

УДК 639.3

¹И.В. Тренклер, ^{1,2}Л.В. Баюнова**ПРОДЛЕНИЕ СПЕРМИАЦИИ У САМЦОВ РУССКОГО ОСЕТРА ЗА СЧЕТ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ГОРМОНАЛЬНЫХ ИНЪЕКЦИЙ**

¹Центральная лаборатория по воспроизводству рыбных запасов, ФГБУ «Севзапрыбвод», ул. Проф. Попова, 24, Санкт-Петербург, 197022, Россия, e-mail: trenkler@list.ru; ²ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской Академии Наук», пр. М. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223, Россия, e-mail: bayunoval@mail.ru

Сохранение природных популяций рыб методами заводского воспроизводства предполагает использовать в рыбоводном процессе все генетическое разнообразие производителей, однако в настоящее время рыбоводы вынуждены отбраковывать самок русского осетра, ооциты которых не достигли к началу весеннего рыбоводного сезона дефинитивных значений средней массы и степени поляризации. Одним из факторов, ограничивающих возможности продления рыбоводного сезона для созревания самок с задержкой вителлогенеза, является недостаток зрелых самцов. В работе исследованы возможности продления спермации у самцов русского осетра за счет дополнительных инъекций глициринового гипофизарного препарата (ГТП) или сурфагона – суперактивного аналога гонадотропин-релизинг-гормона млекопитающих. Рассмотрены дозировки препаратов и их сравнительная эффективность в зависимости от температуры воды и интервалов между инъекциями. Показаны изменения гистологической структуры семенников после неоднократной стимуляции. В ходе этого процесса происходит последовательное сокращение количества спермиев в семенных канальцах, что делает практически невозможным (или нецелесообразным) 4-е инъектирование. Методом твердофазного иммуноферментного анализа исследованы изменения уровней тестостерона и 11-кетотестостерона в сыворотке крови. Показано, что после кратковременного небольшого подъема уровней обоих андрогенов, совпадающего с началом спермации (12 час. после инъекции), наблюдается их резкое снижение. Повторные инъекции ГТП или сурфагона, стимулирующие усиление или даже возобновление спермации, не вызывают новых подъемов уровней андрогенов. Принципиальной разницы в действии этих двух препаратов на показатели стероидных гормонов выявлено не было. Полученные данные продемонстрировали возможность дополнительного инъектирования самцов русского осетра и, вероятно, других осетровых рыб, с целью продления спермации и максимально полного использования их репродуктивного потенциала.

Сохранение природных популяций рыб методами заводского воспроизводства предполагает использовать в рыбоводном процессе все генетическое разнообразие производителей. Для осетровых, однако, в начальный период нерестовой миграции характерна высокая степень гетерогенности по состоянию гонад [1,2,3]. Даже в пределах одной «биологической группы» - «озимого осетра летнего хода» показатели «навески» (количества ооцитов в 1 г) у одновременно выловленных самок в низовьях Волги могут варьировать в очень широких пределах – от 80 до 200 шт./г и более. К началу нерестового периода различия в состоянии репродуктивной системы сглаживаются, но полностью не исчезают, поэтому особи, поступившие на рыбоводные заводы с «навеской» более 200 шт./г, с очень высокой долей вероятности весной следующего года имеют только III-IV или IV незавершенную стадию зрелости гонад. Это вынуждает рыбоводов либо отбраковывать таких рыб, либо существенно растягивать рыбоводный процесс, перенося получение зрелой икры от них на более поздние сроки [4, 5].

Удлинение сроков работы с производителями при весьма ограниченных масштабах заготовки диких рыб и резком преобладании самок в ремонтно-маточных стадах невозможно осуществить без максимального продления спермации у самцов, способных давать полноценную сперму. Возможности продления и усиления спермации за счет дополнительной гормональной обработки изучались нами с начала 2000 годов [6, 7, 8]. Вместе с тем, данные по физиологическим аспектам продления спермации за счет дополнительных инъекций весьма фрагментарны [9, 10].

