

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ГРУСЛОВА
Александра Борисовна

СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ
РУССКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTII BR*) В ПРИРОДЕ И В
ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

03.00.13 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2004

Работа выполнена в лаборатории эволюционной физиологии ФНИИ им. А.А. Ухтомского Санкт-Петербургского государственного университета и в Центральной лаборатории по воспроизводству рыбных запасов Государственного Комитета Российской Федерации по рыболовству

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ирина Алексеевна Баранникова

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
заслуженный деятель науки, профессор
Вера Георгиевна Шаляпина

кандидат биологических наук, доцент
Марина Павловна Чернышова

Ведущее учреждение: Институт эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Защита состоится "8" апреля 2004 г. в 16 часов на заседании
Диссертационного совета Д 212.232.10 по защите диссертаций на соискание
ученой степени доктора биологических наук при Санкт-Петербургском
государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7/9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. А.М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета

Автореферат разослан "2" марта 2004 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Н.П. Алексеев

2007-4

2394,251

6446

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из основных проблем физиологии является выяснение механизмов гормонального контроля половых циклов у позвоночных. В регуляции репродуктивной функции низших позвоночных, в том числе и у рыб, существует ряд особенностей по сравнению с млекопитающими (Баранникова, 1981; Баранникова и др., 1991, Баранникова, Дюбин, 1992; Peter, 1986; Nagahama, 1987; King, Millar, 1990; Kime, 1993). Исследование этого вопроса у рыб представляет особый интерес, так как существует множество видов с различной экологией и разными типами жизненного цикла. Даже в пределах популяций одного вида (например, в сем. осетровых, лососевых) могут образовываться биологические группы, отличающиеся состоянием половых желез в начале нерестовой миграции (Берг, 1948; Гербильский, 1951, 1957; Баранникова, 1966, 1975).

Известно, что осуществление развития и созревания половых желез происходит на основе комплексного взаимодействия внешних и внутренних факторов. Одним из возможных подходов к изучению гормональной регуляции созревания гонад у рыб является исследование содержания гормонов в крови в зависимости от сезона, стадии репродуктивного цикла, а также с учетом экологических особенностей исследуемого вида. В частности, представляет интерес изучение динамики половых стероидов в крови, которые являются важным звеном в эндокринной регуляции размножения. Они участвуют в регуляции репродуктивного цикла, выполняя ряд функций для обеспечения нормального хода гаметогенеза, развития половых признаков, подготовки и осуществления нерестовой миграции, полового и родительского поведения (Баранникова, 1975; Никитин и др., 1991; Foster et al., 1983; Kime, 1993; Borg, 1994; Yaron, 1995).

Одним из представителей осетровых является русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt). Этот вид, как и большинство рыб из этой группы, относится к проходным рыбам, совершающим миграции из морей в реки для размножения. В пределах волго-каспийской популяции существуют яровые и озимые группы, которые мигрируют в реки в различные сезоны и с разным состоянием воспроизводительной системы (Берг, 1948; Гербильский, 1951, 1957; Баранникова, 1957, 1975). В этой связи особое значение для понимания гормональной регуляции гаметогенеза у осетровых приобретает сравнительное исследование уровней стероидных гормонов в крови рыб одного вида, относящихся к разным биологическим группам.

В свою очередь исследования, проводимые на различных представителях осетровых, тесно связаны с проблемами сохранения видов этих ценных рыб. В настоящее время поддержание численности осетровых в Волго-Каспийском бассейне в значительной мере

7

осуществляется за счет работы рыбоводных заводов. До недавнего времени, основным объектом волжского осетроводства являлся яровой осетр, мигрирующий с близкими к зрелости гонадами. Зимние мигранты практически не использовались при разведении, так как они заходят в реки с гонадами далекими от зрелости, что требует их длительного выдерживания (от 6 до 11 месяцев) в условиях рыбоводных заводов до созревания.

На фоне снижения численности осетровых, все чаще среди них встречаются особи с нарушениями обмена веществ и процессов созревания гонад (Романов, 1992; Корниенко и др., 1996; Дудкин и др., 1997, Моисеева и др., 1997, Рубан, 1999; Саенко, 2000, Баранникова и др., 2002). Характеристика уровней стероидных гормонов в крови может служить одним из показателей, огражающих физиологическое состояние рыб, поскольку концентрация стероидов в крови изменяется под воздействием стрессорных факторов (Donaldson, 1981, Erple et al., 1982, Barton, Peter, 1987, Pickering et al., 1987; Pickering, 1989, Дюбин, 1989; Балонова, Семенкова, 1999, Consten et al., 2002).

В связи с этим изучение динамики стероидных гормонов на разных этапах репродуктивного цикла осетровых имеет не только теоретическое значение, но и представляет большой интерес для совершенствования воспроизводства русского осетра на рыбоводных заводах.

