

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 597.593.7.574.52.591.16

ВЛИЯНИЕ ТИОМОЧЕВИНЫ И ГОЛОДАНИЯ НА ФИЗИОЛОГО-
БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ И РЕПРОДУКТИВНУЮ
СИСТЕМУ АНАБАСА *ANABAS TESTUDINEUS*

© 2019 г. Е. Д. Павлов¹, *, Е. В. Ганжа¹, Д. С. Павлов¹

¹Институт проблем экологии и эволюции РАН – ИПЭЭ РАН, Москва, Россия

*E-mail: p-a-v@nxt.ru

Поступила в редакцию 24.09.2018 г.

После доработки 24.09.2018 г.

Принята в печать 11.10.2018 г.

Изучено воздействие тиомочевина (содержание рыб в течение 32 сут. в 0.05%-ном растворе) и голодания (в течение 12 сут.) на физиолого-биохимическое состояние и репродуктивную систему половозрелых самцов анабаса *Anabas testudineus*. Установлено, что сочетание действия этих двух факторов приводит к снижению уровня половых стероидных гормонов (тестостерона и эстрадиола-17β) в крови, изменениям в синтезе тироксина, его переходе в трийодтиронин и к ускорению сперматогенеза.

Ключевые слова: анабас *Anabas testudineus*, самцы, тиомочевина, тиреоидные гормоны, половые стероидные гормоны, голодание.

DOI: 10.1134/S0042875219030160

Одними из гормонов-регуляторов миграционной активности у рыб являются тиреоидные гормоны (Woodhead, 1975; Høgåsen, Prunet, 1997; Павлов и др., 2014). Присутствующие в воде химические вещества могут оказывать влияние на синтез этих гормонов. Одним из таких реагентов является тиомочевина (ТМ). Показано, что выдерживание кефали *Chelon saliens* в 0.05%-ном растворе ТМ до 20 сут. катализирует синтез щитовидной железой тиреоидных гормонов, а при более длительном воздействии, напротив, подавляет их синтез (Моисеева, 1989).

Ранее мы провели работу по оценке влияния ТМ той же концентрации на миграционное поведение анабаса *Anabas testudineus* (Павлов и др., 2018). Установлено, что содержание опытных рыб в растворе ТМ в течение 20 сут. стимулирует их двигаться преимущественно вверх против течения. Последующее голодание анабаса в течение 12 сут., которое применялось в качестве катализатора миграционной активности рыб (Pavlov et al., 2010; Павлов и др., 2010), нивелирует различия в миграционном поведении между рыбами, продолжающими находиться в растворе ТМ (опыт), и особями, которых содержали в чистой воде (контроль). В упомянутой работе влияние ТМ на физиолого-биохимическое состояние рыб рассмотрено не было. В то же время воздействие ТМ на поведение рыб происходит опосредованно путём изменения гормональной регуляции в организме.

Изучение уровня гормонов и оценка состояния репродуктивной системы дают возможность определить внутреннюю реакцию организма рыб на воздействие ТМ.

Цель настоящей работы – выяснить цитологическое состояние гонад и уровень тиреоидных и половых стероидных гормонов у анабаса по завершении указанного выше эксперимента (после содержания рыб в течение 32 сут. в растворе тиомочевина и 12-суточного голодания).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал собран в феврале–марте 2014 г. в Приморском отделении Российско-вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (СРВ, провинция Кханьхоа, г. Нячанг). Объект исследования – половозрелые самцы анабаса (средняя длина 8.1 см, масса 12.7 г), приобретённые на рынке близ г. Камрань.

Рыб содержали в двух круглых бетонных бассейнах диаметром 1.9 м при уровне воды около 0.2 м (по 100 экз. в каждом бассейне). Температура воды составляла 27–30°C. В бассейн с опытными рыбами добавляли тиомочевину $CS(NH_2)_2$, концентрация полученного раствора составляла 0.05% действующего вещества. Кристаллы тиомочевина предварительно растворяли в 10 л воды. Смену

Таблица 1. Соотношение особей анабаса *Anabas testudineus* с гонадами разных стадий зрелости в опытной (32 сут. в 0.05%-ном растворе тиомочевины) и контрольной (чистая вода) группах, %

Группа	Стадия зрелости гонад			
	III	IV	IV–V	V
Опыт	50.0	17.5	–	32.5
Контроль	86.0	3.0	11.0	–

