

УДК 57.084

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ГОНАЛ-Ф» НА РЕПРОДУКТИВНУЮ
СИСТЕМУ ЛЯГУШКИ ОЗЕРНОЙ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) И КАРАСЯ
СЕРЕБРЯНОГО (*CARASSIUS GIBELIO*)**

Ткачева Н. Ю., Ислямова Э. Ю., Подопригора В. Н.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: evelina.islyatova@mail.ru*

В статье представлен аналитический экспериментальный метод исследования, направленный на выявление эффективности и изучение безопасности применения фолликулостимулирующих препаратов у земноводных и рыб с целью дальнейшего внедрения их в аквакультурную практику.

Ключевые слова: аквакультура, Гонал-Ф, гормональная стимуляция, половые продукты.

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивность развития рыбной промышленности в современном мире требует ускорения процесса созревания репродуктивной системы рыб и получения большего количества половых продуктов, что становится возможным благодаря инновационным достижениям в области биологии и фармакологии.

Размножение рыб и земноводных – это сложный биологический процесс, каждый этап которого регулируется гипоталамо-гипофизарно-гонадной нейроэндокринной системой. Все звенья данной системы связаны между собой посредством синтеза биологически активных веществ (гормонов, нейротрансмиттеров и нейромодуляторов). Однако данная система не всегда является стабильной и значительно зависит от внешних факторов, особенностей организма, условий обитания и времени года, что является большой проблемой в аквакультуре. Поэтому на сегодня созданы и внедрены в практику препараты, способные воздействовать на гипоталамо-гипофизарно-гонадную систему. Как правило, препараты являются гормональными, так, например, используется «Сурфагон» – синтетический аналог гонадотропин-рилизинг гормона [1] или «Нерестин» – группа комбинированных препаратов, включающая в себя синтетический аналог гонадотропин-рилизинг гормона, блокатор дофаминовых рецепторов, синтетический аналог окситоцина и другие БАВ [2].

Эффект, вызываемый гормональными препаратами, у рыб и земноводных напрямую зависит от введенной дозы. Незначительные отклонения в необходимой дозе препарата могут вызвать дисбаланс в гипоталамо-гипофизарно-гонадной системе с утратой способности к выполнению репродуктивной функции, синтезу

половых продуктов и даже к гибели организма. Поэтому задачей на сегодня является поиск эффективного и безопасного препарата.

В качестве такого гормонального препарата в представленной научно-исследовательской работе предложен «Гонал-Ф» – рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон, который оказывает гонадотропное действие: стимулирует рост и созревание фолликулов (яиц, икринок). Проверялась возможность данного препарата стимулировать созревание половых продуктов у самцов лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*), у самцов и самок карася серебряного (*Carassius gibelio*), его эффективность, безопасность, а также возможные последствия передозировки препаратом. Эффективность гормонального препарата оценивалась согласно принятым стандартам в рыбной промышленности [3, 4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объект исследования № 1 – Лягушка озерная (*Pelophylax ridibundus*), особи мужского пола

Научная классификация

Царство: Животные

Тип: Хордовые

Класс: Земноводные

Отряд: Бесхвостые

Семейство: Настоящие лягушки

Род: Зеленые лягушки

Вид: Озерная лягушка

2. Объект исследования №2 – Карась серебряный (*Carassius gibelio*), особи мужского и женского пола

Научная классификация

Царство: Животные

Тип: Хордовые

Класс: Лучеперые рыбы

Отряд: Карпообразные

Семейство: Карповые

Род: Караси

Вид: Серебряный карась

3. Препарат для гормональной стимуляции – «Гонал-Ф»
Фармакотерапевтическая группа препарата – фолликулостимулирующее средство

Рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон. Препарат получают методом генной инженерии на культуре клеток яичников китайского хомячка.

За период проведения научного эксперимента инъецировано препаратом «Гонал-Ф» 5 самцов лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*) и 22 особи (6 самцов и 16 самок) карася серебряного (*Carassius gibelio*).

Первая часть исследования проводилась на представителях лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*) в наиболее физиологичное для выполнения репродуктивной функции время года – в июне (2015 год).