Цели и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в комплексном исследовании состояния репродуктивной системы и уровней стероидных гормонов у самок и самцов русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) на разных этапах полового цикла как в естественных условиях обитания (море, река), так и в условиях осетрового рыбоводного завода (ОРЗ)

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи.

- 1) провести гистологический анализ половых желез и анализ содержания стероидных гормонов - кортизола (К), тестостерона (Т), 11-кетотестостерона (КТ), эстрадиола-17 β (Э) в сыворотке крови осетра с гонадами на разных стадиях зрелости в морской период жизни и в период анадромной миграции;
- 2) определить концентрации стероидных гормонов у осетра разных биологических групп на завершающем этапе созревания,
- 3) изучить влияние длительного периода выдерживания в искусственных условиях на состояние воспроизводительной системы осетра;
- 4) сравнить уровни стероидов в крови и гонадотропную активность гипофизов у самок осетра после применения глицеринового гипофизарного препарата осетровых и сурфагона,

- 5) исследовать содержание К, Т, КТ и Э в сыворотке крови у самок осетра после гормональных воздействий при нормальном созревании и при нарушениях функции гонад.

Основные положения выносимые на защиту:

1. В процессе развития гонад и осуществления анадромной миграции происходит увеличение содержания стероидов в сыворотке крови осетра. Наблюдаемая динамика Т, КТ и Э является зависимой от пола.
2. Изменения концентраций половых стероидов в сыворотке крови после гормональной стимуляции созревания происходят по единой схеме для представителей разных биологических групп осетра: при овуляции снижаются уровни Т и Э, а при спермации - Т и КТ.
3. У созревших и отдавших сперму самцов осетра после повторной индукции спермации происходит дальнейшее снижение уровня Т в крови.
4. На уровне стероидных гормонов у самок осетра после овуляции влияет тип и метод введения гормонального препарата.
5. Различные отклонения в репродуктивной функции осетра отражаются на исследованных гормональных показателях. Поэтому определение уровней стероидных гормонов в крови может являться индикатором физиологического состояния особей.

Научная новизна. В настоящей работе на основании данных последних лет (1998-2002 гг.) проведено комплексное исследование содержания стероидных гормонов (К, Т, КТ, Э) в сыворотке крови осетра методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с одновременным гистологическим анализом состояния половых желез.

Получены новые данные об изменениях уровней К, Т, КТ и Э в сыворотке крови самок и самцов русского осетра в морской период жизни и в начале анадромной миграции в Волгу при различном состоянии половых желез. Они свидетельствуют об участии этих гормонов в регуляции репродуктивного цикла осетровых.

С помощью ИФА исследованы изменения уровней К и половых стероидов у производителей осетра при гормональных стимуляциях созревания на ОРЗ, при этом учитывались реакция на гормональную стимуляцию и качество получаемых половых клеток. Особый интерес представляют результаты, полученные при работе с производителями осетра разных биологических групп, выявляющие у них общие принципы гормональной регуляции созревания половых желез.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные данные на примере русского осетра позволяют лучше понять механизмы гормональной регуляции размножения осетровых. Результаты работы с производителями осетра в условиях

рыбоводного завода помимо теоретического интереса, касающегося содержания стероидов в сыворотке крови на завершающих этапах созревания половых желез, имеют и практическое значение. Они могут быть использованы для усовершенствования методов разведения производителей осетровых в условиях рыбоводных заводов.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 11 работ в отечественных и зарубежных изданиях.

Результаты исследований были представлены на 4-ой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (С-Петербург, 2001), Научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России» (Адлер, 2001), 2-ой Международной научно-практической конференции «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития» (Астрахань, 2001), 6-ой Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2002), 21-ой конференции европейских сравнительных эндокринологов (Бонн, 2002), 4-ой Российской научно-практической конференции «Актуальные вопросы эндокринологии» (Пермь, 2002), Международной конференции «Современные проблемы Каспия» (Астрахань, 2002), на 7-ой международной конференции по репродуктивной физиологии рыб (Япония, 2003).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 201 публикаций. Работа изложена на 127 страницах, содержит 25 таблиц, 11 рисунков и 19 фотографий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились на одном из представителей сем. осетровых (Acipenseridae) - русском осетре (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) волго-каспийской популяции. Всего в работе было использовано 459 разновозрастных особей осетра (278 самок и 181 самцов), характеристики которых приведены в таблице 1.

Для проведения исследования на рыбах из естественных мест обитания в период 1998-2001 г с апреля по сентябрь проводился их отлов в северной части Каспийского моря и в низовьях р. Волги. На завершающих этапах созревания гонад осетра сбор материала производился в апреле-мае 2000-2002 гг. на Александровском ОРЗ (АОРЗ) в период работ по искусственному воспроизводству осетра.

