

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

БОЙКО НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТИВНЫХ ФУНКЦИЙ В
РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ РУССКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER
GUELLENSTAEDTII* BRANDT**

Специальность 03 00 13 – «Физиология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук



Санкт - Петербург – 2000

11

Работа выполнена в Азовском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства (ФГУП АЗНИИРХ), г. Ростов-на-Дону и Институте эволюционной физиологии и биохимии им И М Сеченова, РАН, г. Санкт-Петербург

Научные консультанты.

академик РАН
Ноздрачев Александр Данилович,

доктор биологических наук, профессор
Григорьян Роман Ашотович

Официальные оппоненты

доктор биологических наук, профессор
Баранникова Ирина Алексеевна

заслуженный деятель науки,
доктор медицинских наук, профессор
Шалапина Вера Георгиевна

доктор биологических наук, профессор
Пушкарев Юрий Петрович

Ведущая организация: ФГНУ Государственный научно-исследовательский Институт озерного и речного рыбного хозяйства (ФГНУ ГосНИОРХ)

Защита состоится « 22 » мая 2008 года в _____ часов
на заседании Диссертационного Совета Д 212 232 10 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу
г Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7/9 (ауд 90)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им А М Горького при Санкт-Петербургском государственном университете

Автореферат разослан « _____ » _____ 2008 года

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор биологических наук, профессор

Н П Алексеев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Начиная с 60-х годов, популяция осетровых рыб в бассейне Азовского моря поддерживается исключительно за счет искусственного разведения, теоретическая база которого создана многолетними трудами отечественных ученых (Державин, 1947, Гербильский, 1951, 1957, 1962, 1967, Драгомиров, 1953, Баранникова, 1950, 1954, 1975, Детлаф, Гинзбург, 1954; Шмальгаузен, 1968) В последнее десятилетие резкое сокращение объемов искусственного воспроизводства осетровых, наряду с усиленным их выловом вызвало почти полное исчезновение этих ценных видов В условиях ненадежной продуктивности естественного водоема увеличение объемов выпуска молоди, а также формирование культивируемых популяций осетровых рыб невозможно без совершенствования способов, позволяющих сократить потери при выращивании Ранний онтогенез, как известно, характеризуется наибольшей физиологической лабильностью В связи с этим изучение специфики раннего онтогенеза осетровых рыб как периода, где взаимодействие внутренних закономерностей развития с лимитирующими факторами среды имеет решающее значение для жизнестойкости рыб, актуально не только в теоретическом, но и практическом плане

Проблеме адаптаций животных посвящено множество работ, в которых отражены самые разнообразные аспекты этого явления (Краюшкина, 1967, 1983, Ноздрачев и др., 2003, Ноздрачев, Лапицкий, 2005, Озернюк, 2000, Хлебович, 1974, 1981) Исследованиями на высших животных показано участие эндокринной системы в приспособительных реакциях организма в ранние периоды развития (Шаляпина и др., 1995, 2001) В отечественной литературе обсуждалась роль гормональных механизмов в онтогенетических адаптациях рыб Известно, что у осетровых рыб гормональный фон определяет миграционное состояние взрослых рыб (Баранникова, 1975, 1997) Для ранних личиночных стадий костистых рыб доказана определяющая роль гормонального статуса в выборе поведенческой стратегии (Павлов и др., 1997) Возможность рассматривать функциональную пластичность, отнесенную к ранним, постэмбриональным стадиям осетровых рыб, появилась благодаря морфофизиологическим исследованиям возрастных изменений нейроэндокринной системы, связанных с регуляцией активности щитовидной железы и интерреналовой ткани С различных позиций изучены их функции в адаптациях ювенильного периода осетровых рыб (Яковлева, 1970, Яковлева, Ефимова, 1977, Краюшкина, 1967, 1983 Краюшкина и др., 1976) Однако, еще не завершены этапы идентификации физиологических процессов, контролируемых этими гормональными системами у рыб на самых ранних стадиях онтогенеза В частности, до настоящего времени не известно, играют ли гормоны щитовидной железы существенную роль в общем гормональном балансе организма или они поддерживают лишь очень ограниченное число функций по причине слабого морфологического развития органа в этот период

Не изучены морфологические и функциональные последствия гормональных флуктуаций на этом этапе развития. По этой же причине, в применении к осетровым рыбам, пока ограничен набор физиологически адекватных методов коррекции состояния личинок, особенно необходимых в период их наибольшей уязвимости при складывающихся на предприятиях неблагоприятных условиях.

В исследованиях последнего десятилетия показано, что материнские тиреоидные гормоны присутствуют в яйцеклетках рыб. Исследование костистых рыб не дало четкого ответа на вопрос, используются ли они в процессе развития зародыша, также не установлено, влияет ли их количество в генеративной ткани на жизнеспособность потомства.

Одной из важнейших характеристик функционального состояния рыб является их поведение. Поведение личинок и молоди осетровых рыб, во многом, зависит от условий содержания и определяет их жизнестойкость при выпуске в естественную среду обитания (Касимов, 1986). Исследования последнего десятилетия показали, что изменчивость процессов поведения животных, в том числе, рыб, зависит от пластичности обеспечивающих это поведение физиологических систем, особенно, на переломных этапах развития. Ввиду сложности поведения, включающего сенсорную, нервную системы, нейроэндокринное и эндокринное звенья и системы управляемых органов-мишеней, для изучения вклада определенных периодов онтогенеза в его формирование требуется использование экспериментальных моделей с набором четких и поддающихся количественной оценке характеристик этого поведения и где структурная основа достаточно изучена на других объектах. Одним из «каналов», посредством которых ранние этапы развития могут корректировать поведение и, соответственно, экологические взаимоотношения, является память. В применении к осетровым рыбам такие работы нам не известны. В частности, поведение молоди осетровых рыб на химические сигналы рассматривалось вне зависимости от раннего периода развития. Таким образом, одним из теоретически и практически значимых, но наименее разработанных вопросов, является исследование вклада первых дней жизни в характер реакции на химические сигналы, которые могут быть «маркерами» среды и пищи для осетровых рыб. Актуальность задач и необходимость решения поставленных вопросов в целом, предопределило направленность данной работы.

Цель и основные задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение приспособительных реакций личинок осетровых рыб, лежащих в основе их жизнестойкости (изменение показателей роста, показателей крови, поведения) на основе комплексного физиолого-биохимического анализа результатов гормонального и сенсорного воздействий. В связи с этим, были поставлены следующие задачи:

1. В индустриальных условиях на потомствах осетровых рыб различного качества (с различной оплодотворяемостью икры, выживаемостью эмбрионов и личинок, характером морфологического развития, скоростью последующего роста) изучить уровни и динамику тиреоидных гормонов, на экспериментальных моделях изучить влияние тиреоидных гормонов и

кортизола на изменение показателей выживаемости, массы, красной и белой крови

2 В экспериментах на разновозрастных группах осетра оценить вклад предличиночного этапа развития в модификацию поведения молоди в поле «знакомого» химического сигнала (импринтинг химического сигнала среды) Изучить характер поведения молоди в поле химического сигнала после воздействия на личинок специфических (тиреоидные гормоны, тиомочевина) и неспецифических (токсические вещества) факторов, влияющих на содержание в организме тиреоидных гормонов

3 На основе полученных данных сформулировать рабочую гипотезу о значении тиреоидных гормонов на организменном уровне как адаптогенов, определяющих стратегию выживания личинок осетра в критический, переходный период смены условий питания и обитания

4 Провести испытания новых средств коррекции функционального состояния и повышения жизнестойкости личинок осетра в условиях аквакультуры

Экспериментальные исследования выполняли в рамках плановых НИР отдела генетико-биохимического мониторинга АзНИИРХ и по гранту РФФИ № 00-04-96008

Научная новизна. Впервые показано, что у осетровых рыб на ранних стадиях развития нормальный морфогенез обеспечивается колебаниями тканевых концентраций тиреоидных гормонов с наиболее высокими величинами в оплодотворенной яйцеклетке, в период выклева и перехода на активное питание Установлено, что в потомствах высокого и низкого качества различия в содержании отдельных фракций гормонов проявляются именно в эти периоды Впервые получены свидетельства активизации щитовидной железы и интерреналовой ткани у предличинок осетра на основании биохимических показателей, а также установлена сопряженность изменений гормонального фона с показателями роста и жизнестойкости, которые удалось оценить с количественной стороны в опытах с применением гормональных воздействий

Впервые показано, что в раннем онтогенезе у осетра формируется адаптация поведенческого уровня - запечатление химического фона среды, приуроченная к периоду созревания периферического отдела обонятельного анализатора, до того, как система в целом, получит окончательное развитие Произведено сравнение данной адаптации с импринтингом у других животных Показано, что у осетра верхняя граница чувствительного периода зависит от уровня тиреоидных гормонов

Теоретическое и практическое значение работы. Теоретическое значение работы состоит в углублении представлений о критическом периоде в раннем онтогенезе осетра, рассмотрении его как этапа, в который гормональные и сенсорные воздействия определяют уровень приспособительных изменений, необходимых для успешного выживания молоди Установление границ этого периода позволило разработать подходы, направленные на нейтрализацию негативных процессов при выращивании осетровых рыб

Способность осетра к адаптивному изменению поведения, аналогичному импринтингу у высших животных, открывает возможность для дальнейшего изучения влияния раннего опыта на пищевое поведение рыб, а также на формирование приспособительных механизмов популяционного уровня, в том числе, миграционного (хордингового) поведения. С практической точки зрения возможность химического фона среды обитания личинок изменять поведение молоди, выращиваемой в индустриальных условиях, позволяет совершенствовать технологию кормления, в частности, повышением привлекательности искусственного корма за счет ранней адаптации. Отсутствие или пониженная способность к сохранению и воспроизведению изученного адаптивного навыка у потомства при неблагоприятных условиях выращивания несет информацию о скрытых необратимых нарушениях ведущей аналитической системы личинок рыб. Это позволяет использовать критерий импринтинга для оценки качества выращиваемой в индустриальных условиях молоди осетра и при разработке корректирующих технологий, в том числе, гормональных воздействий.