В настоящей работе исследовано влияние повторных гормональных инъекций на изменения уровней андрогенов в сыворотке крови и состояние гонад у этого вида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сбор материала проводился на Александровском осетровом рыбоводном заводе в низовьях Волги с 2004 по 2011 г. Для первой инъекции использовали сурфагон в дозе 15 мкг на рыбу (1,5-2 мкг/кг). Повторную гормональную стимуляцию проводили только нормально созревшим после 1-й инъекции особям, вводя ГТП (от 50 до 66 Л.Е.) или 20-25 мкг сурфагона на особь.

Сбор материала для гистологической обработки (пробы ткани семенников) проводился в 2004-2007 г. (в более поздние годы самцы после получения спермы не забивались). Для фиксации в жидкости Буэна вырезали участок семенника (примерно 0,5х0,5х1 см) из центральной части железы. После фиксации материал проводили через спирты возрастающей крепости и хлороформ с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 5-6 мкм окрашивались железным гематоксилином по Гейденгау.

Для измерения концентрации стероидных гормонов был использован твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Взятие проб крови из хвостовой вены (прижизненно) проводилось в 2004 и 2011 гг.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние семенников самцов осетра на IV стадии зрелости гонад показано на рис. 1. Семенные каналцы на этой стадии забиты зрелыми спермиями. Введение таким рыбам сурфагона сопровождалось спермацией, которая начиналась примерно через 12 час. и достигала максимума через 18-24 час. после инъекции, в зависимости от температуры воды. Через 2-3 дня после инъекции спермация существенно ослаблялась (снижались как объемы продуцируемой спермы, так и ее концентрация). Забой контрольных самцов после затухания спермации показал, что содержание спермиев в семенных каналцах почти не изменилось (рис. 2), что создает предпосылки для дополнительной гормональной стимуляции.

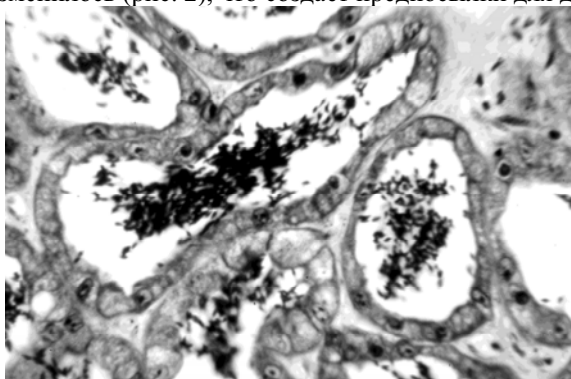


Рис. 3. Срез семенника после 3-й инъекции. Вакуолизация содержимого семенных каналцев резко усилилась, а содержание в них спермиев, соответственно, сократилось. Ув. 400х.

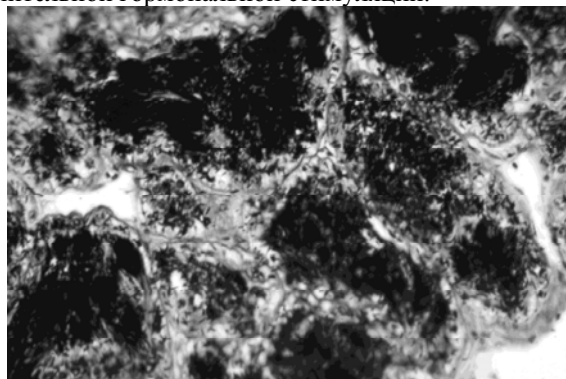


Рис. 4. Срез семенника самца осетра, не ответившего на дополнительную инъекцию. В семенных каналцах идет процесс резорбции спермиев. Ув. 400х.

Дополнительная инъекция ГПП на нижнем и среднем диапазоне нерестовых температур (до 14-14,5 °С) стимулировала спермацию у большинства самцов при продолжительности интервала между инъекциями до 6 дней. При увеличении этого интервала до 10 сут. эффективность второй инъекции существенно снижалась. Действие сурфагона при повторной инъекции либо оказывалось аналогичным введению ГПП (при относительно небольших интервалах между инъекциями – 3-4 дня и температуре воды до 13-13,5°С), либо уступало по эффективности введению ГПП (особенно во второй половине рыбоводного сезона и больших интервалах между инъекциями). Третья гормональная стимуляция в большинстве случаев вызывала освобождение спермы у весьма ограниченного числа самцов, особенно при больших интервалах между 1-2-й или 2-3-й инъекциями. Сурфагон при 3-й инъекции явно уступал ГПП по своей эффективности.