На АОРЗ самок и самцов осетра выдерживали в бассейнах объемом 90 м³. Период выдерживания для ярового осетра составлял от 3 до 20 дней, озимого – от 6 до 11 месяцев. При наступлении нерестовых температур рыб переводили в бассейны объемом 15 м³, где осуществлялась гормональная стимуляция созревания. Для индукции созревания рыбам

вводили глицириновый гипофизарный препарат осетровых (ГТП) или сурфагон, представляющий собой синтетический суперактивный аналог гонадотропин-рилизинг гормона (Гн-РГ)

Таблица 1. Характеристика самок и самцов осетра, использованных при выполнении работы.

| Место сбора материала | Масса, кг | | Абсолютная длина, см | | Кол-во рыб (гистологический анализ) | | Кол-во рыб (ИФА) | |
|-----------------------|-----------|-----------|----------------------|------------|-------------------------------------|-------|------------------|-------|
| | самки | самцы | самки | самцы | самки | самцы | самки | самцы |
| Море | 14,5±1,3 | 9,5±0,57 | 164,1±37,7 | 116,7±2,23 | 52 | 26 | 99 | 63 |
| Река | 19,5±1,66 | 10,9±1,04 | 145,4±3,1 | 123,2±6,31 | 24 | 21 | 65 | 39 |
| АОРЗ | 20,8±0,68 | 17,3±3,21 | 147,3±1,51 | 133,5±4,58 | 51 | 19 | 114 | 79 |

При обработке данных, собранных от осетра на завершающих этапах созревания учитывались: 1) наличие или отсутствие созревания после гормональной стимуляции, 2) качество зрелых половых клеток. Для оценки качества икры определяли процентное содержание нормально развивающихся эмбрионов (%НРЭ) на стадии гастрюляции, а для оценки спермы производили тестирование по пяти-бальной шкале (Гинзбург, Детлаф, 1969) с определением времени подвижности спермиев после добавления воды.

Для оценки состояния половых желез у исследованных рыб производился сбор кусочков гонад, которые фиксировали в смеси Буэна, заливали в парафин и обрабатывали с применением стандартных гистологических методик (Роскин, Левинсон, 1957). При гистологическом исследовании оценивали морфофункциональное состояние тканей половых желез и степень возможных нарушений.

Стадии зрелости (СЗ) гонад определяли по шкале В. З. Трусова (1964). При оценке гонадотропной активности ацетонированных гипофизов рыб использовали тест-реакцию спермиации у самцов лягушки *Rana temporaria* L. (Травкин, Боев, 1969).

Сбор проб крови у исследуемых особей осуществляли из жаберной артерии в момент забоя. После осаждения эритроцитов отбирали пробы сыворотки, которые замораживали и хранили при температуре $-18-20^{\circ}\text{C}$ до проведения ИФА. Для ИФА использовали модифицированные к осетровым коммерческие наборы (Алкорбио, Санкт-Петербург). Определение оптической плотности образцов производилось на спектрофотометре E-Lisa MAT 3000 (DRG, США).

Все полученные данные были обработаны статистически с помощью методов, применяемых в биологических исследованиях (Лакин, 1990) Данные представлены в виде $M \pm SE$.

Автор выражает свою благодарность сотрудникам КаспНИРХа П.П. Гераскину, А.А Романову, Г.К. Шелухину за помощь в сборе материала в Каспийском море и в низовьях р. Волги, и сотрудникам Центральной лаборатории по воспроизводству рыбных запасов Т.Б Семенковой и Л.В. Баюновой за помощь в проведении ИФА

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ содержания стероидных гормонов в сыворотке крови русского осетра на разных СЗ гонад. Проведенное исследование содержания К в сыворотке крови у самок и самцов осетра в разные периоды жизни (море, река) показало, что наиболее низкие концентрации этого гормона наблюдаются у рыб с гонадами на II СЗ (рис.1) Их значения колебались в пределах 22-44 нг/мл У особей, в половых железах которых активно протекали процессы гаметогенеза (III-IV СЗ), отмечалось достоверное увеличение уровня К в 2-6 раз, при этом между самками и самцами не было существенных различий Сходная динамика уровня К в крови наблюдалась ранее на севере и белуге (Barannikova et al, 1999, Семенкова и др., 2000)

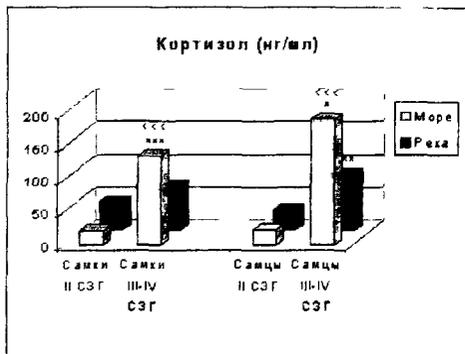


Рис 1 Содержание кортизола (нг/мл) в сыворотке крови русского осетра в морской и речной периоды жизни. Различия достоверны при сравнении по СЗ гонад у самок при $p < 0,001$ (***), у самцов при $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), по месту вылова – самцы и самки с III-IV СЗГ при $p < 0,001$ (<<<).

