



УДК: 597.553.2:597-114.7

Аквакультура

О влиянии обработок 17α -метилтестостероном на характеристики крови, структуру внутренних органов и реверсию пола радужной форели

Н.Ю. Терпугова, И.В. Бурлаченко, О.П. Филиппова, С.Е. Зуевский, В.В. Попов

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»), Окружной проезд, 19, Москва, 105187
E-mail: terpugova@vniro.ru

SPIN-код: Н.Ю. Терпугова – 5485-9250; И.В. Бурлаченко – 7492-7365; О.П. Филиппова – 9906-0202; С.Е. Зуевский – 1544-6014; В.В. Попов – 2270-1638

Цель: оценка влияния обработок 17α -метилтестостероном на рост, морфологические и биохимические показатели крови, состояние внутренних органов и реверсию пола у молоди радужной форели.

Методы: эксперименты выполнены на личинках и молоди форели, получавших 17α -метилтестостерон с кормом в течение 3, 4 и 8 недель после перехода на экзогенное питание. О влиянии препарата судили по гематологическим и биохимическим показателям крови, а также гистологической картине внутренних органов.

Новизна: проведена комплексная оценка последствий гормональной реверсии пола у радужной форели через 15 месяцев после применения 17α -метилтестостерона. Показано влияние продолжительности гормональных обработок на гематологические и биохимические параметры крови, а также отсутствие воздействия препарата на состояние внутренних органов, за исключением воспроизводительной системы.

Результат: установлено, что введение препарата в корм форели в течение 4 недель позволяет получить до 90% самцов. Увеличение срока обработки до 8 недель приводит к формированию до 90% стерильных особей. Последствие применения препарата выразилось в нелинейном незначительном снижении уровня гемоглобина, гематокрита и количества эритроцитов, повышении относительного содержания лейкоцитов и тромбоцитов. Отмечено достоверное снижение содержания альбумина, общего белка и креатинина, незначительное снижение АСТ, уровня азота мочевины и триглицеридов. Однако все изменения находились в диапазоне референсных значений. Гистологическое исследование внутренних органов молоди форели в возрасте 5 и 15 месяцев показало нормальные возрастные изменения без выраженного влияния препарата на структуру печени, кишечника, сердца и селезенки.

Практическая значимость: показано отсутствие негативного воздействия 17α -метилтестостерона, применяемого на ранних стадиях развития радужной форели, на функциональное состояние органов молоди, а также эффективность использования препарата в течение 4 недель, обеспечивающего получение до 90% самцов.

Ключевые слова: радужная форель *Oncorhynchus mykiss*, 17α -метилтестостерон, гематологические показатели, биохимия крови рыб, состояние внутренних органов, реверсия пола.

Effects of 17α -methyltestosterone on blood parameters, visceral morphology, and sex reversal in rainbow trout

Nadezhda Y. Terpugova, Irina V. Burlachenko, Olga P. Filippova, Sergey E. Zuevskiy, Vladislav V. Popov

Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography («VNIRO»), 19, Okružhnoy proezd, Moscow, 105187, Russia

Aim: To evaluate the effects of 17α -methyltestosterone treatments on growth performance, morphological and biochemical blood parameters, condition of internal organs, and sex reversal in juvenile rainbow trout.

Methods: Experiments were conducted on larvae and juveniles that received feed supplemented with 17α -methyltestosterone for 3, 4, and 8 weeks after the onset of exogenous feeding. The influence of the hormone was assessed based on hematological and biochemical blood indicators, as well as histological examinations of internal organs.

Novelty: A comprehensive assessment of the long-term consequences of hormonal sex reversal in rainbow trout was performed 15 months after 17α -methyltestosterone application. The study revealed that treatment duration significantly affected hematological and biochemical blood parameters, while no adverse effect on internal organs was detected, except for the reproductive system.

Results: The inclusion of the hormone in feed for 4 weeks resulted in up to 90% males. Extending the treatment to 8 weeks led to the formation of up to 90% sterile individuals. Long-term effects were manifested as a minor nonlinear decrease in hemoglobin, hematocrit, and erythrocyte counts, accompanied by an increase in leukocyte and platelet proportions. Significant reductions in albumin, total protein, and creatinine concentrations were recorded, along with slight decreases in AST activity, blood urea nitrogen, and triglycerides. However, all variations remained within reference ranges. Histological examination of the liver, intestine, heart, and spleen of trout aged 5 and 15 months demonstrated normal ontogenetic changes without pronounced structural alterations attributable to the treatment.

Practical significance: The study confirmed that early-life administration of 17α -methyltestosterone does not negatively affect the functional state of juvenile organs and is an effective approach for producing up to 90% males when applied for a 4-week feeding period.