Пол особи установлен на основании наличия вторичных половых признаков: внутренний палец передних ног имел у основания по большому бугру, наличие голосовых мешков (резонаторов) и приведенных ниже результатах препарирования.

Условия для проведения эксперимента – аквариум с постоянно поддерживающейся температурой на уровне 18–22 градусов Цельсия с достаточным количеством питательных веществ.

Ход проведения научно-исследовательского эксперимента: после помещения особей лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*) в аквариум выжидался период, необходимый для адаптации, после которого, на 3–4 сутки, производилась инъекция препарата «Гонал-Ф» под кожу в области бедренной мышцы. Доза препарата вводилась постепенно, начиная с минимальной, из расчета на вес особей. Наличие эффекта от введенного препарата оценивали до момента инъекции и спустя час после инъекции. Наличие эффекта первоначально оценивалось микроскопическим методом – выявление подвижных сперматозоидов в клоакальной жидкости лягушек. В случае если препарат не оказывал никакого эффекта, через два часа вводилась повторная доза, после чего результат фиксировался на следующие сутки. Вторую инъекцию «Гонал-Ф» вводили минимальной дозой.

Вторая часть научного исследования проводилась на представителях карася серебряного (*Carassius gibelio*) в наиболее физиологичное для выполнения репродуктивной функции время года – летом (2015 год) и весной (2016 год).

Условия для проведения эксперимента – особи, независимо от пола, были помещены в два аквариума с постоянно поддерживающейся на уровне 18–22 градусов Цельсия температурой. Питательные вещества составляли 3 % от массы особи. После периода адаптации представители карася серебряного (*Carassius gibelio*) инъецировались препаратом «Гонал-Ф». Для определения начальной дозы использовали результаты, полученные в ходе первой части эксперимента на особях лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*). Вводилась минимальная доза, на которую положительно отреагировали представители лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*), из расчета на массу тела карася серебряного (*Carassius gibelio*). Для взвешивания особей использовали технические весы. На 1 грамм веса карася серебряного (*Carassius gibelio*) приходится 2.5 МЕ (0.0042 мл) препарата «Гонал-Ф». Зрелость половых продуктов определяли по наличию текучей икры у самок, у самцов – увеличенных молок. В случае отсутствия указанных признаков проводили микроскопическое исследование на предмет подвижных сперматозоидов у самцов или наличия крупных икринок у самок.

В ходе исследования проведено препарирование инъецированных и неинъецированных особей с целью оценки наличия эффекта на введение препарата «Гонал-Ф».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой части эксперимента первоначально оценивалась безопасность введения данного препарата. Вводились большие дозы «Гонал-Ф» (0.1 мл/г), которые не приводили к ухудшению состояния особей как сразу после введения, так и в течение периода выведения препарата (начальный $T_{1/2}$ из организма составляет приблизительно 2 ч., конечный $T_{1/2}$ составляет примерно 24 ч.).

Далее оценивалась эффективность введения препарата «Гонал-Ф». Из 5 инъецированных особей лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*) у 2 особей спустя 2 часа 30 минут отмечено наличие эффекта: микроскопически – выявление множества активно-подвижных сперматозоидов в клоакальной жидкости лягушек. У оставшихся особей (троих) не было выявлено признаков созревания. Причиной такого результата послужила малая доза препарата, которая не привела к созреванию гонад.

Таким образом, к ходе первой части эксперимента была отмечена безопасность препарата «Гонал-Ф», наличие эффекта от инъекции и минимальная доза для стимуляции.

Таблица 1

Результат воздействия препарата «Гонал-Ф» на самцов озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*)

Доза 1, МЕ	Δt_1 , ч	Результат	Доза 2, МЕ	Δt_2 , ч	Результат
12,5	2,5	-	12,5	20	-
25		-	12,5		-
37,5		-	12,5		-
50		+	12,5		+
62,5		+	12,5		+

Δt – разница между временем инъекции и фиксированием результата.

Вторая часть эксперимента, проведенная на особях карася серебряного (*Carassius gibelio*), оценивала зависимость эффекта от дозы инъецируемого препарата. Оценка эффективности проводилась на основании классификации зрелости гонад рыб [4].