Несмотря на то, что Т и КТ являются основными андрогенами рыб, они выявляются и у самок, но в гораздо меньших концентрациях (Заки и др., 1994; Kime et al., 1996; Le Menn et al., 1999; Баранникова и др., 2000) У самок осетра со II СЗ гонад, выловленных в море, концентрация Т в сыворотке крови была в 2 раза ниже, чем у самцов ($p < 0,05$) В сыворотке крови у особей обоего пола, гонады которых находились на III-IV СЗ, наблюдалось достоверное повышение концентрации Т (рис 2)

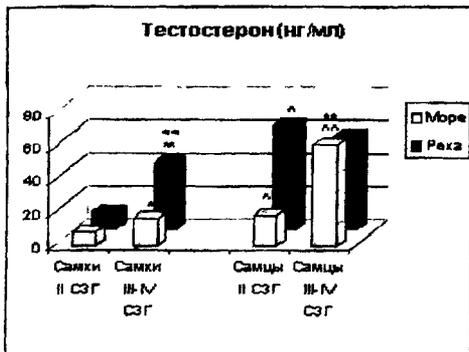


Рис. 2. Содержание тестостерона (нг/мл) в сыворотке крови русского осетра в морской и речной периоды жизни. Различия достоверны: при сравнении по СЗ гонад в морской период: у самок при $p < 0,05$ (*), у самцов при $p < 0,01$ (**), в реке у самок при $p < 0,01$ (**); между самками и самцами – со II СЗ гонад при $p < 0,05$ (^), с III-IV СЗ гонад при $p < 0,01$ (^^); от места вылова у самок с III-IV СЗ гонад при $p < 0,01$ (<<).

У рыб, мигрирующих в реку, наблюдалась сходная динамика уровня Т в крови. Увеличение концентрации Т при созревании яичников, по-видимому, может быть связано с тем, что этот гормон является предшественником эстрогенов. Учитывая, однако, что содержание Т у мигрирующих самок достоверно выше, чем у нагуливающихся ($p < 0,01$), можно говорить о самостоятельной роли этого гормона в регуляции повышенного уровня метаболизма при анадромной миграции осетра.

С помощью ИФА было установлено, что содержание КТ в сыворотке крови русского осетра выявляется в значительно меньших количествах относительно Т, что согласуется с результатами, полученными ранее на севере (Баранникова и др., 2000). У самок осетра со II СЗ гонад, как в морской, так и в речной период определены одинаково низкие уровни КТ в крови (1,5-3 нг/мл). У самцов осетра его содержание колебалось от 4,4 до 29,3 нг/мл, что было достоверно выше ($p < 0,05$), чем у самок (рис.3).

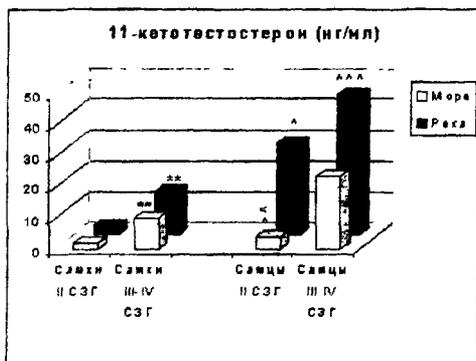


Рис. 3. Содержание 11-кетотестостерона (нг/мл) в сыворотке крови русского осетра в морской и речной периоды жизни. Различия достоверны: при сравнении по СЗ гонад у самок при $p < 0,01$ (**); между самками и самцами со II СЗ гонад при $p < 0,05$ (^), с III-IV СЗ гонад при $p < 0,001$ (^^^); от места вылова у самцов II СЗ гонад при $p < 0,05$ (<).

У рыб с гонадами на III-IV СЗ наблюдалось повышение уровня КТ, однако его концентрация составляла около 40% от уровня Т. Характер половых различий сохранялся. В динамике КТ прослеживалась

тенденция к повышенному содержанию этого гормона у мигрирующих рыб обоих полов относительно рыб в период нагула в море.

Динамика содержания Э в сыворотке крови русского осетра демонстрирует закономерные для представителей разных таксономических групп низших позвоночных изменения уровня этого гормона при созревании гонад (Fostier et al., 1983, Баранникова и др., 1995; 2000). Концентрация Э в крови у самок осетра на всем протяжении гаметогенеза достоверно выше ($p < 0,001$), чем у самцов (рис.4).

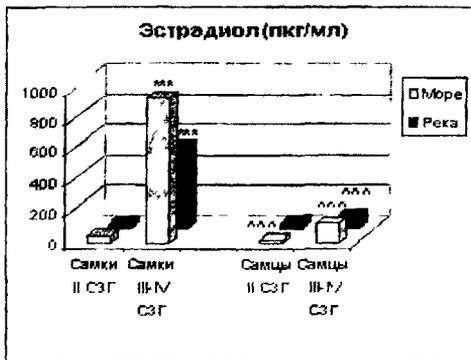


Рис. 4. Содержание эстрадиола (пкг/мл) в сыворотке крови русского осетра в морской и речной периоды жизни. Различия достоверны при сравнении по СЗ гонад у самок при $p < 0,001$ (***) между самками и самцами - при $p < 0,001$ (^^)

В период вителлогенеза содержание Э в сыворотке крови самок увеличивается в 20 раз ($p < 0,001$), в то время как у самцов (III-IV СЗ гонад) этот показатель остается на прежнем низком уровне.