На основании исследований создана и защищена патентом методика оптимизации процесса подраживания личинок осетровых рыб методом кратковременных воздействий с применением тиреоидных гормонов.

Основные положения, выносимые на защиту.

1 У осетра от оплодотворенной яйцеклетки до питающейся личинки тканевое содержание тиреоидных гормонов характеризуется волнообразными колебаниями. У потомств с наименьшим количеством уродств развития и более высоким темпом роста в период активного питания на стадии оплодотворенной яйцеклетки и на этапе смешанного питания установлены достоверно более высокие показатели тироксина.

2 Период, от которого зависит модификация поведения осетра в поле химического стимула, совпадает с предличиночным этапом развития. Поведенческая реакция имеет признаки импринтинга и чувствительна к тиреоидным гормонам, специфическим и неспецифическим токсическим воздействиям.

3 Созревание гормонозависимых функциональных механизмов приурочено к концу предличиночного развития и маркируется наибольшими показателями тироксина, кортизола и циклического аденозинмонофосфата.

4 Физиологический эффект тиреоидных гормонов на критическом этапе перехода от смешанного к активному питанию складывается из нескольких составляющих: изменение уровня биорегуляторов (тироксина, трийодтиронина, кортизола, циклического аденозинмонофосфата), морфологических (показателей роста, смертности, перераспределение клеточного состава крови) и поведенческих (запечатление химического фона среды) параметров.

Апробация работы.—Результаты по теме диссертации были заслушаны и обсуждены на отчетных сессиях Ученого Совета АзНИИРХ (Ростов-на-Дону, 1993, 1996, 2001-2006), X Всесоюзном совещании, посвященном памяти академика Л.А. Орбели (Ленинград, 1990), II Международном симпозиуме по

осетровым рыбам (Москва-Кострома, 1993), заседаниях Всероссийского общества физиологов, гистологов и эмбриологов (СПб, 1994, 2000, 2002), Международном симпозиуме «Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре» (Адлер, 1999), Всероссийской научной конференции Администрации Краснодарского Края (р2000юг, Сочи, р2001юг, Небуг), Международной конференции «Проблемы сохранения экосистем и рационального использования биоресурсов Азово-Черноморского бассейна» (Ростов-на-Дону, 2001г), Международных конференциях «Нейроэндокринология 2000», «Нейроэндокринология 2003» (СПб, 2000, 2003), Международной конференции «Физиология и биохимия водных организмов» (Петрозаводск, 2004)

Структура и объем диссертационной работы. Текст диссертации содержит 229 стр машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, трех разделов собственных экспериментальных данных, общего заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 194 отечественных и 238 зарубежных источников. В работе представлено 36 рисунков и 22 таблицы.

В сборе и обработке материала, а также в постановке экспериментов принимали участие сотрудники АзНИИРХ, которым соискатель выражает свою искреннюю признательность. Особую благодарность соискатель приносит руководству АзНИИРХ и в особенности, д б н Э В Макарову за постоянную поддержку в выполнении этой работы. Автор бесконечно благодарен научным консультантам за разработку плана исследований, ценные советы и рекомендации.

По теме диссертации опубликовано 43 работы, список основных публикаций содержит 23 статьи, в том числе, 1 патентное свидетельство.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Организация и методы исследования

Опытный материал. Сбор материала и основные экспериментальные исследования по теме диссертации проводили с 1989 по 2004гг. Исследования проводили на трех представителях осетровых рыб: русском осетре *Acipenser gueldenstaedti* Brandt (разделы 1 - 3), севрюге *Acipenser stellatus* Pall (подраздел 1.1) и гибриде белуга х стерлядь (бестер) *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* (подраздел 2.4). Материал для исследований получали из морских уловов (самки осетра, 13 экз) (кровь, генеративная ткань) и на рыбоводных заводах (самки осетра, 38 экз, самки севрюги, 6 экз) (кровь, генеративная ткань, эмбрионы, личинки). Материал для сравнительного анализа (эмбрионы, личинки, молодь), инкубировали и выращивали в одни и те же сроки. Общее количество личинок и молоди, использованных при наблюдениях и экспериментальных исследованиях, в том числе исследованиях поведения, составило 8474 экз.

Биологический анализ. Морфологические исследования проводили в заводских и лабораторных условиях на фиксированных в 4%-ном растворе формальдегида объектов с помощью бинокулярного микроскопа МБС-1 по общепринятым в ихтиологии методикам (Детлаф и др., 1981)

Гематологический анализ Форменные элементы белой и красной крови в окрашенном мазке с подсчетом лейкоцитарного состава и интенсивности эритропоза оценивали, согласно принятым в ихтиологических исследованиях критериям (Головина, 1975, Житенева и др., 1989) При изучении гранулоцитов учитывали сдвиги ядер, показатели, отражающие процент незрелых клеток При подсчете эритроцитов оценивали процентный состав незрелых форм и патологически измененных клеток

Гистологический анализ Проводили методом световой микроскопии (микроскоп «Оlympus», Япония) окрашенных смесью Маллори парафиновых срезов образцов тканей желудка после фиксации и обезвоживания (Волкова, Елецкий, 1971) Цитометрическое исследование проводили с помощью окуляр-микрометра

Биохимический анализ Экстракцию гормонов производили этанолом из замороженных при $-40 - -60^{\circ}\text{C}$ проб, содержащих 5 - 15 произвольно выбранных живых экземпляров (яйцеклеток, эмбрионов и личинок) в 3-5 повторностях, с последующим центрифугированием, высушиванием экстракта и разведением, согласно методикам Kobuke et al (1987) и de Jesus et al (1990) При определении циклического нуклеотида (сАМР) гомогенаты готовили с добавлением ЭДТА Показатели оценивали радиоиммунологическим методом наборами фирмы IMMUNOTECH, Франция и частично, наборами РИО-ТЗ-ПГ, РИО-Т4-ПГ производства Республики Беларусь

Методы гормонального воздействия Воздействие на личинок производили в хроническом и краткосрочном режиме В хронических экспериментах предличинок обрабатывали 40 нМ тироксином или 5 нМ трийодтиронином в сочетании с ингибитором функции щитовидной железы (тиомочевинной, 0,035%) Краткосрочное воздействие производили согласно модифицированному методу Kim, Brown (1997), погружая рыб на 1 час в воду с тироксином (Т4) или трийодтиронином (Т3) в комплексе с кортизолом или обработку только кортизолом или Т3· Т4 (1,5 мг/л) + кортизол (1,0 мг/л), на стадии 38, 41, 44 и в возрасте 3 дня после начала питания, Т4 (1,5 мг/л), Т4 (1,5 мг/л)+кортизол (30 мг/л), на стадии 44, Т3 (1,5 мг/л) + кортизол (1,0 мг/л), на стадии 38, 41, 44, Т3 (0,15 мг/л), на стадии 44, кортизол (1,30,100 мг/л) на стадии 44 Использовали препараты левотироксина натрия или левотрийодтиронина натрия, производство Berlin Chemie, Германия, гидрокортизона ацетата, производство Россия Контролем служили особи той же возрастной группы и взятые из той же партии, что и опытные

Воздействие токсическими веществами на личинок проводили в лабораторных условиях в хроническом режиме Хлороорганический пестицид линдан (гексахлоран) использовали в сублетальных концентрациях 0,05, 0,1 и

0,5 мг/л, водную вытяжку из нефти на уровне хронического и сублетального воздействий - 1 и 5 мг/л. Препараты вносили в аквариумы за сутки до опыта, а концентрации веществ поддерживали на постоянном уровне в течение эксперимента.

Изучение поведения. Опыты по изучению параметров двигательной активности молоди осетра, адаптированной к химическому модельному сигналу включали подготовительный и тестовый период. На подготовительном этапе производили выбор оптимальных параметров химической стимуляции применительно к данному виду рыб с определением порога химической чувствительности условнорефлекторным методом. В качестве модельного сигнала использовали морфолин. Адаптацию личинок к морфолину проводили в проточных бассейнах на рыбоводном предприятии или в непроточных емкостях в лабораторных условиях. Результаты оценивали после перерыва (3-9 недель) в экспериментальной камере методом визуального группового тестирования (Касумян, Пономарев, 1986), с регистрацией реакции рыб на фоновом, стимульном и постстимульном интервалах. Показатели реагирования каждой группы рыб суммировали по вертикали для всего массива данных по каждому интервалу отсчета и определенному виду стимула. Общую интенсивность реакции определяли как отношение средних значений на стимульных и постстимульных интервалах к среднему значению фона и выражали в процентах.

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением стандартных статистических методов t-критерия Стьюдента, непараметрического критерия (λ) Колмогорова-Смирнова, корреляционного анализа - вычислением порядкового коэффициента (R) Спирмена, пакетов программ Statistics for Windows и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Закономерности изменения некоторых гормональных показателей и структурно-функциональные параметры осетра на начальных этапах развития

1.1. Изменение показателей тиреоидных гормонов у самок осетровых рыб в генеративной ткани на различных стадиях созревания и в период эмбрионального развития

В литературе рассмотрены многообразные физиологические функции тиреоидных гормонов в онтогенезе осетровых рыб, обычно, отнесено к периоду, связанному с активностью щитовидной железы (Яковлева, 1952, 1964, 2000, Яковлева, Кузик, 2005, Лагунова, 1977, Баранникова, 1975, Баранникова и др., 1981). Но тиреоидные гормоны имеются у рыб уже на стадии яйцеклетки и эмбриона (Kobuke et al., 1987, Brown et al., 1987, Tagawa et al., 1990). Была поставлена задача выяснить, содержат ли яйца осетровых рыб тиреоидные гормоны, а также несут ли они какую-либо функциональную нагрузку до начала работы щитовидной железы.