Вторая часть эксперимента состояла из четырех этапов исследования. В ходе первого использовалась минимальная доза препарата, которая вызвала эффект у особей лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*). Положительный эффект отметили через сутки у всех особей карася серебряного (*Carassius gibelio*) (табл. 2). Для сравнительной оценки зрелости гонад проведено препарирование инъецированной и неинъецированной особи карася серебряного (*Carassius gibelio*) (рис. 1, рис. 2)

Таблица 2
Результат воздействия препарата «Гонал-Ф» на особей карася серебряного (*Carassius gibelio*) 12–14

Вес, г.	Доза, мл	Результат	Δt , ч.
20	0,084	+	24
14	0,058	+	24
10	0,042	+	1

Δt – разница между временем инъекции и фиксированием результата.



Рис. 1. Препарированный неинъекцированный самец карася серебряного (*Carassius gibelio*).



Рис. 2. Препарированный инъекцированный самец карася серебряного (*Carassius gibelio*).

Во время следующего этапа второй части исследования проводилось корректирование и подбор дозы «Гонал-Ф» для получения стойкого эффекта от стимуляции препаратом. Использовались четыре представителя карася серебряного (*Carassius gibelio*). В результате один самец (наличие текучих молок) и одна самка (наличие созревшей икры) проявили положительный эффект в ответ на инъекцию препарата. У двух самок карася серебряного (*Carassius gibelio*) не выявлено

видимых признаков зрелости гонад (табл. 3). Однако у одной из самок без видимых признаков созревания гонад во время препарирования обнаружено, что «Гонал-Ф» стимулировал созревание гонад (гонады находились в IV стадии развития).

Таблица 3
Результат воздействия препарата «Гонал-Ф» на особей карася серебряного (*Carassius gibelio*) 20–23

Пол	Вес, г.	Доза, мл	Результат	Δt , ч.
самка	16	0,067	+	2
самец	16	0,067	+	24
самка	16	0,067	-	48
самка	25	0,105	-	48

Δt – разница между временем инъекции и фиксированием результата.



Рис. 3. Препарированные самки карася серебряного (*Carassius gibelio*): сверху – неинъекционная, снизу – инъекционная.

В ходе четвертого этапа исследования оценивалась эффективность воздействия препарата «Гонал-Ф» оценивался временной интервал, необходимый для созревания гонад в ответ на стимуляцию. Исследование проводилось на двух самцах и семи самках карася серебряного (*Carassius gibelio*). Оба самца отреагировали положительно, но с разным интервалом времени. У одного из самцов видимые признаки созревания гонад были выявлены спустя сутки после инъекции.

Второй самец проявил наличие эффекта стимуляции на вторые сутки после инъекции «Гонал-Ф». Три самки также проявили наличие положительного эффекта: у двоих отмечалось наличие икры на вторые сутки от введения препарата, у одной – на третьи. Четыре самки не показали наличия эффекта созревания репродуктивной системы даже спустя 72 часа после инъекции (табл. 5).

Таблица 4
Результат воздействия препарата «Гонал-Ф» на особей карася серебряного
(*Carassius gibelio*) 16–18

Пол	Вес, г.	Доза, мл	Δt, ч.	Результат
самка	25	0,105	24	+
самка	20	0,084	24	+
самка	16	0,067	24	+
самка	16	0,067	24	-
самец	16	0,67	24	-
самка	13	0,055	24	-

Δt – разница между временем инъекции и фиксированием результата.

В следующих опытах, где тестировали препарат на двух самцах и семи самках, оба самца отреагировали положительно, но с разным интервалом. Первый показал признаки созревания уже через сутки после инъекции Гонал-Ф, другой – на следующий день. Три самки также ответили положительно. От них была получена икра. Две особи созрели на вторые сутки после инъекции Гонал-Ф, третья – на третий день. Другие самки не показали видимых признаков созревания даже после 72 часов введения препарата (табл. 5).



Рис. 4. Препарированная неинъекцированная самка карася серебряного (*Carassius gibelio*).