Содержание спермиев в семенных каналцах последовательно снижалось после каждой инъекции, в результате уже после 3-й инъекции в семенниках наблюдалось значительное истощение запасов спермы (рис. 3), что исключало возможность 4-го инъектирования. Другим вариантом прекращения спермации следует считать процесс резорбции спермиев (рис. 4), который делает невозможным ответы на дополнительные инъекции как сурфагона, так и ГПП.

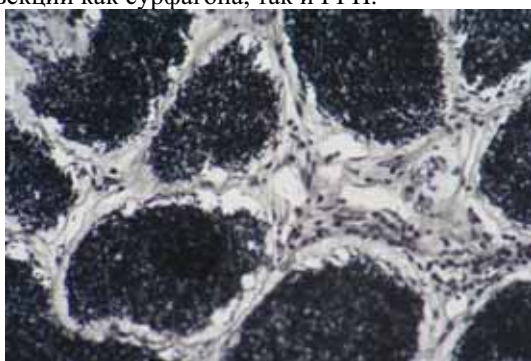


Рис. 1. Срез семенника интактного самца осетра после 1-й инъекции. Семенные каналцы заполнены спермиями. Ув. 400х.

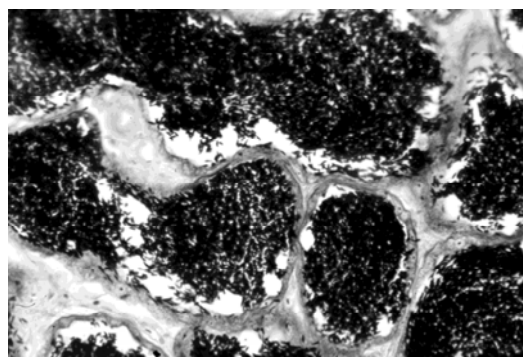


Рис. 2. Срез семенника после 1-й инъекции. Появление «вакуолей» около стенок семенных каналцев свидетельствует об интенсивном процессе образования и выведения спермы. Ув. 400х.

Для всех самцов осетра на IV стадии зрелости гонад характерно высокое содержание тестостерона и 11-кетотестостерона в сыворотке крови. После однократной инъекции сурфагона обычно наблюдаются кратковременные пики андрогенов [11], следы которых мы зарегистрировали через 12 час. после инъекции (рис. 5 и 6).

С момента начала спермации уровни обоих андрогенов последовательно снижались, почти достигая нижнего предела измерений через 7 дн. после инъекции. 2-я и 3-я инъекция (введение ГПП) не приводили к

подъему уровней тестостерона и 11-кетотестостерона. Использование при 2-й инъекции сурфагона вместо ГТП не меняло профилей стероидных гормонов – мы не отмечали какого-либо подъема андрогенов после гормональной инъекции (рис. 7 и 8). Таким образом, усиление спермации под влиянием дополнительных инъекции (независимо от природы вводимого препарата) проходило на фоне очень низких значений концентрации обоих андрогенов в сыворотке крови, совершенно нетипичных для зрелых самцов этого вида.

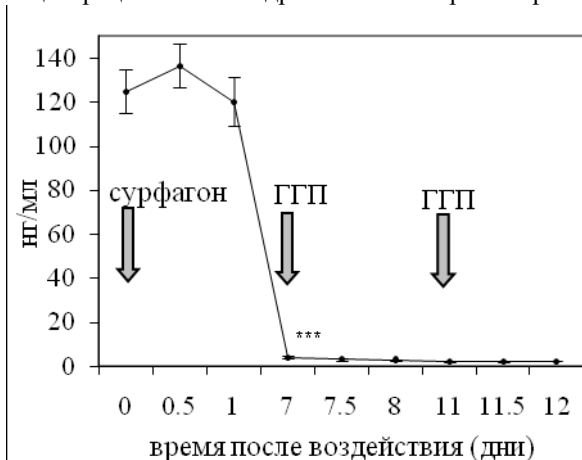


Рис. 5. Изменения уровней тестостерона в сыворотке крови самцов русского осетра (n=9) в процессе трехкратной гормональной стимуляции (С+ГТП+ГТП). Стрелки показывают момент инъектирования. Опыт 2004 г.