Анализ полученных данных позволил прийти к заключению, что динамика стероидных гормонов в сыворотке крови русского осетра соответствует закономерностям, отмеченным на других представителях осетровых.

Анализ содержания стероидных гормонов в сыворотке крови русского осетра на завершающих этапах созревания. Одним из возможных подходов к изучению роли стероидных гормонов на завершающих этапах полового цикла осетровых является исследование гормональных характеристик у особей, используемых для воспроизводства на ОРЗ.

Содержание стероидов в крови при овуляции или спермиации. Как было показано рядом авторов, перед нерестом в крови рыб содержатся стероиды в высоких концентрациях. При созревании происходит снижение содержания стероидов (Баранникова, 1984; Баранникова и др., 1989, 2000; Yaron, 1995; Hou et al., 2001).

По нашим данным, у яровых и озимых самок осетра, созревших после гормональной стимуляции, уровни К, Т и Э были существенно ниже, чем в период анадромной миграции (10-15 нг/мл, 12-22 нг/мл и 0,11-0,35 нг/мл, соответственно). Содержание КТ в крови

оставалось на том же уровне (15-26 нг/мл) Наблюдаемое снижение концентраций гормонов отражает их необходимость интенсивного использования в осуществлении завершающих этапов гаметогенеза

У яровых и озимых самцов осетра, не подвергавшихся гормональному воздействию, содержание Т и КТ в сыворотке крови находилось на высоком уровне (100-130 нг/мл и 50-150 нг/мл, соответственно) (рис 6) После спермиации у инъекцированных самцов было отмечено снижение уровней обоих андрогенов (яровые – $p < 0,05$, озимые – $p < 0,001$).

В крови самцов, как показано на костистых рыбах (Suzuki et al, 1997; Hou et al, 2001), концентрация Т начинает увеличиваться за несколько месяцев до созревания, в то время как уровень КТ поднимается непосредственно перед спермиацией После спермиации отмечается существенное падение концентрации обоих андрогенов

После повторной гормональной стимуляции спермиации у самцов осетра происходило дальнейшее снижение уровня Т (рис 6А), а после трехкратного гормонального воздействия (которое приводило к полному истощению семенников) концентрация Т в крови снижалась более чем в 40 раз по сравнению с интактными рыбами (рис 6Б) Полученные данные свидетельствуют о важном значении Т и КТ в регуляции заключительного этапа сперматогенеза у самцов осетра.

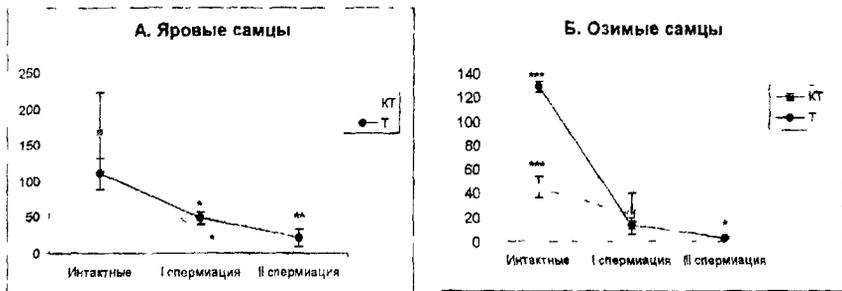


Рис 6 Динамика содержания Т и КТ (нг/мл) у яровых (А) и озимых (Б) самцов осетра после гормональной стимуляции созревания Отличия достоверны при $p < 0,05$ - *, при $p < 0,01$ - **, при $p < 0,001$ - ***.

У интактных самцов ярового и озимого осетра выявлены сравнительно низкие концентрации К в сыворотке крови (9-15 нг/мл) Уровни К при первой, второй или третьей спермиации достоверно не отличались от этих показателей у интактных особей и оставались в пределах физиологической нормы Вместе с тем, изменение уровня К может

рассматриваться как показатель стресса (Billard et al., 1981; Pickering et al., 1987; Pickering, 1989; Баюнова, Семенкова, 1999; Semenikova et al., 1999, 2002).

Учитывая полученные данные, можно предположить, что многократное получение спермы от одних и тех же самцов не оказывает резкого отрицательного влияния на физиологическое состояние производителей.

Содержание кортизола и половых стероидов в сыворотке крови самок русского осетра после стимуляции созревания ГТП и сурфагоном. Традиционно для стимуляции созревания производителей осетровых на ОРЗ использовались гипофизарные инъекции (Гербильский, 1941) Однако в современном рыбоводстве ведутся разработки новых методик инъектирования и, в том числе с использованием иных гормональных препаратов, например, сурфагона (синтетического аналога ЛГ-РГ).