Рис. 5. Препарированная инъекцированная самка карася серебряного (*Carassius gibelio*).

Таблица 5

Результат воздействия препарата «Гонал-Ф» на особей карася серебряного (*Carassius gibelio*) 02-06

Пол	Вес, г	Доза, мл	Δt , ч	Результат
самка	33	0,139	48	+
самка	29	0,122	48	+
самец	23	0,097	24	+
самец	19	0,080	48	+
самка	13	0,055	72	-
самка	12	0,050	72	-
самка	12	0,050	72	-

Δt – разница между временем инъекции и фиксированием результата.

В результате проведенной второй части научно-исследовательского эксперимента установлено, что на гормональную стимуляцию препаратом «Гонал-Ф» ответили наличием положительного эффекта 12 особей карася серебряного (*Carassius gibelio*) и 10 особей не отреагировали на инъекцию, что в процентном соотношении составило 55 % и 45 % соответственно (рис. 6).

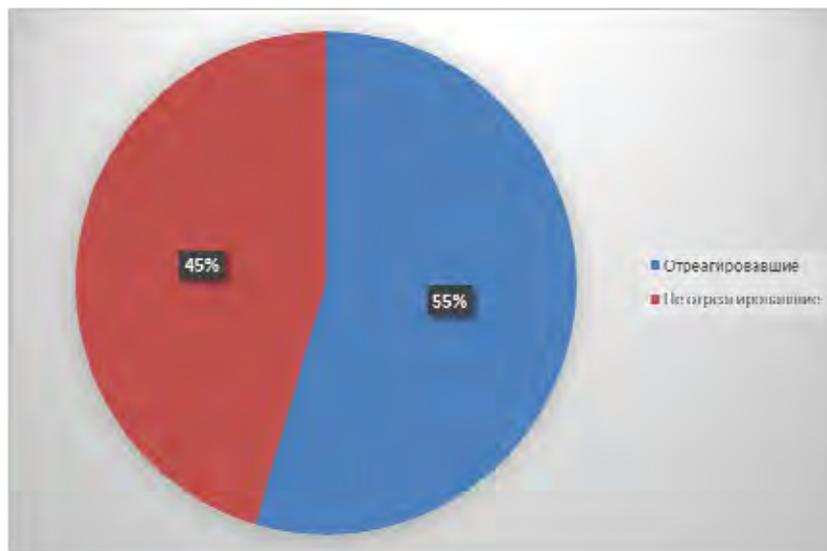


Рис. 6. Эффективность инъекции препаратом «Гонал-Ф» у особей карся серебряного (*Carassius gibelio*).

Также необходимо отметить, что наличие эффекта от стимуляции различалось среди популяции самок и самцов, так, у самок положительно отреагировали 7 особей, что составило 44 % (рис. 7), у самцов – 5 особей, что составило 83 % (рис. 8).

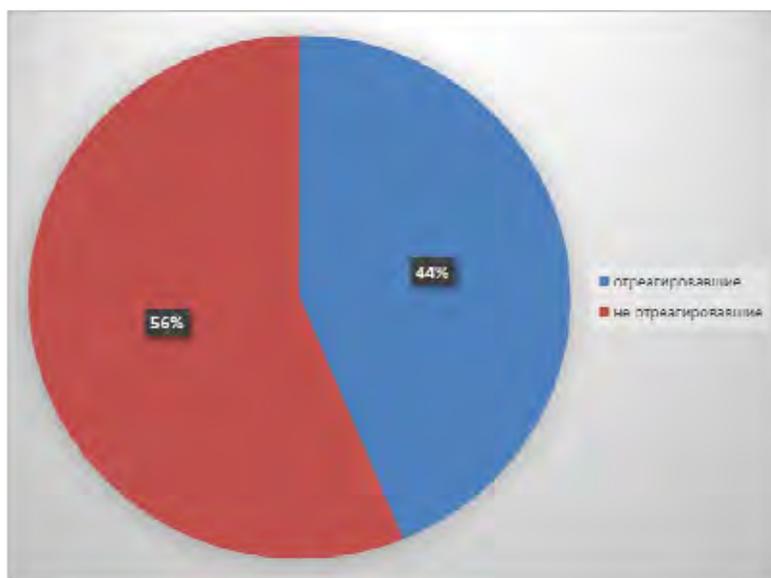


Рис. 7. Эффективность инъекции препаратом «Гонал-Ф» у самок карся серебряного (*Carassius gibelio*).