воды в бассейнах и последующее добавление ТМ осуществляли один раз в неделю. Рыбы во втором бассейне находились в чистой воде и служили в качестве контроля. В течение 20 сут. анабаса кормили ежедневно сухим гранулированным кормом Humpy Head (“Yi Hu Fish Farm Trading”, Сингапур) с диаметром гранул 1–3 мм из расчёта 15% средней массы особи (корм давали в избытке). Затем в течение 12 сут. рыб обеих групп содержали без кормления. В конце эксперимента (после 12 сут. голодания – на 32-е сут. влияния ТМ на опытных рыб) у рыб опытной (44 экз.) и контрольной (36 экз.) групп взяли пробы крови и фрагменты гонад.

Кровь отбирали из хвостовой вены рыб при помощи шприца объёмом 1 мл³ и центрифугировали в течение 5 мин при скорости 5000 об/мин. Полученную плазму переливали в стерильные пробирки и хранили в морозильной камере при температуре от –30 до –20°C. Методом иммуноферментного анализа с использованием тест-наборов (“DRG”, ФРГ) у каждой особи определяли концентрацию тироксина (Т₄), трийодтиронина (Т₃), тестостерона и эстрадиола-17β. Каждая проба была исследована на содержание этих гормонов в трёх повторностях. Рассчитывали отношение тиреоидных гормонов (Т₄/Т₃) для установления зависимой динамики их содержания в крови, поскольку известно, что за счёт процесса дейодирования Т₄ расщепляется до Т₃ (Сур, Eales, 1996; Hulbert, 2000).

Фрагменты генеративной ткани для оценки цитологического состояния половых желёз фиксировали в жидкости Буэна. Гистологические препараты изготавливали по стандартным методикам (Ромейс, 1953; Павлов и др., 2014). Фотографии срезов половых желёз получены при помощи моторизованного микроскопа Keyence Biorevo BZ-9000 (Япония). Оценивали цитологическое состояние половых желёз, определяли стадию их зрелости (Макеева, 1992). Скорость сперматогенеза оценивали по отношению занимаемой площади созревшими клетками (сперматозоидами) к общей площади среза генеративной ткани, захваченной объективом микроскопа. Расчёт числа клеток на срезе семенника проводили при помощи программного обеспечения ImageJ ver. 1.51k.

Статистическая обработка материала выполнена по индивидуальным показателям с использованием дисперсионного анализа, критерия Стьюдента для долей, а также *t*-критерия Стьюдента и *U*-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Половые железы. Как у опытных, так и у контрольных рыб выделены III, IV и переходная IV–V стадия зрелости гонад. В опытной группе обнаружены особи с гонадами V стадии зрелости (табл. 1). В пределах стадии зрелости цитологические различия между рыбами сравниваемых групп не выявлены.

В семенниках III стадии зрелости присутствуют сперматоциты I и II порядка, сперматиды, сперматозоиды. Преобладают сперматоциты I и II порядков. Сперматоциты II порядка примерно в 1.5 раза меньше сперматоцитов I порядка. Клетки раннего состояния – сперматогонии – единичны (рисунок, а). Появляются цисты со сперматидами. Сперматозоиды немногочисленны, интенсивнее окрашены, чем другие типы клеток, лежат в генеративной ткани компактно, имеют жгутик.

Для гонад IV стадии зрелости характерно наличие тех же типов клеток, но в другом количественном соотношении: возрастает число сперматозоидов в просветах семенных канальцев, увеличивающихся в размерах; снижается число клеток раннего состояния – сперматоцитов и сперматид (рисунок, б).

В половых железах IV–V стадии зрелости генеративная ткань преимущественно заполнена достигшими максимальных размеров семенными канальцами со сперматозоидами. В периферической части канальцев локализованы немногочисленные клетки более раннего состояния – сперматоциты и сперматиды (рисунок, в).

На гистологических срезах гонад, находящихся на V стадии зрелости, семенные канальцы целиком заполнены сперматозоидами (рисунок, г). Во многих половых железах на этой стадии зрелости присутствуют клетки ранней генерации – сперматогонии (рисунок, д). По всей видимости, это клетки, относящиеся к следующей порции половых продуктов. В некоторых гонадах сперматогонии многочисленны, что, по всей видимости, на фоне небольшой гипертрофии соединительной ткани приводит к хаотичному расположению семенных канальцев разного размера и формы, содержащих сперматозоиды (рисунок, е).