Keywords: rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, 17α -methyltestosterone, hematological parameters, fish blood biochemistry, internal organ morphology, sex reversal.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из современных методов повышения продуктивности в форелеводстве является реверсия пола, направленная на получение однополого женского потомства для производства товарной рыбы и пищевой икры [Hoga et al., 2018]. Реверсия пола осуществляется путём воздействия гормона на самок, которые затем развиваются как фенотипические самцы. В дальнейшем особи используются для скрещивания с нормальными самками, что в итоге приводит к получению однополого женского потомства [Devlin, Nagahama, 2002].

Исследования влияния гормонов на гонады рыб начались в конце 1930-х годов и заложили основу современных методов управления полом [Yamamoto, 1953; Pandian, Sheela, 1995]. Некоторые стероиды, такие как этистерон (ЕТ), 11 β -гидроксиандростендион (HD) и 17 α -метилтестостерон, относятся к числу наиболее широко применяемых в коммерческой аквакультуре для реверсии пола рыб [Kuzminski, Dobosz, 2010]. В исследованиях на радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) показано, что низкие дозы 17 α -метилтестостерона, применяемые в течение 60 дней после начала кормления, обеспечили почти 100%-ное получение самцов, тогда как более высокие дозы, применяемые в течение 120 дней, приводят к значительному увеличению числа стерильных особей [Solar et al., 1984]. При гормональном воздействии некоторые фенотипические самцы имеют гонады необычной округлой формы, без выводных протоков – это генотипические самки, в потомстве которых отсутствуют самцы. Хотя качество спермы у самцов с генотипом XX, как было показано для радужной форели, хуже, чем у самцов с генотипом XY [Geffen, Evans, 2000], их использование в аквакультуре для получения однополого потомства оказалось экономически оправданным.

Гормональная реверсия пола демонстрирует сложность взаимодействий между гормональным вмешательством и физиологическими процессами половой дифференциации. Обработка рыб гидроксиандростендионом и 17 α -метилтестостероном стимулировала развитие гонад и повышение ряда количественных характеристик эритроцитарных и биохимических параметров у самцов реверсантов, что коррелирует с усилением метаболизма при соматическом росте. Показатели крови тесно связаны с уровнем метаболизма, причём в период роста у крупных рыб регистрируются более высокая скорость метаболизма, чем у мелких [Inapan, Asar, 2020].

По экспертным оценкам в современном форелеводстве доля феминизированных особей, полученных

с использованием метода реверсии пола, составляет не менее 80%. Однако исследования воздействия андрогенов на физиолого-биохимические и морфологические характеристики молоди форели остаются ограниченными. В доступных литературных источниках обнаружены лишь сведения о том, что применение 17 α -метилтестостерона в небольших концентрациях в течение 30 дней не оказало негативного влияния на печень и сердце тилапии [Katongo, 2013]. Поскольку сперма самцов реверсантов используется для получения феминизированных самок, что может повлиять на их физиологическую полноценность, представлялось важным выявить и оценить изменения, происходящие в организме молоди форели под воздействием андрогенов или отсроченный эффект подобного воздействия. Кроме того, данные исследования представляли также интерес в аспекте возможного расширения регуляторного поля ветеринарного применения 17 α -метилтестостерона, как препарата, отнесённого к сильнодействующим веществам [Об утверждении..., 2007¹], для получения однополого посадочного материала лососевых рыб. В этой связи цель данного исследования состояла в оценке влияния обработок 17 α -метилтестостероном различной продолжительности на рост, морфологические и биохимические показатели крови, состояние внутренних органов молоди и реверсию пола радужной форели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментальных работ использовали личинок, полученных из икры производственной линии феминизированных самок. Особый интерес представляла оценка потенциала использования генетических ресурсов импортных однополых линий в отечественной селекции форели. При проведении опыта личинок после перехода на внешнее питание кормили стартовым кормом с добавлением 17 α -метилтестостерона в концентрации 2 мг/кг корма. Необходимое количество препарата растворяли в 96%-ном этаноле и вносили в корм методом распыления. Использовали стартовый корм для форели рецептуры ФГБНУ «ВНИРО», имевший следующие характеристики питательной ценности – 61% белка, 11% жира, 11% углеводов, энергия – 19,2 МДж/кг. Проводили наблюдения за 4-мя группами личинок и молоди форели. Группы различались по продолжительности применения гормонального препарата – 3, 4 и 8 недель, контрольная группа рыб получала корм без гормональной добавки. Выбор вариантов опыта был основан на данных различных авторов, описавших сходный эффект получения самцов реверсантов при обработке форели от 4-х [Razmi et al., 2011] до 8 недель [Метальникова, 2015].