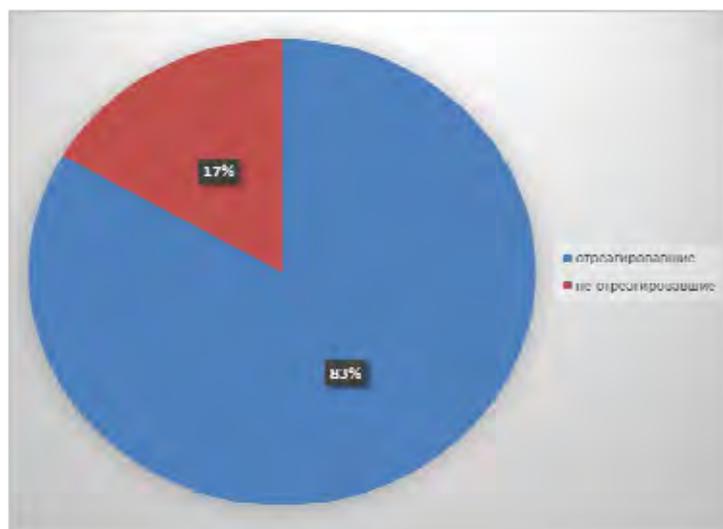


Рис. 8. Эффективность инъекции препаратом «Гонал-Ф» у самцов карася серебряного (*Carassius gibelio*).

Полученные данные были сведены в сравнительную таблицу с оценкой достоверности полученных результатов путем расчета t-критерия Стьюдента (табл. 6). Полученный t-критерий Стьюдента не превосходит критическое значение, и нулевая гипотеза не опровергается, что говорит о статистической значимости результатов исследования (P менее 0.05).

Таблица 6

Результаты воздействия препарата «Гонал-Ф» на особей карася серебряного (*Carassius gibelio*) среди популяции самок и самцов с оценкой достоверности по t-критерию Стьюдента

Пол карасей	Отреагировали	Не отреагировали	Всего
Самцы	5	1	6
Самки	7	9	16
Всего	12	10	22

Таким образом, препарат «Гонал-Ф» оказывает прямой дозозависимый эффект на репродуктивную систему рыб. Этот факт был выяснен в ходе эксперимента. Установлено, что большая половина инъекцированных особей карася серебряного (*Carassius gibelio*) отреагировала наличием положительных признаков созревания гонад (55 %).

Перспективно планируется продолжить текущий научно-исследовательский эксперимент для установления минимально эффективной дозы инъекции; выяснить причины отсутствия признаков созревания гонад у инъекцированных особей; определить условия повышения количества ответивших особей в ответ на

стимуляцию препаратом; исследовать воздействие «Гонал-Ф» на репродуктивную систему других представителей рыб, а также внедрить данный препарат в аквакультуру как безопасный и эффективный в применении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. «Гонал-Ф» является безопасным для гормональной стимуляции у особей лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*) и карася серебряного (*Carassius gibelio*). Установлено, что превышение дозы не приводило к появлению текущих и отдаленных побочных последствий, в т. ч. гибели особей.
2. «Гонал-Ф» оказывает эффект на репродуктивную систему земноводных. Отмечена реакция сперматогенеза в ответ на введение препарата самцам лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus*).
3. «Гонал-Ф» оказывает эффект на репродуктивную систему рыб: 55 % особей карася серебряного (*Carassius gibelio*) ответили положительным эффектом в виде созревания гонад в ответ на введение препарата.
4. «Гонал-Ф» стимулирует созревание гонад у самцов и самок с одинаковой эффективностью для 1 %-го уровня значимости ($t_f < t_{st} - 1.63 < 2.85$ соответственно).