*** - Различия достоверны по сравнению с исходными значениями ($P < 0,001$).

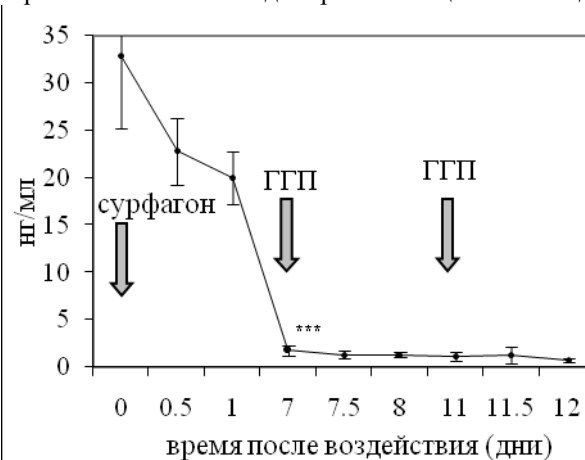


Рис. 6. Изменения уровней 11-кетотестостерона в сыворотке крови самцов русского осетра (n=9) в процессе трехкратной гормональной стимуляции (С+ГТП+ГТП). Стрелки показывают момент инъектирования. Опыт 2004 г.

*** - Различия достоверны по сравнению с исходными значениями ($P < 0,001$).

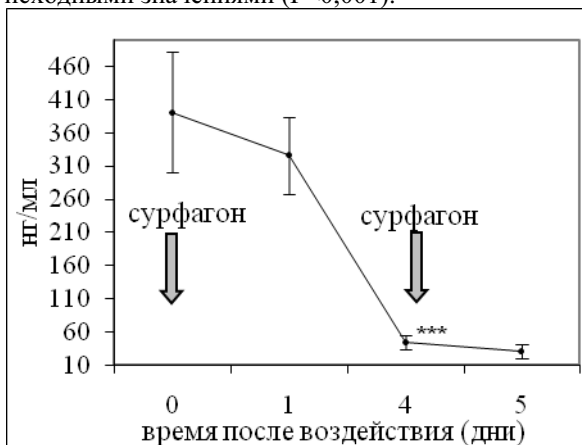


Рис. 7. Изменения уровней тестостерона в сыворотке крови самцов русского осетра (n=6) в процессе двукратной гормональной стимуляции (С+С). Стрелки показывают время инъектирования. Опыт 2011 г.

*** - Различия достоверны по сравнению с исходными значениями ($P < 0,001$).

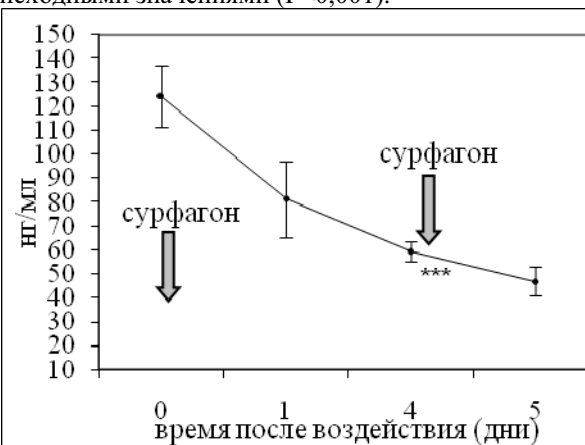


Рис. 8. Изменения уровней 11-кетотестостерона в сыворотке крови самцов русского осетра (n=6) в процессе двукратной гормональной стимуляции (С+С). Стрелки показывают время инъектирования. Опыт 2011 г.

*** - Различия достоверны по сравнению с исходными значениями ($P < 0,001$).

Полученные результаты показали возможность дополнительного инъектирования самцов русского осетра как ГТП, так и сурфагоном. При интервалах между инъекциями от 3 до 5 дней, общая продолжительность периода, в течение которого может быть получена рыболовная сперма от какой-то партии самцов, может составлять до 8-12 дней. С учетом возможности хранения на льду собранной спермы в полиэтиленовых мешках, заполненных кислородом [12], этот срок вполне может быть продлен примерно до 2-2,5 недель, что позволяет проводить дополнительное выдерживание до перехода в преднерестное состояние самок осетра с небольшими задержками вителлогенеза.

