

Влияние синтетического нанопептида на сперматогенез у осетровых рыб

А.В. Лабенец¹, Г.Д. Капанадзе², Э.В. Бубунец³

¹ - ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН, Москва

² - ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

³ - ФГБУ «Центральное управление по рыбохозяйственной экспертизе и нормативам по сохранению, воспроизводству водных биологических ресурсов и акклиматизации», Москва

Контактная информация: д.б.н. Капанадзе Гия Джемалиевич, giyak@yandex.ru

Однократные инъекции нанопептида $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$ в дозировке 2 см³ раствора концентрацией 5 мкг/мл (10 мкг/особь) стабильно индуцируют спермиацию у самцов осетровых рыб в условиях культивирования. Стандартные критерии качества эякулятов и результаты функционального тестирования показали их физиологическую полноценность и пригодность для использования в процессе воспроизводства.

Ключевые слова: нанопептид $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$, осетровые рыбы, индукция спермиации, качество спермы.

Синтетические нанопептиды находят все более широкое применение в практике животноводства и медицины [5]. Растет использование веществ этой группы и в аквакультуре.

Воспроизводство многих наиболее ценных видов рыб осуществляется при помощи искусственной индукции созревания половых продуктов, реализуемой путем инъекций гормональных препаратов. Начиная с 30-х гг. прошлого века, для данной цели использовались нативные гипофизы соответствующих видов рыб, а позднее – получаемые из них препараты. Возникающие по мере распространения этой практики вопросы, такие как проблема стандартизации активности препаратов гипофиза, растущий дефицит сырья для их производства и др., длительное время не находили удовлетворительного решения. На этом

фоне возросла актуальность адекватной замены гипофизарных препаратов. Наиболее эффективным подходом здесь оказался поиск заменителей гипофизов рыб среди гормонов совсем иной природы, чем гонадотропины.

Исследование механизмов, обеспечивающих регуляцию деятельности гонад, позволило установить, что синтез и выведение гонадотропных гормонов гипофиза находятся под контролем гипоталамуса, который осуществляет эту функцию с помощью рилизинг-гормонов. Последние являются пептидами, состоящими всего из 10 аминокислот [2]. Многие их синтетические аналоги, выпускаемые в настоящее время, обладают многократно большей биологической активностью, чем естественные рилизинг-гормоны. В отечественной аквакультуре наибольшее распростра-

нение получил синтетический аналог лютеинизирующего гормона – рилизинг-гормона (ЛГ-РГ) млекопитающих – «Сурфагон» ($C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$).

Несмотря на наличие определенных проблем, он широко применяется в современной практике воспроизводства многих видов рыб [1]. Основное внимание здесь уделяется отработке оптимальных схем использования препарата для стимулирования овуляции ооцитов и анализу получаемых при этом результатов. Исследования особенностей эякулятов, получаемых в результате индукции спермиации нанопептидом, до настоящего времени привлекают неоправданно мало внимания [6].

Целью работы являлось изучение эякулятов культивируемых осетровых рыб, продуцируемых при индукции спермиации синтетическим нанопептидом $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$.

Материалы и методы

Для получения исследованных эякулятов использовались половозрелые самцы ряда видов осетровых, выращенные и содержащиеся в предприятиях Московской области – Можайском производственно-экспериментальном рыболовном заводе и рыболовном хозяйстве Электрогорской ГРЭС-3 им. Р.Э. Классона. Регламент преднерестового содержания и условия среды в целом соответствовали нормативным значениям [7].

Для стимулирования созревания применялся препарат «Сурфагон» производства ЗАО «Мосагроген», одноименное действующее вещество которого имеет структурную формулу ([des-Gly10, D-Ala6]–LHRH ethylamide) и является, соответственно, синтетическим нанопептидом, так как содержит

на одну аминокислоту меньше, чем естественный рилизинг-гормон.

Индукция спермиации осуществлялась путем однократного инъектирования производителей в спинную мышцу (рис. 1) раствором сурфагона (5 мкг/мл) в 0,9 % растворе хлорида натрия. Дозировка составляла 2 см³ на особь. Продолжительность экспозиции составляла от 18 до 30 ч в зависимости от температуры воды.