Доля особей с гонадами той или иной стадии зрелости различалась ($p < 0.05$ по критерию Стьюдента для долей) в опыте и контроле (табл. 1). У многих рыб опытной группы скорость сперматогенеза была выше, чем у особей из контрольной.

Таблица 2. Уровень тиреоидных и половых стероидных гормонов у особей анабаса *Anabas testudineus* опытной (32 сут. в 0.05%-ном растворе тиомочевины) и контрольной (чистая вода) групп на 12-е сут. голодания

Показатель	Опыт (44 экз.)	Контроль (36 экз.)	U-критерий Манна–Уитни, <i>p</i>
Трийодтиронин (Т ₃), нг/мл	$\frac{1.6 \pm 0.06}{0.3-2.4}$	$\frac{1.8 \pm 0.08}{0.3-2.8}$	>0.05
Тироксин (Т ₄), нг/мл	$\frac{19.3 \pm 0.81}{10.2-35.4}$	$\frac{17.7 \pm 1.05}{8.8-47.0}$	<0.01
Т ₄ /Т ₃	$\frac{28.9 \pm 7.51}{5.1-270.0}$	$\frac{11.2 \pm 0.75}{4.0-26.0}$	<0.05
Тестостерон, нг/мл	$\frac{9.4 \pm 0.90}{1.9-27.3}$	$\frac{17.2 \pm 0.22}{13.7-20.8}$	<0.001
Эстрадиол-17β, пг/мл	$\frac{104 \pm 8.2}{41-318}$	$\frac{248 \pm 56.2}{64-2060}$	<0.01

Примечание. Над чертой – среднее значение показателя и его ошибка, под чертой – пределы варьирования показателя.

У опытных особей в семенниках III, IV и IV–V стадий зрелости сперматозоиды занимают большую площадь среза ($p < 0.001$ по *t*-критерию Стьюдента), чем в гонадах контрольных рыб, – 44.4 ± 0.02 (22.2–72.2) против 26.2 ± 0.017 (11.9–52.1)%.

Тиреоидные и половые стероидные гормоны. По данным однофакторного дисперсионного анализа, концентрация всех исследованных гормонов в крови анабаса и показатель отношения Т₄ к Т₃ связаны ($p < 0.001$) с принадлежностью особей к опытной или контрольной группе. У опытных рыб по сравнению с контрольными выше уровень тироксина в крови и значение Т₄/Т₃ на фоне более низкой концентрации тестостерона и эстрадиола-17β (табл. 2). Концентрация Т₃ у рыб из двух групп практически не различается.