В генеративной ткани на стадии протоплазматического роста содержание Т4 составляло $5,46 \pm 0,98$ нг/г и таким образом, может быть сравнимо с уровнем тироксина в мышечной ткани ($5,8$ нг/г). В период трофоплазматического роста показатели в гонадах увеличивались, причем, от III-IV к IV стадии в яйцеклетки поступало более половины от общего количества гормона, а у самок с гонадами в IV стадии (находящихся в состоянии нерестовой миграции), содержание тироксина оказалось на уровне $18,4 \pm 2,8$ нг/г.

Тканевые концентрации тиреоидных гормонов в яйцеклетках IV стадии зрелости у осетра сопоставимы с таковыми у севрюги Т4 - $18,4$ нг/г (осетр) и $19,1$ нг/г (севрюга), Т3, соответственно - $2,1$ нг/г и $3,7$ нг/г.

В крови осетров уровень тироксина максимален, когда яйцеклетки находятся в процессе трофоплазматического роста ($26,5 \pm 3,3$ нг/мл). По достижении IV стадии зрелости гонад в крови самок осетра регистрировались весьма низкие показатели тироксина - $8,2 \pm 0,9$ нг/мл.

При созревании гонад (переходе ооцитов осетра из IV в V стадию) в них увеличивается количество Т4. Это показало сравнение величин гормонов в яйцеклетках у двух групп самок с гонадами IV и V стадий зрелости (после овуляции яйцеклеток) в первой группе наблюдалось увеличение гормона от $18,7 \pm 3,4$ нг/г до $31,1 \pm 6,0$, во второй - от $15,4 \pm 2,4$ нг/г до $20,7 \pm 4,8$ нг/г. «Расходование» тиреоидных гормонов в период эмбриогенеза у осетровых рыб становится очевидным при сравнении нормальных и партеногенетически дробящихся яиц (данные на севрюге). В атипично развивающихся зародышах содержание тиреоидных гормонов не менялось на протяжении более чем 40 часов с периода закладки икры в аппараты, в противоположность нормально развивающимся зародышам, у которых к 29-30 стадиям развития показатели Т4 снизились более чем в 4 раза, а Т3 в 1,5 раза.

Установлено, что в эмбриогенезе у осетровых (осетр) происходит снижение индивидуальной изменчивости по исследуемым показателям на стадии оплодотворенной яйцеклетки. Варьирование показателей относительно высокое - (CV) от 51,5% (Т4) и 53,6% (Т3), но уменьшается до 28,0% (Т4) и 37,1% (Т3) на стадии выклева.

Дальнейшие исследования были направлены на то, чтобы установить, в какой степени различия в уровнях гормонов у зародышей связаны с их жизнеспособностью и как эти различия могут повлиять на выживаемость, рост и адаптационные возможности выклюнувшихся личинок.

1.2. Некоторые характеристики развития предличинок осетра при различном содержании в организме тиреоидных гормонов

В двух сериях экспериментов (I и II) на осетре изучали динамику тиреоидных гормонов в потомствах с различной степенью оплодотворяемости икры, а также рассмотрели некоторые морфологические показатели развития в зависимости от исходного качества материала. В икре с высокой оплодотворяемостью (соответственно, 89-80%) средние величины Т4 составили $0,22$ нг и $0,34$ нг на яйцеклетку. При оплодотворяемости яйцеклеток 55-30% -

0,15нг и 0,17 нг ($p < 0,05$) Уровни Т3 составили 0,017 нг и 0,025 нг, (оплодотворяемость 89 и 80%), 0,012 нг и 0,018 нг, (оплодотворяемость 55 и 30%) ($p > 0,05$) Таким образом, половые продукты, где большая часть икринок полноценно развивалась, в среднем содержали в 1,46-2 раза больше Т4

В эмбриогенезе в обоих случаях значения показателей Т4 и Т3 были минимальными к периоду появления пульсации сердца (стадии 29-30), к этому же периоду оба вида гормона снизились в два раза и более Почти во все сроки эмбриогенеза наблюдался параллелизм в изменениях уровней Т4 и Т3 Он нарушался к концу эмбриогенеза, что, возможно, результат активации дейдирующих ферментов в связи с изменением уровня метаболизма При этом зародыши из потомств низкого качества на стадии выклева имели в 1,36 раза большие показатели Т3 (Рис. 1)

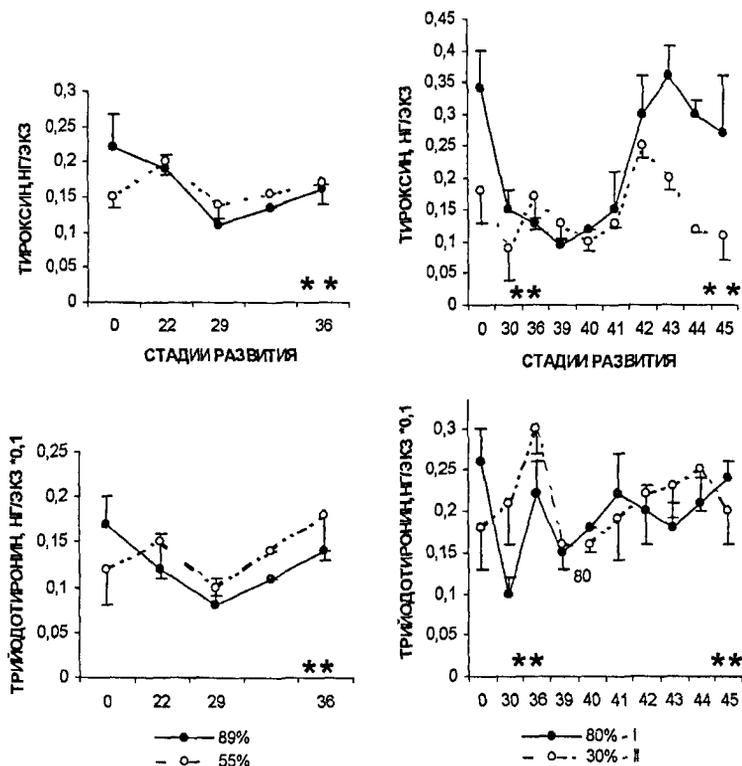


Рис. 1 Динамика тиреоидных гормонов у осетра в период раннего развития Слева - эксперимент I, справа - эксперимент II (**) - время выклева и начала питания

После вылупления личинок начало подъема Т4 совпадало с периодом развития жаберного дыхания и роста потребности в кислороде (ст 40) Наиболее высокие показатели Т4 (но не Т3) оказались в конце периода смешанного питания, непосредственно перед переходом на активное питание (ст 43-44) В эти сроки обе партии различались по показателям Т4 в потомствах высокого качества они были достоверно выше (на 50%)

Указанные отклонения в содержании гормонов на переломных стадиях у «некачественного» потомства коррелировали с нарушениями морфологического развития увеличением, в сравнении с нормой, доли аномальных зародышей (с 14% до 54%), смертности за эмбриональный (с 21% до 73%) и постэмбриональный (с 15 % до 40%) периоды Личинки отставали в развитии, в начальный период активного питания характеризовались значительной смертностью (50%) и двукратным отставанием по массе тела Смертность была связана с большим числом морфологических дефектов, обнаруженных, в основном, в пищеварительной системе Сделано предположение, что более высокие уровни тиреоидных гормонов на «переломных» стадиях развития оплодотворения (Т4 и Т3), и перехода на активное питание (Т4) могут быть позитивными показателями, влияющими на ход развития в последующий период Дальнейшие этапы работы связаны с поиском дополнительных морфофункциональных коррелятов гормональных изменений

1.2.1 Оценка изменений содержания тиреоидных гормонов в тканях предличинок осетра при воздействии некоторых токсических веществ антропогенного происхождения

Снижение качества потомства при индустриальном выращивании осетровых рыб происходит не только вследствие нарушений биотехнических норм при получении икры, но и в том числе, при антропогенном загрязнении водной среды. В хроническом эксперименте на предличинках осетра оценено влияние нефтяного и пестицидного загрязнений на динамику тиреоидных гормонов

Эффект воздействия линдана (0,05 и 0,5 мг/л) и нефти (0,5 и 5 мг/л) зависел от дозы и выражался в фазовых сдвигах динамики тироксина (преимущественно, на более ранние стадии развития), при максимальных дозах вызвавших в завершающий период предличиночного развития уменьшение абсолютных величин Т4 до 35 % (линдан) и до 39% (нефть) и отклонение от нормы Т3/Т4

1.3. Изменение уровней тканевого кортизола у осетра на ранних этапах личиночного развития

Известно, что у личинок осетровых рыб интерренальная ткань, продуцирующая кортизол, активизируется в первые дни развития (Бараникова, 1974, 1975) Мы обнаружили волнообразное изменение общетканевых показателей кортизола на выклеве содержание гормона

невелико - $0,036 \pm 0,007$ нг Кортизол начинает увеличиваться только на 3-й-4-й дни, после 39-й стадии и наиболее интенсивно суммарный уровень гормона растет во второй половине срока. Максимальные величины - на 43-44 стадиях, на 8-9 дни. При стрессорном воздействии (обработка тиомочевинной) максимальные показатели кортизола увеличивались более чем в полтора раза со смещением максимума на более ранние сроки (стадии 40-41). Величины кортизола возвращались к норме, если личинок обрабатывали одновременно ингибитором и ТЗ.

Таким образом, результаты подтвердили данные гистоморфологии о раннем проявлении функциональной активности интерреналовой ткани и ее способности реагировать на внешние воздействия, что предполагает участие центральных механизмов в этот период (Баранникова, 1974). Показано, что до начала активности интерреналовой ткани у личинок имеется гормональный «резерв», источником которого служит кортизол яйцеклеток. Особенностью тканевой динамики кортизола у предличинки осетра является ее волнообразный характер и соответствие динамике тироксина.