Рис. 1. Инъектирование самца стерляди раствором нанопептида $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$.

Получение спермы проводилось при помощи силиконового катетера, вводимого в семяпровод. Для сбора эякулятов использовались полиэтиленовые пробирки (рис. 2).



Рис. 2. Получение спермы у самца русского осетра.

Изучение эякулятов проводили с использованием методик, имеющих широкое применение в работах такого рода [3]. Соотношение живых и мертвых спермиев определялось путем глазмерной оценки спермы под микроскопом с использованием 5-балльной шкалы. Количество спермиев в единице объема определялась путем их подсчета в камере Горяева с разбавлением эякулята в 200 раз 4% раствором формалина в эритроцитном меланжере.

Активность спермиев оценивалась по длительности двух фаз: I – до перехода большей части спермиев (>50-60%) от поступательного движения к колебательному; II – до полного прекращения движения большинства спермиев. Продолжительность движения измерялись с использованием электронного секундомера под микроскопом с увеличением 400×. Для определения сперматокрита, которое проводилось немедленно после получения эякулятов, использовалась центрифуга МГЦ-8 и стандартные гематокритные капилляры [3, 8]. Обработка полученных данных проведена с использованием пакета программ «Statistica 6.0».

Результаты и их обсуждение

Основные показатели качества эякулятов осетровых рыб при индукции спермиации синтетическим нанопептидом приведены в таблице. Визуальная оценка полученных эякулятов показала их близкое к среднему качество. Существенный разброс данных (2-5 баллов) и весьма высокая их вариабельность обусловлены, по-видимому, спецификой сперматогенеза у отдельных самцов.

Важным элементом оценки качества спермы является определение

концентрации спермиев в единице объема эякулята. Как показывают приведенные в табл. данные, у всех использованных в экспериментах видов (за некоторым исключением стерляди) величины этого показателя были близки к средним видовым значениям, обычно рассматриваемым в качестве нормативных [7]. Сперматокрит, как показатель довольно тесно коррелирующий с концентрацией спермиев, в большинстве случаев закономерно соответствовал величинам последнего параметра. Высокая изменчивость исследованных эякулятов по этим параметрам, очевидно, детерминировалась индивидуальными особенностями продуцировавших их самцов и наличием объективных различий в физиологическом статусе рыб.

Активность спермиев, оцениваемая по времени их подвижности, в значительной степени определяется внешними факторами, которые в условиях культивирования могут существенно отличаться от характерных для естественных условий. В первую очередь, это касается температуры воды и некоторых гидрохимических показателей [4]. Однако, несмотря на несколько меньшую, по сравнению со считающейся типичной, длительность обеих фаз движения спермиев, время их поступательного движения следует рассматривать как вполне достаточное для эффективного оплодотворения.

Решающим критерием оценки качества эякулятов является их функциональное тестирование, т.е. определение оплодотворяющей способности спермы. В процессе проведения данной работы оплодотворяемость икры (оценивавшаяся на стадии второго деления)

составила в разных партиях: у белуги – 30-97, у русского осётра – 82-92, северюги – 50-94, сибирского осётра – 78-85 и стерляди – 60-81%. Таким образом, значения этого важнейшего показателя у всех исследованных видов не имели значимых отличий от современных нормативов [7].

Выводы

1. Применение нанопептида $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$ для индукции спермиации у самцов осетровых рыб обеспечива-

ет продуцирование физиологически полноценных эякулятов, соответствующих по исследованным показателям производственным нормативам и обладающих высокой оплодотворяющей способностью.

2. Использование нанопептида $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$ в условиях аквакультуры достаточно эффективно для гормональной стимуляции созревания самцов таких видов осетровых, как северюга и белуга, до настоящего времени считающихся проблемными.