ОБСУЖДЕНИЕ

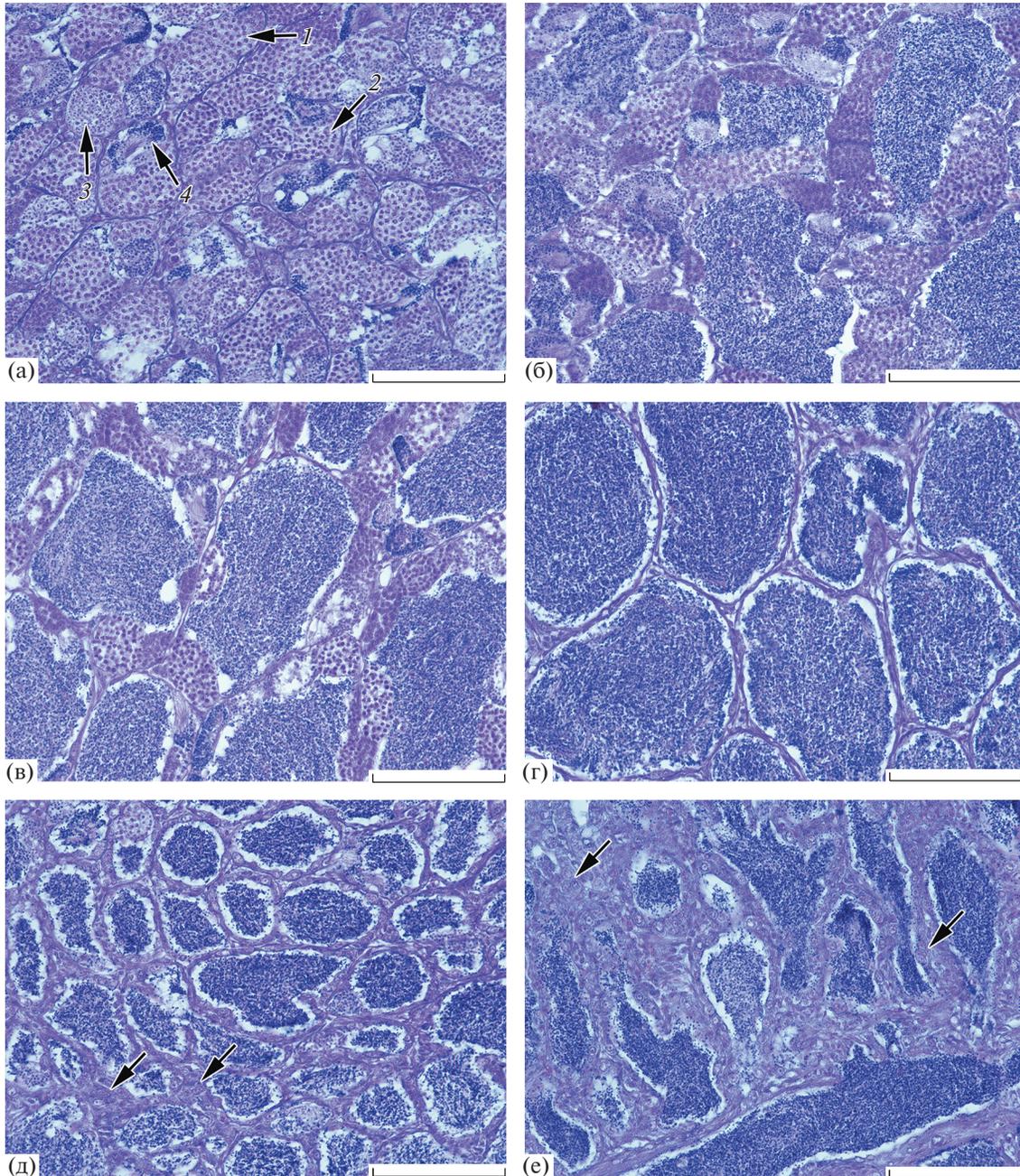
Результаты исследования показали, что содержание анабаса в растворе ТМ в течение 32 сут. в значительной степени модифицирует репродуктивную систему у самцов – ускоряет сперматогенез и изменяет концентрацию половых стероидных гормонов. Об этом свидетельствуют как присутствие в опытной группе особей с гонадами V стадии зрелости, так и большая площадь гистологического среза, занимаемая сперматозоидами на III и IV стадиях зрелости гонад. Уровень половых стероидных гормонов зависит от степени созревания половых желёз. При достижении гонадами поздних стадий зрелости нет необходимости сохранять высокую концентрацию этих гормонов в организме (Sisneros et al., 2004). Поэтому концентрация половых стероидных гормонов в крови опытных рыб снижается по сравнению с контрольными особями в среднем примерно в два раза. При

содержании анабаса в растворе тиомочевины (32 сут.) и сопряжённом с ним продолжительном голодании (12 сут.) у опытных рыб по сравнению с контрольными повышается уровень Т₄ в крови, а концентрация Т₃ не изменяется.

Т₃ является гормоном-индикатором изменения миграционной активности рыб (Павлов и др., 2014). Отсутствие различий по этому гормону в данном исследовании подтверждает выявленное ранее (Павлов и др., 2018) в конце опыта сходное миграционное поведение у рыб, помещённых в раствор тиомочевины, и особей, содержащихся в чистой воде. В целом отсутствие значимых отличий в поведении указывает либо на изменение направленности действия ТМ к 32-м сут., либо на значительное влияние фактора голодания на миграционное поведение опытных рыб.

Повышение концентрации Т₄ у рыб, содержащихся 32 сут. в растворе ТМ, не оказывает значимого влияния на их миграционную активность: как отмечено выше, она не различается между исследованными группами (Павлов и др., 2018). Изменение уровня этого гормона, по-видимому, связано либо с воздействием ТМ, либо с голоданием особей.