1.4. Оценка некоторых морфологических дефектов развития предличинки осетра в условиях пониженного и повышенного содержания тиреоидных гормонов в организме

Задача состояла оценить частоту появления дефектов морфологического развития у питающихся личинок осетра при изменении содержания тиреоидных гормонов в тканях на этапе желточного питания - при хронической обработке от выклева до перехода на активное питание тиомочевинной, либо тиомочевинной и одной из форм тиреоидных гормонов Т4 или Т3. В условиях гипотиреоза (снижение Т4 до 31%) в 100% случаев наблюдалось замедление резорбции желтка, при этом аномалии развития пищеварительной системы, в том числе, недоразвитие спиральной кишки или ее укорочение могло составлять до 30% случаев. Дефекты перегородки обонятельной капсулы наблюдались также у 30% рыб, а у 10% рыб имела место деформация туловища. Указанные дефекты отсутствовали, если рыб обрабатывали тиомочевинной на фоне поддерживающих концентраций тиреоидных гормонов, вызвавших их двукратное увеличение в тканях. В этом случае скорость развития не отличалась от контрольной, но обнаруживались дефекты развития покровных тканей, в том числе, нарушение пигментации - свидетельство нарушения функционирования меланофоров (17%), а также формирования плавников (30%). Обработка гормонами вызвала гипертрофию слизистого и мышечного слоев желудка. В целом, опыты показали, что при воздействии тиреоидными гормонами на фоне подавления функции щитовидной железы тиомочевинной не удается полностью воспроизвести пререстройки, характерные для нормального морфогенеза. Это согласуется с результатами биохимического анализа, которые свидетельствуют, что процессы нормального развития осетровых рыб на начальной стадии онтогенеза обеспечиваются меняющейся

концентрацией тироксина в организме. Полученные в совокупности данные позволили изменить направление дальнейших экспериментов и проводить их в режиме, когда исключалось равное по интенсивности гормональное воздействие во все сроки развития предличинок осетра.

2. Поиски корректирующих методов воздействия на личинок осетровых рыб с целью улучшения показателей жизнестойкости

2.1. Динамика циклического аденозинмонофосфата у предличинок осетра и его изменение при гормональной стимуляции

Увеличение концентрации циклического аденозинмонофосфата (сАМР), как и других «вторичных мессенджеров», является импульсом для изменений в ответ на действие гормонов. В наших исследованиях определение содержания гормонов у личинок осетра технически было возможно только в целом организме, включая эндокринные железы. Поэтому показатель сАМР использовали для доказательств того, что гормоны в этот период поступают в общую циркуляцию организма и принимают участие в метаболических процессах, а также для уточнения временных границ периода их функционального действия. Изучали динамику содержания сАМР в предличиночный период, а также изменение сАМР после однократной обработки личинок тиреоидными гормонами и кортизолом. Результаты анализа содержания сАМР показали, что от 38 к 44 стадии у предличинок наблюдалось десятикратное увеличение показателя сАМР, который снижался к 9-10-м дням развития (Рис. 2).

Обнаружена зависимость направленности эффекта гормонального воздействия от возраста (стадии морфологического развития). Если у двухдневных личинок (ст. 38) Т4 вызывал немедленное и стойкое снижение концентрации сАМР (на 38% и на 22 % в начале и конце суточного периода), то на стадии 44 в ответ на обработку Т4 наблюдалось слабое увеличение сАМР (почти на 10%).

пкмоль на 1 мг белка

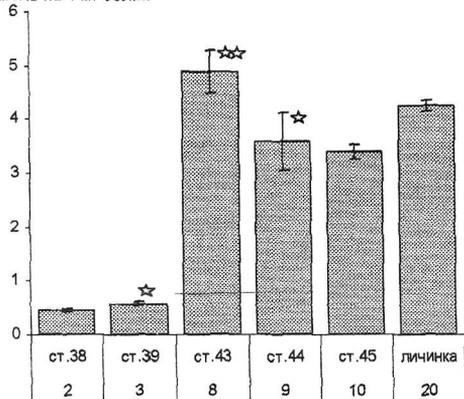


Рис. 2. Динамика суммарной тканевой концентрации сАМР у личинок осетра

Реакция усиливалась ($p < 0,05$) если производили обработку предличинок одновременно Т4 и кортизолом (увеличение на 6% и 32%). Таким образом, у осетра изменение уровней сАМР может быть расценено как

функциональный ответ организма на запрограммированное изменение тканевых концентраций гормонов

2.2. Количественная оценка некоторых морфофизиологических показателей у осетра после кратковременного гормонального воздействия

С учетом полученных наблюдений и экспериментальных данных мы считали оправданным проведение модельных экспериментов, при которых воздействие на личинок осетра было кратковременным. Личинок осетра обрабатывали гормонами на различных стадиях и в сроки, совпадающие высокими и низкими фоновыми уровнями тироксина и кортизола

2 2 1 Изменения морфологических показателей личинок осетра после гормонального воздействия

Через сутки после воздействия содержание Т4, Т3 и кортизола в теле у обработанных гормонами личинок не отличались от контрольных вариантов

Анализ молоди, произведенный через 22 дня после воздействия, показал, что комплекс, содержащий тиреоидные гормоны и кортизол, вызвал наиболее существенные увеличение показателей массы, если воздействие производили на ст 44 – увеличение на 59% (Т4) и 61% (Т3). После обработки на ст 38 показатель массы уменьшался соответственно на 50% и 47%. У молоди, которую обрабатывали через трое суток после начала активного питания, не наблюдалось изменений в массе. Почти во всех случаях показатели смертности молоди изменялись в противоположном направлении: наименьшая после обработки личинок на ст 44 - на 38% (Т4) и 49% (Т3), а наибольшая - в группах, обработанных таким же образом на ст 38 - увеличение на 120% (Т4) и 159% (Т3)

Кортизол в концентрации 1 мг/л (дозировка, использованная в гормональном комплексе с тиреоидными гормонами) самостоятельно не влиял на рост и выживаемость, а в концентрации 100 мг/л приводил к снижению массы и увеличению смертности

Гистологический анализ выявил у молоди осетра после воздействия тиреоидными гормонами на стадии 44 гипертрофию энтероцитов в пилорическом отделе желудка - от $23,10 \pm 0,89$ мкм до $39,63 \pm 0,68$ мкм, при этом не наблюдалось гипертрофии мышечного слоя

2 2 2 Показатели тиреоидных гормонов и кортизола в тканях у молоди осетра после гормонального воздействия на стадии 44

Стимуляция тироксином привела к снижению концентраций «общего» и «свободного» Т4, с одновременной тенденцией к увеличению «общего» количества Т3. В противоположность этому, у рыб, обработанных фармакологическими дозами кортизола, не произошло изменений «общего» Т4. Между массой тела рыб и соотношением «общих» значений Т3/Т4 установлена положительная связь $R=0,69$, $p=0,012$

У личинок, обработанных T4 или гормональным комплексом в тканях резко снизилось содержание кортизола, которое составило 13-10% от контрольного уровня

2 2 3 Изменение показателей крови у молоди осетра в результате гормонального воздействия

Показатели клеток красной и белой крови, реагируя изменением соотношения между отдельными формами клеток и интенсивностью лимфо-, грануло- и эритропоза, адекватно отражают функциональное состояние рыб (Микряков и др., 2001). Повышение доли лимфоцитов и моноцитов при относительном снижении гранулоцитов - нейтрофилов и эозинофилов - свидетельствует о высоком иммунном статусе, смещение баланса показателей белой крови в сторону гранулоцитов, является отражением неблагоприятных изменений в организме. Гормональная обработка с применением тиреоидных гормонов еще не питающихся личинок, а также на начальном этапе активного питания приблизила лейкоцитарный состав и показатели красной крови у молоди к так называемой «норме» - набору гематологических показателей, отражающему наиболее благополучное физиологическое состояние растущей бассейновой молоди осетра (Гершанович и др., 1987, Житенева и др., 1997). Так, у молоди осетра, прошедшей гормональную обработку на 44 стадии к концу эксперимента произошел сдвиг в лейкоцитарном составе крови в сторону увеличения доли лимфоцитов от $28,9 \pm 7,7$ % в контроле до $59,5 \pm 4,7$ % после обработки комплексом и уменьшения доли эозинофилов до $11,0 \pm 4,1$ % причем, изменения увеличивались с возрастом. В это же время у контрольных рыб к концу эксперимента проявилась значительная эозинофилия ($45,0 \pm 10,9$ %), обусловленная аллергизацией организма и вызванная длительным пребыванием рыб в замкнутом пространстве аквариума.

Анемия, как проявление патологии клеток красной крови, часто наблюдается при ухудшении условий выращивания рыб и является результатом снижения процесса генерации молодых клеток, а также следствием гемолиза - разрушения мембран эритроцитов. Последнее, в частности, происходит при снижении активности антиоксидантной системы и смещения равновесия в сторону свободнорадикальных процессов, а также при введении аллергенов. В наших опытах интенсивность эритропоза усиливалась и приближалась к «норме» для данного возраста ($20,3 \pm 0,3$ %) только после обработки комплексом (на 44 стадии и через три дня после начала выращивания) и зависела от стимуляции тироксином.

Перераспределение соотношения клеток крови может быть связано с изменениями на нескольких уровнях организации, одним из которых может быть влияние на их созревание. Косвенным показателем ускорения процессов дифференцировки в наших опытах является смещение соотношения гранулоцитов у обработанных гормонами рыб в сторону более зрелых форм (Рис 3). В целом, результаты эксперимента показали, что на предличиночном этапе развития организм рыб реагирует на изменение содержания в организме

тиреоидных гормонов и кортизола изменениями морфофункциональных показателей. В завершающий период развития повышение тиреоидных гормонов вызывают длительные изменения в гормональном балансе организма и стимуляцию роста. Обнаружен противоположный эффект действующих доз тиреоидных гормонов и кортизола на рост рыб, смертность, и однонаправленный эффект на систему клеточной защиты организма.