Кроме того, данный метод позволяет более экономно использовать репродуктивный потенциал заготовленных самцов, это дает возможность резервировать какую-то часть производителей (при температурах воды ниже нерестовых) для оплодотворения икры тех самок, которым для перехода в преднерестное состояние потребуется больший срок дополнительного выдерживания, чем 2,5 недели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гербильский Н. Л. Биологические группы куринского осетра (*Acipenser gueldenstaedti persicus* Borodin) и основание для их заводского воспроизводства // Докл. АН СССР. – 1950. – Т. 71. – № 4. – С. 785-788.
2. Баранникова И.А. Биологическая дифференциация стада каспийского осетра (в связи с задачами промышленного осетроводства в дельте Волги) // Ученые записки ЛГУ. 1957. – № 228. – Вып. 44. – С. 54-71.
3. Баранникова И.А. Функциональные основы миграций. Л.: Наука. Ленингр. Отд. – 1975. – 210. с.
4. Тренклер И.В. Асинхронность созревания самок волго-каспийского осетра в условиях рыбоводного завода. В кн.: «Научные основы сельскохозяйственного рыбоводства: состояние и перспективы развития», М.: ВНИИР. – 2010. – С. 398-404.
5. Тренклер И.В., Рудометкин Л.Ф. Применение экспресс-анализа состояния ооцитов при ранних сроках получения зрелых половых клеток русского осетра на рыбоводных заводах // Мат. IV Междунар. Науч.-практ. Конф. «Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений». Астрахань. – 2011. – С. 239-243.
6. Груслова А.Б., Тренклер И.В. Возможности повторного использования самцов русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Br.) для рыбоводных целей // Мат. 2-й Междунар. научно-практ. конф. «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития». Астрахань. 21-22 ноября 2001. – С. 22-23.
7. Тренклер И.В. Возможности усиления и продления спермации у самцов русского осетра за счет дополнительной инъекции сурфагона // Доклады Международной научно-практической конференции «Развитие аквакультуры в регионах: проблемы и возможности». 10-11 ноября 2011 г., М. ВНИИР. – С. 186-194.
8. Тренклер И.В., Груслова А.Б. Возможности получения спермы высокого качества от самцов осетра и белуги озимых и яровых форм // Мат. Доклады IV Междунар. Науч.-практ. конф. «Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития». Астрахань, март 2006. – С. 127-130.
9. Груслова А.Б., Тренклер И.В. Влияние повторной гормональной стимуляции на уровни кортизола и тестостерона в сыворотке крови самцов русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Br.) // Мат. Международ. конф. «Современные проблемы Каспия». Астрахань, ноябрь 2002. – С. 87-89.
10. Тренклер И.В., Груслова А.Б., Мочарук О.Г., Баюнова Л.В., Семенкова Т.Б. Изменения гонадотропной активности гипофиза и уровней половых стероидов в сыворотке крови у самцов русского осетра после дополнительных инъекций гипофизарного препарата или аналога ЛГ-РГ // Тезисы VIII Всероссийской конференции «Нейроэндокринология-2010», Санкт-Петербург: «Олимп-СПб», 2010. – С. 137-139.
11. Semenkova T.B., Barannikova I.A., Kime D.E., McAllister B.G., Bayunova L.V., Dyubin V.P. and Kolmakov N. Sex steroids profiles in female and male stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during final maturation induced by hormonal treatment // J. Appl. Ichtiol. 2002. V. 18. – P. 375-381.
12. Методические рекомендации для стимуляции созревания самок и самцов осетровых рыб на рыбоводных заводах дельты Волги (сост. И.В. Тренклером) // Санкт-Петербург, ФГУ Севзаприбвод: «ШНК». – 2010. – 44 с.