Таблица

Показатели качества эякулятов

Показатель		Белуга	Русский осётр	Северюга	Сибирский осётр	Стерлядь	
Визуальная оценка эякулята, балл	Lim: min-max	3-5	2-5	3-4	3-5	3-4	
	M±m	3,9±0,3	4,6±0,1	3,5±0,2	4,0±0,6	3,3±0,2	
	Cv±mCv	16,7±5,3	14,5±1,9	14,3±3,8	28,9±10,2	13,6±4,3	
Концентрация спермиев, млрд/см ³	Lim: min-max	0,7-1,8	0,5-6,2	0,9-3,6	0,6-3,7	0,2-0,7	
	M±m	1,1±0,2	1,6±0,2	2,5±0,4	1,9±0,8	0,3±0,1	
	Cv±mCv	40,2±12,7	72,1±9,1	37,5±10,1	82,8±29,3	69,9±22,1	
Спермато-крит, %	Lim: min-max	1,9-6,0	2,6-10,9	2,0-4,7	2-18	2-4	
	M±m	3,9±0,8	5,8±0,3	3,4±0,4	8,5±3,9	2,6±0,4	
	Cv±mCv	47,1±14,9	32,3±4,1	29,1±7,8	92,9±32,8	34,4±10,9	
Активность спермиев	Подвижность, сек. фаза I	Lim: min-max	70-120	28-224	33-120	60-180	60-180
		M±m	87,2±8,9	95,4±9,2	50,9±11,6	135,0±25,9	120,0±18,9
		Cv±mCv	22,7±7,2	54,4±6,8	60,6±16,2	38,5±13,6	35,4±11,2
	Подвижность, сек. фаза II	Lim: min-max	110-540	77-1667	74-480	420-840	300-540
		M±m	269,8±88,3	301,5±75,7	153,6±54,8	660,0±88,3	384,0±44,9
		Cv±mCv	73,2±23,2	112,3±17,8	94,4±25,2	26,8±9,5	26,2±8,3

Список литературы

1. **Баранникова И.А., Тренклер И.В., Дюбин В.П.** Значение метода гормональной стимуляции созревания для сохранения и воспроизводства рыбных запасов // Актуальные проблемы рыбоводства в работах Центральной лаборатории по воспроизводству водных биоресурсов (1938-2008 гг.), к 70-летию работы. - СПб. 2008. С. 17-24.
2. **Гончаров Б.Ф.** Использование метода гипофизарных инъекций в рыбоводстве. Некоторые итоги и перспективы // Исследования размножения и развития рыб. - М.: Наука. 1981. С. 16-48.
3. **Казаков Р.В., Образцов А.Н.** Методы оценки половых клеток рыб: рыболовная оценка спермы // Обзорная информация. Сер. марикультура. ВНИ-ЭРХ. 1990. № 4. С. 1-54.
4. **Лабенец А.В., Чагай В.Н., Шишанова Е.И.** Качество эякулята самцов русского осетра, выращенных в садковом хозяйстве // Мат-лы междунаучно-практ. конф. «Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности» (Москва, 11-13 апреля 2005 г.). Т. 2. - М. 2005. С. 58-63.
5. **Лисин В.И., Сушко А.Б.** Результаты применения Сурфагона в практике искусственного осеменения кроликов // Научно-технический бюллетень ИТ НААН. 2013. № 109 (1). С. 174-181.
6. **Тренклер И.В., Груслова А.Б.** Применение Сурфагона для гормональной стимуляции созревания русского осетра // Мат-лы и докл. междунауч. симп. «Тепловодная аквакультура и биологическая продуктивность водоемов аридного климата» (Астрахань, 16-18 апреля 2007 г.). - Астрахань: Изд-во АГТУ. 2007. С. 371-373.
7. **Чебанов М.С., Галич Е.В.** Руководство по искусственному воспроизводству осетровых рыб. Технические доклады ФАО по рыбному хозяйству и аквакультуре. № 558. Анкара: ФАО. 2013. 297 с.
8. **Scott A.P., Baynes S.M.** A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa // J. of Fish Biol. 1980. Vol. 17. № 6. P. 707-739.

Effect of synthetic nanopptide on spermatogenesis in sturgeons

A.V. Labenets, G.D. Kapanadze, E.V. Bubunets

Single injections of nanopptide $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$ in a dosage of 2 cm^3 of solution concentration of 5 mkg/ml (10 mkg / an individual) steadily induce a sperm allocation at males of sturgeon fishes in the conditions of cultivation. Standard criterions of quality ejaculate and results of functional testing showed their physiological full value and suitability for use in the course of reproduction.

Key words: nanopptide $C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$, sturgeons, induction of a sperm allocation, quality of sperm.