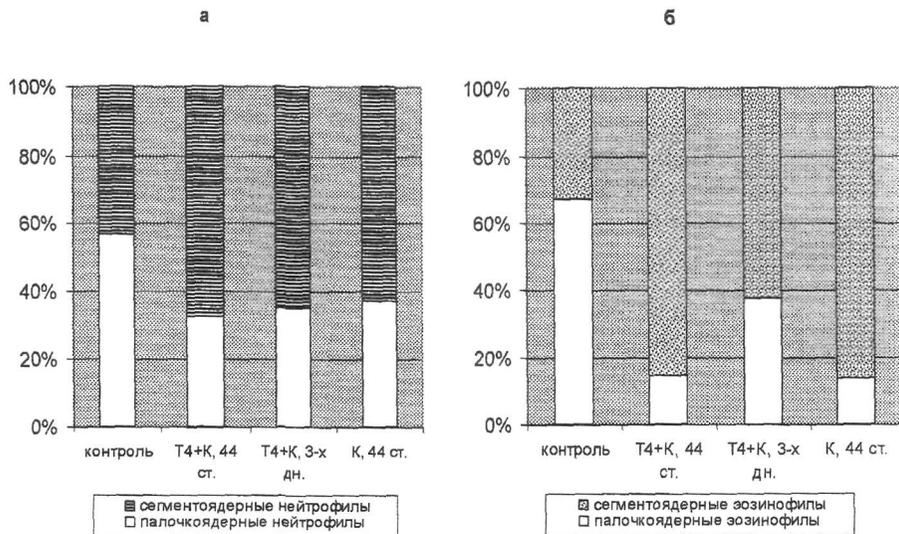


Рис. 3. Соотношение палочкоядерных (а) и сегментоядерных (б) гранулярных лейкоцитов крови молоди осетра после гормональной обработки предличинки на 44 стадии.

2.3. Реакция клеток крови пораженных сапролегниозом личинок осетра на кратковременное гормональное воздействие

Эксперимент включал контрольную и опытные группы рыб, на которых воздействовали: T4 (1,5 мг/л), T4 (1,5 мг/л)+кортизол (30 мг/л) или кортизол (100 мг/л) на ст. 44. У контрольных личинок осетра поражение сапролегниозом зафиксировано на 14-е сутки и идентифицировано по наличию зооспорангиев и гифов гриба, которые попали в образцы при взятии крови и были выявлены при микроскопическом исследовании мазка. В эритроцитах зараженных рыб обнаружены семь видов патологий, в том числе, обусловленных сопутствующей инфекцией (Головин, Головина, 2000). В то же время лейкоцитарный состав крови находился в пределах нормы, что согласуется с литературными данными об отсутствии реакции на патогенный фактор при

грибковых инфекциях рыб (Нейш, Хьюз, 1984) Во всех случаях применения гормонального воздействия внешних признаков заражения не обнаружено

Обработка Т4 стимулировала нейтрофилию, что вызвано миграцией гранулоцитов к участкам повреждения тканей в период воспаления и некроза и является важным фактором активизации защитных реакций организма, направленных на ликвидацию поврежденных клеток В отличие от необработанных рыб, из семи видов патологий эритроцитов отсутствовали шесть снизилось относительное число патологически измененных эритроцитов и видов патологий После гормонального воздействия одновременно Т4 и кортизолом рыбы находились на более продвинутой стадии борьбы с заболеванием и характеризовались полным отсутствием патологически измененных клеток Лейкоцитарная формула соответствовала норме Результаты опытов подтвердили адекватность применяемых на стадии активного питания методов гормонального воздействия для улучшения функционального состояния рыб и показали, что тиреоидные гормоны и кортизол на критическом этапе перехода к активному питанию повышают устойчивость организма к неблагоприятным факторам среды

2.4. Содержание тиреоидных гормонов у беспозвоночных, являющихся кормовыми организмами для осетровых рыб

У представителей из отряда Cladocera дафнии (*Daphnia*), отряда Copepoda циклопы (*Cyclops*), сем Chironomidae личинки хирономуса, (*Chironomus*) и кл Oligochaeta олигохет (*Tubifex*) тканевые уровни Т4 колебались от $17,3 \pm 0,2$ нг/г (олигохеты) до $73 \pm 0,4$ нг/г (личинки хирономид), Т3 - от $0,33 \pm 0,05$ нг/г (циклопы) до $1,41 \pm 0,2$ нг/г (личинки хирономид) Проведенный параллельно анализ гормонов у осетра (ст 44) подтвердил, что показатели сопоставимы с величинами гормонов у личинок осетра на стадии активного питания $19,5 \pm 0,4$ (Т4) и $0,8 \pm 0,01$ (Т3)

У личинок бестера, потреблявших личинок хирономид и дафний, соотношение форм тиреоидных гормонов (Т3/Т4) оказалось на 60 % выше, чем в случае кормления комбикормом и синхронизировано с показателем массы потребления личинками живого корма только в течение трех дней с момента перехода на активное питание привело к различиям в массе тела личинок в 20% Таким образом, личинки осетровых рыб на начальном этапе питания могут пополнять свой гормональный «пул» за счет тиреоидных гормонов, содержащихся в планктонных и бентосных организмах

3. Количественная оценка опыт-зависимых изменений поведенческой реакции молоди при восприятии химических сигналов среды на ранних этапах жизненного цикла

У животных наступление «критического периода» подразумевает не только смену морфологических, биохимических характеристик, но и переход к новой стратегии поведения С понятием «критический период» тесно связано такое явление, как импринтинг сенсорных стимулов, который занимает

центральное место в проблеме онтогенеза поведения животных У осетровых рыб прежде не рассматривались вопросы пластичности поведенческих функций, отнесенных к раннему периоду онтогенеза

3.1. Изменение характера поведения молоди осетра в зависимости от предварительной адаптации в поле химического модельного стимула (морфолина)

Качественное и количественное выражение реакции молоди на химический сигнал зависело от сроков и длительности предварительной адаптации этому сигналу, а также от его интенсивности При минимальном сроке адаптации (с 1 по 4-й дни после выклева) реакция составляла 93% от фона ($p < 0,05$) (избегательная реакция), что аналогично неадаптированному контролю (81%) Сдвиг реакции в сторону привлечения, по сравнению с фоном, обнаружен у личинок, адаптированных с 6-го по 10-й дни (134%), а также при увеличении срока адаптации до 10 и 18 дней, начиная от выклева – соответственно 151% и 224% ($p < 0,001$) Интенсивность реакции на концентрацию 10^{-9} М была выше, чем на 10^{-8} М Различия в интенсивности поведенческого ответа на разные концентрации сигнала наиболее значительны (на 86%) при самой продолжительной адаптации к химическому сигналу ($p < 0,001$) Результат адаптации к химическому сигналу после 25-го дня развития, независимо от срока выдерживания личинок при тестировании был оценен как привыкание поведение молоди на стимульном 104% (8 дней) и 105% (30 дней) и фоновом (100%) интервалах не различалось (Рис 4)

Реакция предпочтения химического фона рыб, зависит как от внешних, так и гормональных влияний (Hasler, Scholz, 1983, Nevitt, Dittman, 1994) Это обусловило направление дальнейших исследований, в которых поведение, зависимое от предварительной адаптации к химическому сигналу, изучали при специфическом и неспецифическом воздействии химических агентов, вызывающих изменение уровня тиреоидных гормонов в период адаптации

3.2. Влияние линдана и водорастворимых фракций нефти на поведенческую реакцию молоди осетра, связанные с «химическим опытом» в ходе личиночного развития

Воздействие линданом в концентрациях (0,1 мг/л и 0,5 мг/л) и нефтью (5 мг/л) в чувствительный для запоминания химических стимулов период приводило к тому, что рыбы демонстрировали индифферентную реакцию В случае воздействия любого из токсикантов в нечувствительный период положительная реакция сохранялась, хотя ее интенсивность была меньше контрольной После воздействия линданом интенсивность реакции составила 123%, что существенно отличалось от поведения после воздействия в чувствительный период ($p < 0,001$), после воздействия нефти - 120% ($p < 0,05$) Таким образом, тестирование молоди, обработанной токсикантами в различном возрасте, показало необратимость повреждающего воздействия линдана и

нефти в предличиночный период развития в сравнении с более поздним периодом

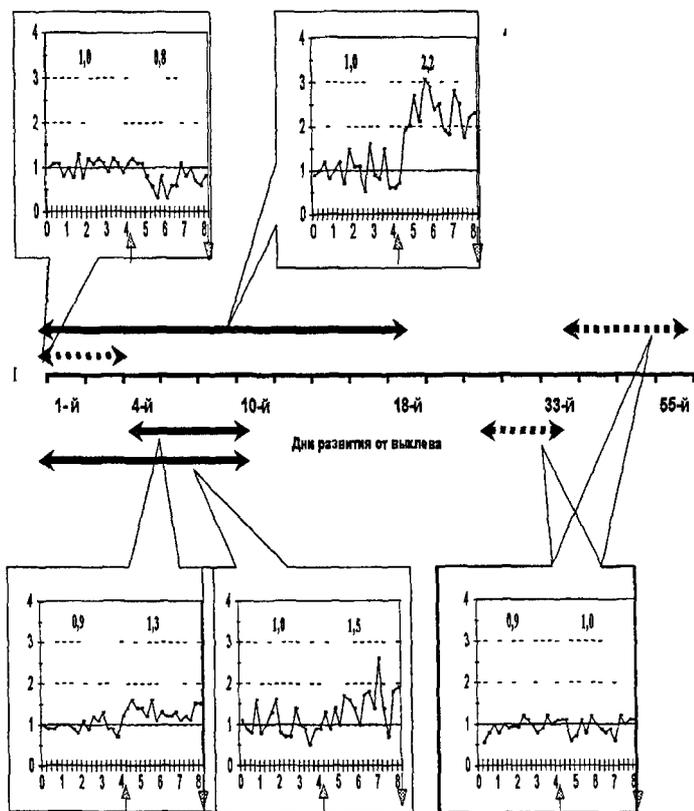


Рис. 4. Динамика двигательной реакции молоди осетра в поле химического стимула (морфолин, 10^{-8} - 10^{-9} М) после адаптации личинок к стимулу в различные сроки раннего онтогенеза