Различия по величине Т₄ и показателю Т₄/Т₃ между особями опытной и контрольной групп могут быть обусловлены и разной реакцией рыб на продолжительное голодание. По нашим наблюдениям (Павлов и др., 2018), через несколько суток после пересадки в раствор ТМ рыбы потребляли заметно меньше корма по сравнению с особями, содержащимися в чистой воде. Вероятно, влияние ТМ привело к изменению реакции рыб на последующее голодание и выразилось также в более раннем увеличении доли скатывающихся особей по сравнению с контрольной группой



Семенники анабаса *Anabas testudineus* разных стадий зрелости: а – III, б – IV, в – IV–V; г – е – V (г – семенные канальцы заполнены сперматозоидами, д – сперматогонии (→) в периферической части семенных канальцев со сперматозоидами, е – семенные канальцы разного размера и формы среди сперматогониев (→) и разросшейся соединительной ткани); 1 – сперматоциты I порядка, 2 – сперматоциты II порядка, 3 – сперматиды, 4 – сперматозоиды. Масштаб: 100 мкм.

(Павлов и др., 2018). Кроме того, следует отметить, что уровень T_4 выше у рыб с интенсивно протекающим гаметогенезом (Павлов и др., 2014), поэтому рост концентрации этого гормона у рыб, содержащихся в ТМ, может быть связан с тем, что у них быстрее идёт созревание половых желёз.

Таким образом, сочетание действия тиомочевины и голодания модифицирует как функциониру-

вание тиреоидной оси у анабаса, так и работу его репродуктивной системы. Изменение уровня T_4 у рыб, содержащихся в растворе тиомочевины, вероятно, носит временный характер и при нивелировании её действия установится на прежнем уровне. Реакция репродуктивной системы на воздействие тиомочевины более выражена – заметно ускорится сперматогенез.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам Приморского отделения Российско-вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра за помощь при сборе материала; М.М. Шаровой (ИПЭЭ РАН) – за участие в обработке материала; А.О. Касумяну (МГУ) – за ценные замечания по тексту рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН “Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Макеева А.П. 1992. Эмбриология рыб. М.: Изд-во МГУ, 216 с.
- Моисеева Е.Б. 1989. Дифференцировка тиреотропных клеток и гипофизарно-тиреоидные отношения у молоди кефали *Liza saliens* // Биология моря. № 1. С. 32–39.
- Павлов Д.С., Костин В.В., Пономарева В.Ю. 2010. Поведенческая дифференциация сеголеток черноморской кумжи *Salmo trutta labrax*: реореакция в год, предшествующий смолтификации // Вопр. ихтиологии. Т. 50. № 2. С. 251–261.
- Павлов Д.С., Павлов Е.Д., Ганжа Е.В. и др. 2014. Цитологическое состояние гонад и уровень тиреоидных и половых стероидных гормонов у двух фенотипических форм молоди черноморской кумжи *Salmo trutta labrax* // Там же. Т. 54. № 4. С. 470–478.
- Павлов Е.Д., Павлов Д.С., Ганжа Е.В. и др. 2018. Влияние тиомочевины на поведение анабаса *Anabas testudineus* в потоке воды // Там же. Т. 58. № 5. С. 584–588.
- Ромейс Б. 1953. Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 719 с.
- Cyr D.G., Eales J.G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish // Rev. Fish Biol. Fish. V. 6. P. 165–200.
- Høgåsen H.R., Prunet P. 1997. Plasma levels of thyroxine, prolactin, and cortisol in migrating and resident wild Arctic charr, *Salvelinus alpinus* // Can. J. Fish. Aquat. Sci. V. 54. P. 2947–2954.
- Hulbert A.J. 2000. Thyroid hormones and their effects a new perspective // Biol. Rev. V. 75. P. 519–631.
- Pavlov D.S., Kostin V.V., Zvezdin A.O., Ponomareva V.Yu. 2010. On methods of determination of the rheoreaction type in fish // J. Ichthyol. V. 50. № 11. P. 977–984.
- Sisneros J.A., Forlano P.M., Knapp R., Bassa A.H. 2004. Seasonal variation of steroid hormone levels in an intertidal-nesting fish, the vocal plainfin midshipman // Gen. Comp. Endocrinol. V. 136. P. 101–116.
- Woodhead A.D. 1975. Endocrine physiology of fish migration // Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. V. 13. P. 287–382.