Исследование гонадотропной активности гипофизов самок осетра показало, что у созревших рыб активность гипофизов снижается по сравнению с интактными рыбами. В свою очередь, степень снижения активности находилась в прямой зависимости от применяемого для стимуляции гормонального препарата. Так, после применения сурфагона активность гипофизов была ниже в 2-3 раза по сравнению с введением ГТП. Наблюдаемые закономерности связаны с тем, что после введения ГТП созревание происходит в основном за счет экзогенного гонадотропного гормона (ГТГ), содержащегося в вводимом препарате, тогда как под воздействием Гн-РГ или его синтетического аналога происходит выведение ГТГ из собственного гипофиза рыб (Баранникова, Буковская, 1984; Баранникова и др., 1985).

Разные механизмы действия сурфагона и ГТП объясняют полученные нами различия в концентрациях стероидных гормонов у самок осетра, созревших под влиянием этих препаратов. После инъекций ГТП уровень К в сыворотке крови был достоверно ниже по сравнению с самками, созревшими от введения сурфагона ($p < 0,05$).

В то же время у самок после инъекции ГТП, в некоторых случаях, содержание Т и Э было выше по сравнению с их уровнями после введением сурфагона. Это может объясняться тем, что при использовании ГТП в организм рыб вводятся более высокие концентрации ГТГ, чем содержится в собственном гипофизе самок перед овуляцией.

Несмотря на некоторые выявленные различия в уровнях стероидных гормонов между самками осетра, созревшими от введения ГТП или сурфагона, в обоих случаях после овуляции мы наблюдали довольно низкие концентрации исследованных гормонов. Это свидетельствует о том, что ГТП и сурфагон сходным образом влияют на гормональный статус самок осетра на завершающем этапе созревания.

Анализ содержания стероидных гормонов у осетра с нормальным состоянием половых клеток и при нарушениях репродуктивной функции гонад. Известно, что у осетровых рыб с гонадами, достигшими преднерестовой стадии зрелости (IV СЗ) введение разрешающих доз гонадотропных препаратов вызывает переход гонад в нерестовую стадию (V СЗ). Ответ на инъекцию (овуляция или спермиация) происходит у разных рыб в пределах одного опыта не одновременно и зависит в значительной степени от исходного состояния гонад. В наших экспериментах разрыв во времени наступления овуляции после введения ГГП иногда достигал 10 час.

Анализ содержания стероидных гормонов у овулировавших самок осетра с разными сроками созревания не выявил достоверных различий между быстро- и медленно-созревающими особями. Это позволяет предполагать, что независимо от периода созревания гормональная регуляция завершающего этапа проходит по единой схеме, а наблюдаемые различия в сроках овуляции могут объясняться индивидуальными физиологическими особенностями.

В то же время, отсутствие овуляции или спермиации после истечения ожидаемых сроков созревания может свидетельствовать о нарушениях в репродуктивной системе. Выполненные нами исследования показали, что для незосревших самок и самцов осетра были характерны более высокие уровни Т по сравнению с зосревшими рыбами.

При гистологическом анализе яичников у части незосревших самок были обнаружены признаки нарушения развития овариальных фолликулов на разных стадиях резорбции (ранняя – резорбция желтка, поздняя – скопления пигмента).

Ранее у осетровых с нарушениями функции половых желез было установлено более низкое содержание Т по сравнению с особями с нормальным состоянием гонад. Кроме того, отмечалось повышение концентрации К в крови у рыб, в яичниках которых присутствовали овариальные фолликулы на ранних фазах резорбции (Баранникова и др., 1997; 2002). Концентрации К в крови у незосревших после гормональной инъекции самок осетра, независимо от фазы резорбции, достоверно не различались и находились на том же уровне (10-15 нг/мл), что и у нормально зосревших рыб.

У самок, не ответивших на гормональную стимуляцию из-за ранней резорбции ооцитов, содержание Т в сыворотке крови было таким же низким, как у зосревших особей, и находилось в пределах от 15 до 24 нг/мл. Самки с ооцитами в фазе поздней резорбции подразделялись на две группы – с низкими (~7 нг/мл) и высокими (>100 нг/мл) концентрациями Т в крови, что, вероятно, было связано с индивидуальными физиологическими особенностями.

Уровень КТ у всех незрелых самок осетра (в том числе и с разной стадией атрезии овариальных фолликулов) существенно не отличался от этого показателя у нормально созревших особей. Это является еще одним свидетельством того, что этот андроген, по-видимому, не играет существенной роли в регуляции завершающих этапов созревания ооцитов.