3.3. Оценка запечатления химического стимула личинками осетра с различным тиреоидным статусом

Уровни гормонов у личинок осетра изменяли, воздействуя тиомочевинной или тиреоидными гормонами (ТЗ) в течение 14-ти дней в чувствительный (1-й - 14-й дни) или нечувствительный (20-й - 35-й дни) периоды. В результате воздействия ингибитора тироксин снизился по сравнению с контролем, в среднем, на 22% (25,4 - 18,6 %), трийодтиронин - на

75% (86,4 - 63,1%). Добавление в воду Т3 привело к увеличению тканевого содержания Т3 на стадии активного питания на 200 и 220%

Вызванное «гипотиреоидное» состояние в чувствительный период в значительной степени снизило положительную реакцию (120%) Если же в период адаптации личинок к химическому фону гормональный фон повышали с помощью Т3, то в этом случае по интенсивности реакция была аналогична реакции контрольных рыб и достоверно ($p < 0,001$) отличалась от реакции «гипотиреоидных» рыб (181%)

Реакция рыб зависела от уровня тиреоидных гормонов не только на предличинном этапе развития, но и в более поздний период Повышение гормонального фона у старшевозрастных личинок (с 20-го по 35-й дни) при их адаптации к химическому фону среды приводила при тестировании к предпочтению этого фона Интенсивность реакции составила 161% ($p < 0,001$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Впервые показано, что у осетровых рыб (осетра и севрюги) в эмбриональной и личиночной ткани присутствуют тиреоидные гормоны материнского происхождения Установлено, что эти виды рыб не различаются по абсолютным величинам гормонов в яйцеклетках в расчете на единицу массы, что, вероятно, обусловлено общностью условий обитания, диктующих определенный уровень метаболизма Можно ожидать, что у данных видов осетровых рыб, но из других популяций, гормональные характеристики будут несколько иными Полагают, что соотношение форм гормона, при котором содержание Т4 превышает Т3, свойственно пресноводным видам с относительно невысокой скоростью развития (Mellinger, 1994), что подтвердили наши данные Установлено, что поступление Т4 в генеративную ткань самок осетра активизируется на III стадии зрелости и не прекращается в завершающий и ведущий к овуляции (V стадия) период созревания

2 Количественный анализ показателей тиреоидных гормонов в яйцеклетках и эмбрионах в сопоставлении с характером их морфологического развития позволил установить уже начиная с эмбрионального периода, эти гормоны несут определенную функциональную нагрузку Мы установили отсутствие динамики гормонов при атипичном развитии яиц, когда происходит гибель зародыша до гастрюляции, а также факты различий в уровнях гормонов в потомствах с высокой и низкой оплодотворяемостью сразу после оплодотворения (стадия 1) и отсутствие таковых уже в период закладки нервных валиков (стадия 22) Эти данные в совокупности позволяют предполагать, что включение материнских тиреоидных гормонов в метаболизм происходит при гастрюляции, когда у зародыша формируются зачатки систем органов Это подтвердили в дальнейшем, исследования с привлечением молекулярно-генетических методов (Ли, Чап, 2002) При развитии зародышей уровни Т4 и Т3 снижаются более чем в два раза к периоду начала сердечной пульсации (стадии 29-30) После вылупления у личинок наблюдается

увеличение содержания гормона, секретируемого щитовидной железой (тироксина), совпадающее по времени со структурным оформлением этого органа и началом его функционирования (Яковлева, 1952, 2000) Максимальные величины T4 наблюдаются в период смешанного питания (стадии 43-44) [3, 10,11, 17-19]

3 Изучение общетканевого содержания кортизола у предличинок осетра позволило уточнить биохимическими методами сроки активизации интерреналовой ткани (Баранникова, 1974) Содержание кортизола, увеличивается к периоду смешанного питания с наименьшими показателями в первые 3-4 дня после вылупления В норме увеличение кортизола наблюдается в том же возрасте, когда происходит увеличение тироксина, с одновременным максимумом - на стадии смешанного питания Аналогичная динамика исследуемых показателей наблюдается у костистых рыб проходящих метаморфоз, у которых функционирует система регуляции эндокринных органов (de Jesus et al, 1991) Личинки осетра уже в раннем возрасте чувствительны к недостатку тиреоидных гормонов и реагируют на него ростом кортизола В условиях хронического токсического воздействия на предличинок осетра независимо от класса веществ, организм личинок реагирует одинаковым образом изменением динамики роста тироксина и фазовым смещением максимума T4 со стадий 43-44 на стадии 39-40, что, видимо, является свидетельством ранней активизации щитовидной железы в результате стресса Все, в совокупности, указывает на то, что у осетра уже в предличиночный период осуществляется взаимодействие исследуемых эндокринных систем, возможно, на центральном уровне [11,19, 20].

4 Установлено, что потомства, развивающиеся из икры с низкой оплодотворяемостью, со значительными нарушениями и смертностью в период эмбрионального и постэмбрионального развития, более слабым ростом после перехода на активное питание, имеют отклонения в содержании гормонов на протяжении эмбрионального и раннего личиночного периода Эти отклонения наиболее значительны на стадии оплодотворения и в период перехода на активное питание (снижение величин T4 на 50%) Опыты, в которых моделировали кратковременное изменение гормонального статуса личинок осетра в различные возрасте, подтвердили, что уровень тиреоидных гормонов в организме в период смешанного питания (стадия 43-44) имеет существенное влияние на ряд функциональных, в том числе, гормональных характеристик Так, кратковременное повышение общетканевого содержания тиреоидных гормонов в физиологически допустимых пределах (в 2-2,5 раза) в этот период способно десятикратно уменьшить фоновое содержание кортизола в организме на последующих стадиях онтогенеза, а также вызвать перераспределение форм тиреоидных гормонов в сторону метаболита T3 Направленность подобных изменений у молоди осетра согласуется с данными литературы о том, что такие гормональные характеристики свойственны ювенильным рыбам с высоким темпом роста (Gomez, et al, 1997, McCormick, 1999). С помощью экспериментальных гормональных воздействий удалось показать, что одним из

выраженных фенотипических последствий увеличения содержания в организме тиреоидных гормонов в конце периода желточного питания является более высокий соматический рост на уровне целого организма и на уровне отдельных клеток (увеличение размера эритроцитов пилорического отдела), а также снижение смертности в период перехода от смешанного к активному питанию. Снижение смертности личинок, очевидно, вызвано указанными изменениями в пищеварительной системе, поскольку гипертрофия клеток косвенно свидетельствует об увеличении функциональной активности органа [3-6, 14-16, 22, 23].

5 Удалось показать, что кратковременное гормональное воздействие на предличинок вносит коррекцию в показатели крови. Произошло перераспределение отдельных типов клеток, в составе лейкоцитов изменилось соотношение между лимфоцитами и гранулоцитами, представленными нейтрофилами и эозинофилами. Доля нейтрофилов и эозинофилов снизилась, а лимфоцитов увеличилась. В пределах гранулоцитов увеличился процент зрелых клеток, на уровне клеток (эритроциты) и целого организма снизились патологические и повреждающие процессы. Усилились пролиферативные процессы в клетках красной крови, изменился их возрастной состав, с увеличением процента молодых клеток (нормобластов, базофильных и полихроматфильных эритроцитов). Таким образом, проявлением развивающихся адаптивных изменений в результате воздействия тиреоидных гормонов во второй половине предличиночного развития явилось перераспределение лейкоцитарного состава (увеличение относительной доли лимфоцитов) на фоне снижения патологических изменений в целом организме и на клеточном уровне. Одной из наиболее вероятных причин, вызывавших эти изменения, может являться ускорение созревания клеток белой крови, отвечающих за противодействие процессам воспаления и аллергизации организма, что было нами определено по увеличению доли зрелых форм гранулоцитов. Сочетание таких изменений, как перераспределение состава иммунокомпетентных клеток в сторону лимфоцитов, рост молодых генераций эритроцитов и снижение патологически измененных клеток крови наблюдались только под влиянием исследуемых воздействий на стадии завершения желточного питания, причем степень «продвинутости» этих изменений зависела от исходного состояния организма вида гормона и примененной концентрации [4-6, 14, 15, 22, 23].

6 Установлено, что у особой осетра с незавершенным морфогенезом и неразвитой сенсорной системой возникает функциональная адаптация поведенческого уровня - запечатление химического фона среды. Адаптация связана с критическим или «чувствительным» периодом и рассматривалась нами в рамках *импринтинга* химических стимулов. Импринтинг зависел от второй половины предличиночного развития и был синхронизирован с периодом нейрогенеза в обонятельном органе и оформлением его связей с обонятельной луковицей (Винников, Титова 1957, Пяткина, 1991). Способность различать концентрации запечатленного стимула появлялась

позднее, в период, когда личинки начинают активно питаться, что совпадало по срокам с созреванием центральных отделов (Девизина, Кажлаев, 1995) Таким образом, на поведенческом уровне установлено, что система, отвечающая за восприятие химического фона среды, начинает функционировать задолго до того, как в целом получит окончательное развитие [1, 8, 9, 12,13].

