

42. Микодина Е.В., Стребкова. Т.П. 1998. Морфофизиологические особенности созревания самок полосатого окуня *Morone saxatilis*, выращенных в бассейнах с морской водой // Рыбное хозяйство. Сер. "Аквакультура": Информ. пакет ВНИЭРХ. Вып. 5. С. 1-21.

43. Микодина Е.В. 1998. Биологические основы и методы управления функциями в раннем онтогенезе рыб // Биологические основы мариккультуры. М.: ВНИРО. С. 178-205.

44. Микодина Е.В. 1999. Исследование воздействия новых структурных аналогов даларгина на икринки африканского сомика *Clarias gariepinus* (Clariidae) // Вопр. ихтиологии. Т.39. № 5. С. 701-707.