Рядом авторов предпринимались попытки связать уровни половых гормонов в крови у самок рыб с жизнестойкостью получаемых от них эмбрионов при искусственном воспроизводстве. У некоторых видов была выявлена положительная корреляция между концентрацией половых стероидов в крови самок и выживаемостью эмбрионов (Бурлаков и др., 1991; Подлесных, Сахапов, 1993).

Нами была установлена тенденция к снижению выживаемости эмбрионов (до 0 %НРЭ) у самок осетра с пониженным содержанием Т В отношении К такой закономерности установить не удалось.

Исследование на самцах осетра показало, что у рыб с «плохой» спермой (3-4 балла, подвижность спермиев 1-5 мин) уровни К в крови были достоверно ниже, чем у самцов, давших «отличную» сперму (5 баллов, подвижность спермиев более 10 мин). В группе самцов с «плохой» спермой наблюдались большие индивидуальные колебания по уровню Т. Было установлено, что после введения стимулирующего препарата у самцов осетровых рыб происходило повышение концентраций андрогенов в крови, сменяющееся резким снижением при завершении созревания (Semenkova et al., 2002).

Таким образом, на основании приведенных данных можно заключить, что уровни стероидных гормонов взаимосвязаны с различными процессами нарушений на завершающих этапах гаметогенеза.

Гормональный статус осетра разных биологических групп, используемых в рыбоводстве В современных условиях для рыбоводных целей используются производители осетра разных биологических групп. Сроки резервирования на ОРЗ производителей осетра варьируют в зависимости от принадлежности к той или иной биологической группе. Так, яровой осетр с близкими к зрелости гонадами заходит в реку весной непосредственно перед нерестом, поэтому после вылова выдерживается на заводе до начала гормональной стимуляции не более 1 месяца В отличие от него озимый осетр, проводящий в реке до нереста 6-12 месяцев, отлавливается летом (озимый осетр летнего хода) или осенью (озимый осетр осеннего хода) предыдущего года, и нуждается в длительных сроках выдерживания.

При исследованиях содержания стероидных гормонов у рыб, принадлежащих к разным биологическим группам, наблюдалось пониженное содержание К в крови у самок

и самцов озимого осетра по сравнению с яровыми рыбами. Для интактных самцов озимого осетра после длительного содержания в условиях рыбоводных заводов были характерны пониженные уровни К по сравнению с яровыми самцами ($p < 0,001$). У самок озимого осетра летнего хода, созревших после введения ГПП, уровень К был ниже по сравнению с яровыми самками ($p < 0,05$), несмотря на то, что дозы вводимого гормонального препарата и условия эксперимента были одинаковыми. Та же закономерность наблюдалась при сравнении этого показателя у озимой и яровой белуги после созревания (Семенкова, Баюнова, 1998).

В свою очередь, у интактных самцов озимого осетра наблюдалось и достоверно более низкое содержание КТ ($p < 0,05$) в сыворотке крови по сравнению с яровыми самцами. После спермации подобные различия между озимыми и яровыми самцами были отмечены в отношении Т ($p < 0,05$).

Полученные результаты позволяют предположить, что наблюдаемые различия в содержании стероидных гормонов у осетров различных биологических групп возникли под влиянием выдерживания рыб озимой формы в искусственных условиях.

Несмотря на влияние длительного выдерживания на гормональный статус озимого осетра летнего хода, в целом уровни исследованных стероидов в сыворотке крови остаются в пределах физиологической нормы. Это подтверждается тем, что ооциты у озимых самок весной достигают дефинитивных размеров, которые не отличаются от таковых у яровых рыб. Таким образом, можно считать, что даже при прерывании естественного хода анадромной миграции на ее ранних этапах (у озимого осетра летнего хода) у значительной части особей возможно нормальное функционирование органов воспроизводительной системы, что позволяет использовать этих рыб для искусственного воспроизводства после выдерживания на ОРЗ в течение 10-11 месяцев.

ВЫВОДЫ

1. В сыворотке крови русского осетра выявляются половые различия в содержании тестостерона, 11-кетотестостерона и эстрадиола, начиная с ранних стадий зрелости гонад (II СЗ).
2. У самок и самцов русского осетра развитие гонад и анадромная миграция сопровождается увеличением уровня кортизола и половых стероидов в сыворотке крови.
3. После созревания русского осетра под воздействием ГПП или сурфаона снижаются уровни половых стероидов: тестостерона и эстрадиола у самок, тестостерона и 11-кетотестостерона у самцов. Для самок, созревших после введения

ГП, характерны более низкие уровни кортизола по сравнению с самками, созревшими от сурфагона