7 У осетра проявление импринтинга на уровне поведения зависело от специфических (тиреоидные гормоны, тиомочевина) и неспецифических (токсические вещества) воздействий, влияющих на концентрацию тиреоидных гормонов в организме Чувствительный период импринтинга мог меняться по продолжительности и увеличиваться у осетра вплоть до стадии малька в случае, если адаптация проходила на фоне высоких показателей тиреоидных гормонов в тканях Поскольку морфология обонятельной системы у рыб зависит от тиреоидных гормонов (Kudo et al, 1994; Nevitt et al, 1994), импринтинг химических стимулов у осетра является объективным поведенческим коррелятом пластичности хемосенсорной системы и интегральным показателем ее функционального состояния Так как период импринтинга совпадает с переходом личинок осетровых рыб на другой тип активности и в естественных условиях обитания сопровождается пократной миграцией, не исключено, что запоминание химических стимулов в этот период имеет адаптивное значение как механизм хемосенсорной идентификации, контролирующей привязанность к биотопу «родного» водоёма [2, 12,13, 21]

8 Измерение концентраций в организме у осетра лабильного клеточного компонента – циклического аденозинмонофосфата (сАМР), образование которого контролируется тиреоидными гормонами, показало, что сроки, когда у предличинок наблюдаются максимальные концентрации сАМР в целом организме, совпадает с периодом наибольшего содержания тироксина и кортизола Более чем 10-ти кратное приращение параметра с возрастом предличинок (от 38 к 44 стадии), дифференцированная, зависящая от возраста, реакция на обработку гормонами, явились доказательствами того, что период, в который регистрируется у личинок наибольшее содержание тиреоидных гормонов и кортизола в организме, одновременно является и периодом функционального действия этих гормонов Уровень зрелости регуляторных механизмов, к которым в том числе, принадлежит и система, обеспечивающая образование сАМР, возможно, является одним из факторов, позволяющим реализовать гормональную модификацию адаптивных процессов, в том числе, зависящих от созревания нервной и кроветворных тканей, лишь в конце предличиночного этапа развития [7].

Таким образом, у осетра проявление комплекса признаков различного уровня, от тканевого до поведенческого, связано с возрастом, когда у личинок завершается желточный этап питания Это характеризует его как период функциональной пластичности Во всех случаях в регуляции особенностей выражения комплекса морфологических и функциональных признаков принимали участие тиреоидные гормоны Любой способ увеличения концентрации тиреоидных гормонов, как и любой способ, ограничивающий

негативное влияние на тиреоидный статус (снижение качества половых продуктов, токсическое воздействие) в этот период развития направлен на повышение адаптивного потенциала организма (Рис 5) Следовательно, такие манипуляции на начальных стадиях развития, как обогащение тиреоидными гормонами искусственного стартового корма, а также корректирующая гормональная обработка не должны вступать в противоречие с нормальной физиологической моделью обмена осетровых рыб

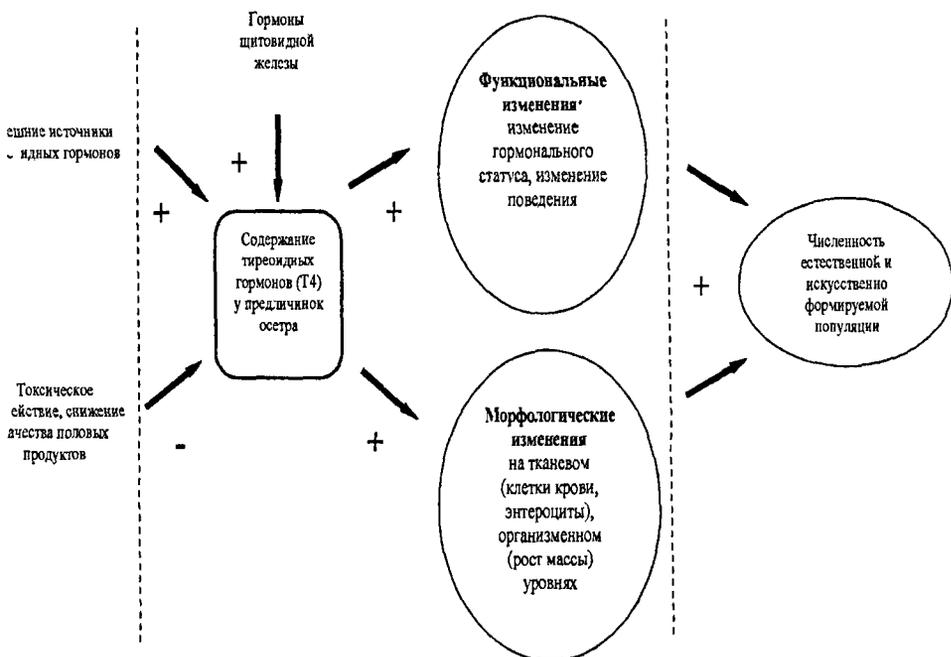


Рис. 5 Модулирующий эффект тиреоидных гормонов у предличинки осетра в критический период перехода к активному питанию. Стрелки со знаком плюс указывают на факторы, усиливающие, со знаком минус - ограничивающие адаптивный потенциал

Период, в который определяется направленность и интенсивность процессов развития, в физиологии обозначается как «критический». Но, как известно, функциональные изменения, составляющие содержание «критических» периодов, представляют собой цепь усложнений и проявляются на всех уровнях биологической организации (Уголев, 1988, Browman, 1989)

Гормонозависимые функциональные изменения, выявленные нами в исследуемый отрезок онтогенеза биохимическими и физиологическими методами на организменном уровне, в конечном итоге должны проявиться на популяционном уровне, где термин «критический период» обозначает ограниченный период раннего онтогенеза, в течение которого наблюдается наибольшая смертность рыб. Это событие обычно считается главным фактором, контролирующим размер взрослой популяции. В современных условиях вклад в пополнение популяций осетровых рыб в Азовском бассейне зависит не от естественного нереста, а от объемов выпуска заводской молоди и ее морфофункциональных параметров. Выживаемость молоди зависит от ее массы, что и является обоснованием для определения ее весовых стандартов при выпуске (Бойко, Калинкина, 1961, Бойко, 1963).

В рыбоводно-физиологических исследованиях, как и в ихтиологии, «критические периоды» онтогенеза рыб также относят к популяционным признакам, а не к индивидуальным и ассоциируют с периодами массовой гибели личинок (реализация морфофизиологических дефектов), наблюдаемой в потомствах низкого качества в начале активного питания (Владимиров, 1975). При этом широко известно, что параллельно со снижением качества потомства имеет место начальное отставание по массе и оно сохраняется в последующий период независимо от условий выращивания (Гершанович, и др., 1985, Крылова, Гершанович, 1991, Горбачева, 1996, Brawn, 1957).

Наши исследования показали, что свойства, характеризующие «критические периоды» на уровне популяции, обусловлены индивидуальной изменчивостью и имеют гормонозависимый характер. Скорость начального роста, повышение резистентности организма к паразитарной инфекции, формирование адекватного условиям данного биотопа поведения - все эти разнообразные функции, в комплексе способствующие увеличению популяционной плодовитости, чувствительны к тиреоидным гормонам в «критический период» развития. В свою очередь, зависима от повышения кортизола стратегия на активную мобилизацию неспецифических форм защиты, в ущерб росту, становится биологически оправданной в заведомо неблагоприятных условиях, о чем сигнализирует повышение содержания кортизола в организме и снижение уровня тиреоидных гормонов.

Функциональная пластичность раннего онтогенеза осетра, некоторые аспекты которой были рассмотрены, является продуктом длительного исторического развития, создавшего данную адаптивную «норму». В филогенетическом плане формирование адаптации (адаптивной нормы) предполагает первоначальную зависимость морфологических и функциональных событий онтогенеза от средовых воздействий, но которые в дальнейшем «автономизируются», а зависимость сохраняется в особые, критические периоды (Шипшкин, 1984, 2005).

Одним из наиболее вероятных путей изменений имеющейся «нормы» в эволюции могут быть преобразования тех функций, которые меняют эндокринный фон, модифицирующие, в том числе, синтез, регуляцию и/или

тканеспецифический ответ на гормоны (Masuda, 1987, Heyland, et al, 2004) Следовательно, рассмотрение проблемы адаптогенеза у рыб подразумевает, в том числе, и включение гормонального аспекта У осетра изначальную зависимость адаптаций от внешних/гормональных воздействий можно увидеть в критический период раннего онтогенеза, когда изменение величин тиреоидных гормонов и кортизола играет важную роль в регуляции фенотипического выражения нескольких функциональных признаков Сложившаяся в эволюции способность к поддержанию гормонального статуса личинок осетра на стадии активного питания не только за счет внутренних резервов (синтеза гормонов щитовидной железой), но и эволюционно более древним способом, за счет поступления из внешней среды, во- первых, направлена на поддержание высокого адаптивного потенциала и, следовательно, упрочение «нормы», а во- вторых, позволяет это сделать с меньшими энергозатратами Можно сказать, что тиреоидные гормоны в дополнение к своей морфогенетической функции, в критический период развития осетра играют роль адаптогенов, повышающих устойчивость «воспроизведения» онтогенеза в поколениях, что оправдывает и расширяет смысл данного им определения как «благоприятствующих» гормонов (Eales, 1997) В этом отношении примером может быть поддерживаемая тиреоидными гормонами функция импринтинга химических сигналов среды Как известно, у осетровых рыб жизненный цикл связан с протяженными миграциями, являющимися выражением их значительной адаптационной пластичности (Баранникова, 1975) «Ограждая» популяцию от экстремальных воздействий стабилизацией условий размножения, они, тем самым, ослабляют давление отбора на геном, что позволяет сохранить ее монолитность (Марти, 1980) Поведенческая пластичность раннего онтогенеза, связанная с запечатлением «родной среды», может принадлежать к числу этих стабилизирующих факторов