Зауыттың көбейту әдісімен табиғи популяцияны сақтап қалудағы балық өсіру процесінде барлық генетикалық алуан түрлі өндірісті пайдалану ұйғарылған, бірақ қазіргі уақытта балық өсіруші мамандар көктемгі балық өсіру маусымына дейін ооциттерінің орташа массасы дефинитивтік мәнге поляризация дәрежесіне жетпеген орыс бекіресінің аналықтары деп тануға мәжбүр. Балық өсіру маусымын вителлогенезі ірікпен аналықтардың толықтай пісіп-жетілгенге дейін ұзартуды шектейтін тағы бір себепкер пісіп-жетілген аналықтардың жетіспеуі болып табылады. Жұмыста глицеринді-гипофиздік препаратты (ГПП) және сурфагонды – сүтқоректілердің гонадотропты-релизинг-гормонының баламасын егу арқылы орыс бекіресі аналықтарының спермациясын созу мүмкіндіктері зерттелген. Препараттардың мөлшері және су температурасы мен егу аралығындағы интервалға қарай олардың салыстырмалы тиімділігі қарастырылған. Бірнеше рет қолдау көрсетілгеннен кейінгі ұрықтың гистологиялық құрылымындағы өзгерістері көрсетілген. Бұл процесс барысында ұрық жолдарындағы ұрық санының біртіндеп азайғаны байқалады, бұл 4-ші рет егуді керек қылмауға (немесе пайдасыз) алып келеді. Қатты фазада иммуноферменттік зерттеу әдісі қан сарысуындағы (іріткісіндегі) тестостерон мен 11-кетотестостерон деңгейінің өзгерістері зерттелген. Шамамен спермацияның басталу уақытына сәйкес келетін (егуден кейін 12 сағ.) осы екі андроген деңгейінің қысқа уақытқа көтерілуінен кейін, олардың күрт азаюы байқалатыны көрсетілген. Спермацияның күшеюі немесе қайтадан басталуына қолдау көрсететін ГПП-ның немесе сурфагонның қайталану егілуі андрогендер деңгейінің жаңадан көтерілуіне әкелмейді. Бұл препараттарды стероидтық гармондардың көрсеткішіне әсер етуіндегі анық (ұстанымды) айырмашылықтар анықталған жоқ. Алынған мәліметтер орыс бекіресінің, мүмкін, басқа да бекіре тұқымдастардың аналықтарын, олардың спермациясын ұзарту үшін және олардың мүмкіндіктерін барынша толығымен пайдалану мақсатында қосымша егу мүмкін екенін көрсетті.

Reservation of natural populations by methods of artificial breeding needs in using all genetic diversity of breeders. However now aquaculturists have to reject the female sturgeons having oocytes with low degree of polarization and average weight below definitive value at the beginning of spring spawning season. The shortage of mature males is one of the factors limiting possibilities of spring breeding period prolongation for maturation of females with retarded vitellogenesis. The possibilities of Russian sturgeon male spermiation prolongation by the supplemental injections of sturgeon glycerol pituitary preparation (GPP) or synthetic superactive LH-RH analogue (surfagon) were investigated. The data showed that the optimal doses of both preparations and their comparative effectiveness depend on water temperature and intervals between injections. The histological changes of testis structure after multiple injections were demonstrated. The continued decline of spermatozoa content in seminal tubules took place during this process making impossible 4-th injection. The testosterone and 11-ketotestosterone blood serum levels had been measured by enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA). The slight increase of both androgens at the moment of induction of spermiation (12 hours after 1-st injection) was followed by their sharp decline. The supplemental injections of GPP or surfagon stimulated enforcement or even re-starting of spermiation but did not induce new androgen level's elevations. Significant differences in influence of two preparations on androgen's profiles were not observed. The data indicates the possibilities of supplemental hormonal treatment of Russian sturgeon males and likely the males of others sturgeon species for spermiation prolongation and their reproductive potential maximal using.

УДК 597-15

Н.Н. Тулькибаева, Н.Ш. Мамилов
ОБ АДАПТАЦИОННЫХ ВОЗМОЖНОСТЯХ НЕКОТОРЫХ АБОРИГЕННЫХ И ЧУЖЕРОДНЫХ
ВИДОВ РЫБ БАЛКАШСКОГО БАССЕЙНА

ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии» РГП «Казахский
национальный университет имени аль-Фараби», г. Алматы, Республика Казахстан.

E-mail: mybiolife-87@mail.ru

Установлено, что в аквариальных условиях возможно сосуществование большинства аборигенных для Балкашского бассейна и проникших в него чужеродных непромысловых видов рыб. Наибольшими адапта-