- 4 Гонадотропная активность гипофизов самок русского осетра, созревших после введения сурфагона в среднем в 2 раза ниже активности гипофизов самок, созревших от ГП.
- 5 У одних и тех же самцов русского осетра возможна неоднократная индукция спермиации с интервалом в 3-5 дней Каждое последующее созревание сопровождается снижением концентрации тестостерона в сыворотке крови. После третьей гормональной стимуляции уровень тестостерона понижается примерно в 40 раз по сравнению с исходными значениями
- 6 Изменения уровней стероидных гормонов в сыворотке крови русского осетра разных биологических групп на завершающем этапе созревания идут по единой схеме.
- 7 Уровни кортизола и половых стероидов в сыворотке крови русского осетра на заключительных этапах созревания зависят от продолжительности их выдерживания в искусственных условиях до гормональной стимуляции.
8. Нарушения функции гонад отражаются на уровнях стероидных гормонов в сыворотке крови русского осетра.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1 Учитывая влияние длительного выдерживания на гормональный статус производителей озимого осетра (осеннего и летнего периодов хода) следует оптимизировать условия их резервирования на рыбоводных заводах
- 2 Введение сурфагона не приводит к нарушениям гормонального статуса созревающих особей осетра, что позволяет использовать этот препарат для искусственной стимуляции овуляции или спермиации.
3. При заготовке гипофизов от самок русского осетра, созревших под влиянием сурфагона, необходимо учитывать резкое снижение их гонадотропной активности.
- 4 При дефиците производителей русского осетра на рыбоводных заводах возможна неоднократная (2-3 раза) гормональная стимуляция спермиации у одних и тех же самцов через 3-5 дней

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 **А.Б. Груслова** Содержание половых стероидных гормонов в сыворотке крови русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Br) на различных этапах созревания гонад 4-ая

Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей, С-Петербург, 2001, с.77-79.

2 И А. Баранникова, Е Н Артюхин, А.А. Герасимов, **А.Б. Груслова**, И.В. Тренклер. Внутрипопуляционная дифференциация у осетровых и возможности ее использования в формировании популяций при искусственном воспроизводстве Научно-практич. конференция «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России», Адлер, 24-27 сент., 2001, с. 13-14

3 **А.Б. Груслова**, И В Тренклер Возможности повторного использования самцов русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Br) для рыбоводных целей. 2-я Международ научно-практич конф «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития», Астрахань, 21-22 нояб., 2001, с 22-23

4 **А.Б. Груслова**, Л В. Баюнова. Содержание половых стероидных гормонов в сыворотке крови русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Br) при различном состоянии гонад 6-я Пуцинская школа-конф «Биология - наука XXI века», 2002, с. 71-72.

5 **А.Б. Груслова**, Л В. Баюнова Содержание половых стероидов в сыворотке крови самок русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Br) различных биологических групп на завершающих этапах созревания. 4-ая Российская науч-практич конф. «Актуальные вопросы эндокринологии», Пермь, 20-22 мая, 2002, с. 239

6 I A. Barannikova, I. V. Bayunova, **A. B. Gruslova**, T B Semenkova. Serum androgens in male beluga and russian sturgeon (*Acipenseridae*) at final maturation, 21-st Conference of European Comparative Endocrinologists, Bonn, 2002, p. 69

7 **А.Б. Груслова**, И В Тренклер Влияние повторной гормональной стимуляции на уровни кортизола и тестостерона в сыворотке крови самцов русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Br) Международ конф «Современные проблемы Каспия», Астрахань, ноябрь 2002, с. 87-89

8 I A Barannikova, L V Bayunova, **A. B. Gruslova**, T B Semenkova «Steroids in sturgeon's migration regulation», 7th Internat. Symp. On Reproductive Physiology of Fish, Japan, 2003, p. 69.

9 L V Bayunova, I A Barannikova, V P Dyubin, **A. B. Gruslova**, T B Semenkova and I V Trenkler «Sex steroids concentrations in sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* Br) serum and coelomic fluid at final maturation», 7th Internat. Symp. On Reproductive Physiology of Fish, Japan, 2003, p. 82.

10 **А.Б. Груслова**, Л В Баюнова, И В Тренклер Содержание стероидных гормонов в сыворотке крови самок русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Br) после гормональных

воздействий при нормальном созревании ооцитов и при нарушении функции гонад. Рос. физиолог. журнал им. Сеченова, 2003, т. 89, № 11, с. 1388-1395.

11. И.А. Баранникова, Л.В. Баюнова, Т.Б. Семенкова, **А.Б. Груслова**. Стероиды в регуляции миграции у рыб. Рос. физиолог. журнал им. Сеченова, 2003, т. 89, № 11, с. 1380-1387.

Лицензия ЛР № 020593 от 7.08.97
Налоговая льгота — Общероссийский классификатор продукции
ОК 005-93, т. 2; 953004 научная и производственная литература

Подписано в печать 25 02 2004
Тираж 100 экз

Объем в п л 1,0
Заказ № 91

Отпечатано с готового оригинал-макета,
предоставленного автором,
в типографии Издательства СПбГУ
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул , 29.

Отпечатано на ризографе RN-2000 FP
Поставщик оборудования — фирма “Р-ПРИНТ”
Телефон: (812) 110-65-09
Факс: (812) 315-23-04

РНБ Русский фонд

2007-4

6446

05 МАР 2004