ВЫВОДЫ

1 Физиологическая роль тиреоидных гормонов в метаболическом балансе организма изучалась на ранних этапах развития осетровых рыб Показано, что различия в характере динамики тироксина (Т4), трийодтиронина (Т3) сопряжены с морфофункциональными показателями жизнестойкости в эмбриональный и в постэмбриональный периоды развития

2 Содержание гормона тироксина в генеративной ткани самок осетра зависит от степени их зрелости Наименьшее количество содержится в гонадах на стадии протоплазматического роста (5,4 нг/г), наибольшее - в яйцеклетках на стадии их конечного созревания и овуляции (до 31,1 нг/г)

3 У эмбрионов и предличинок осетровых рыб нормальный морфогенез обеспечивается колебаниями концентраций тиреоидных гормонов с наибольшими показателями на стадиях оплодотворенной яйцеклетки (стадия 1), выклева личинок (стадия 36) и периода смешанного питания (стадии 43-44)

4 У потомства с наименьшим количеством дефектов развития в эмбриональный и постэмбриональный период и более высоким темпом роста после перехода на активное питание установлены более высокие показатели тироксина в яйцах на стадии оплодотворения (в 1, 4- 2 раза) и до 2,6 раз большая его продукция на этапе смешанного питания

5 Во второй половине предличиночного этапа тироксин и кортизол вносят коррекцию в морфофункциональные показатели развития выживаемость, скорость начального роста и устойчивость к паразитарной инфекции Однократное воздействие тироксином и кортизолом (1,5 / 1мг/л) позволило снизить смертность личинок в первые дни активного питания на 38% и увеличить прирост массы при выращивании до стадии малька на 59% При поражении сапролегниозом тиреоидные гормоны обеспечивают протекторную функцию в физиологических (1,5 мг/л) а кортизол – в фармакологических концентрациях (30-100 мг/л)

6 Чувствительный период, формирующий предпочтение химического стимула совпадает с завершением предличиночного этапа развития и началом питания (от 4-го до 18-го дня после выклева) и выглядит как положительная двигательная реакция молоди в ответ на примененный стимул Интенсивность реакции определяется длительностью адаптации личинок к химическому фону среды в пределах чувствительного периода У молоди реакция сохраняется длительный период (до 1,5 месяцев) и имеет признаки импринтинга

7 Токсические вещества на уровне хронического и сублетального воздействий (линдан, нефть), а также ингибитор функции щитовидной железы (тиомочевина), снижающие продукцию тироксина во второй половине предличиночного периода, подавляют импринтинг, в то время как заместительное воздействие тиреоидными гормонами восстанавливает импринтинг

8 Результаты наблюдений и экспериментальные данные позволяют сделать заключение о том, что тиреоидные гормоны у русского осетра являются центральным звеном в реализации комплекса cAMP- зависимых функций, таких как начальный рост массы, резистентность к инфекции, поведение адекватное внешним условиям, определяющие жизнестойкость при изменении типа питания и отношений со средой обитания В этой связи можно считать, что период завершения желточного и начала активного питания у осетра является преадаптивным

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в изданиях, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук
Статьи в журналах

- 1 Бойко Н.Е., Григорьян Р.А., Чихачев А.С. Обонятельный импринтинг молоди осетра // Ж эвол биохим и физиол - 1993 - Т 29 - № 5-6 - С 509-514

- 2 **Бойко Н.Е.**, Григорьян Р А Влияние тиреоидных гормонов на запечатление химических сигналов в раннем онтогенезе осетра *Acipenser gueldenstaedti* Brandt // Ж эвол биохим и физиол - 2002 - Т 38 - №2 - С 169 -172
- 3 **Бойко Н.Е.**, Воробьева О А, Григорьян Р А, Корниенко Г Г Динамика тиреоидных гормонов на ранних стадиях развития осетра *Acipenser gueldenstaedti* Brandt // Ж эвол биохим и физиол 2004 - Т 40 -№ 2 - С 142-146
- 4 **Бойко Н.Е.** Влияние тиреоидных гормонов и кортизола на рост, тиреоидный статус и показатели крови молоди осетра *Acipenser gueldenstaedti* Brandt // Известия вузов Северо-Кавказский регион Естественные науки - 2004 - № 12(24) - С 38-48
- 5 **Бойко Н.Е.**, Рудницкая О А Реакция клеток крови личинок осетра на стимуляцию тиреоидными гормонами и кортизолом // Известия вузов Северо-Кавказский регион Естественные науки - 2005 - №4(132) - С 55-58
- 6 **Бойко Н.Е.** Влияет ли тиреоидный статус предличинок осетра на их развитие? // Известия вузов Северо-Кавказский регион Естественные науки - 2006 -№ 4 (40) - С 66 -73

- 7 Ноздрачев А Д, **Бойко Н.Е.**, Григорьян Р А Изменение циклического аденозинмонофосфата в раннем онтогенезе осетра *Acipenser gueldenstaedti* Brandt // Доклады РАН - 2007 - Т 413 - №3 - С 1-3

Статьи в методических сборниках

- 8 Корниенко Г Г, **Бойко Н.Е.**, Бугаев Л А, Дехта В А, Дудкин С И, Кузина, Ложичевская Т В, В Ф, Рудницкая О А, Сергеева С Г Физиолого-биохимические и генетические исследования ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна / Методическое руководство – Ростов-на-Дону Эверест, 2005 - С 48-56

Статьи в аналитических сборниках

- 9 **Бойко Н.Е.**, Чихачев А С Обонятельный импринтинг и влияние антропогенных факторов на поведение молоди осетра // Сб научн тр АзНИИРХ / Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов -Ростов-на-Дону Полиграф, 1996 - С 278-289
- 10 **Бойко Н.Е.** Динамика тиреоидных гормонов в эмбриогенезе и раннем онтогенезе осетра // Сб научн тр АзНИИРХ / Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна - Ростов-на-Дону Молот, 1997 - С 283-288
- 11 **Бойко Н.Е.**, Воробьева О А Кортизол и тиреоидные гормоны на ранних стадиях развития осетра // Сб научн тр АзНИИРХ / Основные проблемы

- рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна - Ростов-на-Дону: Медиаполис, 2000 - С 131-136
- 12 **Бойко Н.Е.**, Корниенко ГГ Факторы пластичности поведения Азово-Кубанского осетра (на примере обонятельного импринтинга) // Сб научн тр / Экологические проблемы Кубани 2001 - С 146-150
- 13 **Бойко Н.Е.** Тиреоидные гормоны и адаптационная пластичность поведения русского осетра *Acipenser guldenstädti* Brandt // Современные проблемы физиологии и экологии морских животных - Апатиты, 2003 - С 70-80
- 14 **Бойко Н.Е.** Тиреоидные гормоны и кортизол участвуют в регуляции роста личинок осетра *Acipenser gueldenstaedti* Brandt // Стратегия развития аквакультуры в условиях XXI века Минск, 2004 - С 24-28
- 15 **Бойко Н.Е.**, Рудницкая ОА Реакция клеток крови личинок осетра на стимуляцию тиреоидными гормонами и кортизолом // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов - Петрозаводск, 2005 - С 13-17
- 16 **Бойко Н.Е.**, Воробьева ОА, Корниенко ГГ, Рудницкая ОА, Ружинская ЛП Дефекты развития предличинок осетра при гипо- и гипертиреозе // Сб научн тр АзНИИРХ / Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна Ростов-на-Дону Медиаполис, 2006 - С 292-301

Статьи в прочих периодических изданиях

- 17 **Бойко Н.Е.**, Корниенко ГГ Тиреоидные гормоны в яйцеклетках и развивающихся эмбрионах азовского осетра, *Acipenser gueldenstaedti* // Наука Кубани - 2000 - №5 (2) - С 31-36
- 18 Корниенко ГГ., **Бойко Н.Е.**, Ковальчук ЛИ Преадаптивная роль гормонов (кортизол, тиреоидные гормоны) личинок осетровых Азово-Черноморского бассейна // Наука Кубани - 2000 - Т 5 - № 12 - С 38-39
- 19 **Boiko N.E.**, Kornienko G G, Vorobyeva O A Cortisol and thyroid hormones at early stages of the development of the russian sturgeon, *Acipenser guldenstadti* Brandt // J Environmental Protection and Ecology - 2002 Vol 3 - № 3 - P 678-681
- 20 **Boiko N. E.** The effect of hexachloran and mineral oil on the dynamics of thyroid hormones in larvae of the russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti* Brandt // J Environmental Protection and Ecology - 2003 Vol 4 - №1 - P 128-133
- 21 **Boiko N.E.** Hexachloran and oil contaminations alters memorisation of odors in sturgeon, *Acipenser guldenstadti* Brandt // J Environmental Protection and Ecology - 2003.- Vol 4 - №1 - P 134-140

- 22 **Бойко Н.Е.** Изучение последствий тиреоидных гормонов и кортизола на рост, тиреоидный статус и показатели крови молоди осетра // Вопросы рыболовства - 2004 - Т 5 - № 3(19) - С 500-513

Патентные документы

- 23 А 01 К 61/00 RU 2260943 С2 Способ подрачивания личинок осетровых рыб / **Бойко Н.Е** , **Корниенко Г Г** , **Рудницкая О А** (ФГУП АзНИИРХ) - № 2260943, Заявл 18 08 2003 // Изобретения (Заявки и патенты) - 2005 - № 27 - С 45

Подписано в печать 31 03 2008

Объем 1,5 печ л Тираж 100 экз Заказ № 123

Отпечатано в типографии ООО «КОПИ-Р», СПб, пер Гривцова 6 Б

Лицензия ПЛД № 69-338 от 12 02 99г