Список литературы

1. Подушка С. Б. Раунатин усиливает действие сурфагона на производителей стерляди / С. Б. Подушка // Осетровое хозяйство. – 2010. – № 4. – С. 16–25.
2. Основные результаты испытаний препаратов серии «Нерестин» при искусственном воспроизводстве рыб в 2006 году / В. А. Коваленко, Д. П. Лисник, И. В. Никишкин [и др.] // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2006. – № 12. – С. 15–30.
3. Подушка С. Б. Тестирование передней и задней долей гипофизов сазана и осетровых на самцах озерной лягушки / С. Б. Подушка, С. Н. Куриличев // Сборник научных трудов ГосНИОРХ. – 1987. – № 262. – С. 63–65.
4. Корниенко Г. Г. Гистологические методы мониторинга гаметогенеза и репродуктивного качества рыб / Г. Г. Корниенко, Л. А. Бугаев // Методы рыбохозяйственных и природоохранных исследований в Азово-Черноморском бассейне, Краснодар. – 2005. – С. 266–291.

INFLUENCE OF "GONAL-F" PREPARATION ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF THE FROZEN OZENYOY (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) AND CARASHI SILVER (*CARASSIUS GIBELIO*)

Tkacheva N. U., Islyamova E. U., Podoprighora V. N.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation
E-mail: evelina.islyamova@mail.ru*

The intensity of development of fishing industry in the modern world demands acceleration of process of maturing of reproductive system of fishes and obtaining larger

quantity of sexual products what to become possible thanks to innovative achievements in the field of biology and pharmacology.

Manifesting of fishes and amphibiouses is regulated gipotalamo - hypophysial and gonadal neuroendocrinal system. As a rule, medicines which influence gipotalamo-hypophysial-gonadal system are hormonal. The effect caused by hormonal medicines at fishes and Amphibia directly depends on an injected dose. Slight deviations in a necessary dose of medicine can cause an imbalance in gipotalamo-hypophysial-gonadal system with loss of ability to realization of reproductive function, to synthesis of sexual products and even to death of an organism. Therefore a task is searching of efficient and safe medicine today. As such hormonal medicine in the presented research Gonal-F – recombinant follicle-stimulating hormone is offered.

In fish breeding estimate effectiveness of hormones by their opportunity to cause a spermatation in males of a lake frog of *Pelophylax ridibundus* [3]. In the real work the possibility of this medicine to stimulate maturing of sexual products at males of a frog of lake (*Pelophylax ridibundus*), at males and females of a crucian of silver (*Carassius gibelio*), its effectiveness, safety and also possible consequences of overdose with medicine was checked.

It was found out that Gonal-F renders effect on the reproductive system of amphibiouses. Reaction of a spermatogenesis in response to medicine introduction to males of a frog of lake (*Pelophylax ridibundus*) is noted. Reacted with existence of positive signs of maturing of gonads individuals of a crucian of silver (*Carassius gibelio*). 55 % of the injected crucians positively responded to effect of medicine. It was noted that Gonal-F stimulates maturing of gonads at males and females with identical effectiveness. At the same time medicine has the weak physiological effect. It is established that excess of a dose did not lead to emergence of the current and remote secondary consequences, including death of individuals.

Keywords: aquaculture, Gonal-F, hormonal stimulation, sex products.

References

1. Podushka S. B. Raunatin strengthens action of a surfagon on producers of a sterlet, *Sturgeon economy*, **4**, 16 (2010).
2. Kovalenko V. A., Lisnik D. P., Nikishkin I. V. [etc.], The main test data of medicines of the Nerestin series at simulated reproduction of fishes in 2006, *Fish breeding and fishery*, **12**, 15 (2006).
3. Podushka S. B., Kurilichev S. N. Testing by a forward and back share of hypophyses of a sazan and sturgeon on males of a lake frog, *the Collection of scientific works of GOSNIORH.*, **262**, 63 (1987).
4. Korniyenko G. G., Bugaev L. A. Histologic methods of monitoring of a gametogenesis and reproductive quality of fishes, *Methods of fishery and nature protection researches in the Azovo-Chernomorsky pool*, 266 (Krasnodar, 2005).