Исходное количество личинок в каждой группе составляло 500 экз. Полученную молодь выращивали в УЗВ, в круглых бассейнах объёмом – 0,5 м³, с водообменом – 25 л/мин. Освещённость в помещении составляла до 400 люкс. Общая сумма тепла за год выращивания составила 4589 градусо-дней, а в возрасте 15 месяцев – 5369 градусо-дней. Общая продолжительность наблюдений составила 485 суток. В целях создания благоприятных условий для созревания экспериментальных рыб с пятого по восьмой месяц выращивания температура воды в бассейнах была плавно снижена с 15 до 7 °С, с целью создания «искусственной зимовки» в течение 50 суток при 7 °С. Имитация сезонности замедлила рост и развитие воспроизводительной системы форели.

Гидрохимические параметры воды в бассейнах в ходе эксперимента, в основном, соответствовали технологическим нормам [Барулин и др., 2016]. Средняя температура воды в бассейнах составила 13,5 °С (12,6-14,5 °С), концентрация растворенного в воде кислорода 11,09 мг/л (7,8-15,0), рН 7,48 (7,4-7,6). Содержание нитритов 0,08 мг/л (0,03-0,21), аммонийного азота 0,42 мг N/л (0,17-0,54), фосфатов 0,27 мг/л (0,03-0,55).

Оценку особенностей воздействия на рыб продолжительности обработок 17 α -метилтестостероном проводили на основе изучения динамики их роста. Общем влиянии на физиологические процессы судили по результатам анализа крови и её биохимического состава. Для характеристики функциональных изменений, вызываемых воздействием гормональных обработок, использовали анализ состояния внутренних органов, оцениваемого на основе применения гистологических методов. Определение массы рыб проводили каждые 30 суток. Отбор проб для гистологического исследования осуществляли в возрасте 5 и 15 месяцев. Гематологические и биохимические пробы отбирали в возрасте 15 месяцев.

Гематологический анализ проводили в соответствии с Методическими указаниями ... [1999]. Кровь отбирали из хвостовой вены у 10 экз. из каждой группы. Физиологическое состояние радужной форели оценивали по следующим показателям: концентрация гемоглобина – гемиглобинцианидный метод с использованием прибора МиниГЕМ+; гематокрит – центрифугирования крови в микрокапиллярах с последующим измерением соотношения объёма эритроцитов к общему объёму крови; количество эритроцитов – подсчёт в камере Горяева; количество незрелых форм эритроцитов и лейкоцитарная формула – на мазках крови, окрашенных по Паппенгейму (Романовскому – Гимза). При идентификации клеток крови рыб руководствовались

атласами клеток крови рыб [Иванова, 1983]. Лейкоциты и тромбоциты подсчитывали в мазках крови методом относительного подсчёта на 1000 эритроцитов с последующим выражением результатов в процентах.

Микроскопические исследования проводили с использованием микроскопа «Olympus BX45», фотофиксацию осуществляли с помощью цифровой видеокамеры «Olympus DP25» и программы DC Viewer. Морфологические показатели красной крови рассчитывали согласно методу [Кухарева, 2019] – измеряли диаметр большого и малого эритроцита и их ядра по 100 клеток у каждой особи. Затем определяли объём эритроцита и ядра, высоту эритроцита, а также величину ядерно-плазматического отношения.

Для биохимического анализа кровь отбирали в вакуумные пробирки с активатором свёртываемости. Пробу центрифугировали 5 минут при 3000 об./мин., после чего отбирали сыворотку в объёме не менее 1,0 мл от каждой рыбы. Биохимические показатели – общий белок, альбумин, аспартаминотрансфераза (АСТ), креатинин, мочевины, триглицериды и холестерин определяли с использованием биохимического автоматического анализатора BioChem FC-200 (США) и готовых реактивов (наборов) от High Technology, Inc. (США).

При проведении гистологических исследований руководствовались стандартными методиками [Микодина и др., 2009]. При описании препаратов использовали атлас гистологии рыб [Гентен и др., 2016]. Готовые срезы окрашивали квасцовым гематоксилином по Эрлиху с доокраской эозином. Для фотографирования микропрепаратов использовали компьютерную установку с программой DC Viewer и микроскоп Olympus с автоматической видеокамерой Leica DC-100.

Статистическая обработка материала выполнена с использованием MS Excel 2010. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения массы рыб из подопытных групп представлены на рис. 1. Отмечено, что средняя масса рыб увеличивалась во всех группах, однако в вариантах опыта были отмечены различия в динамике роста. В группах, получавшей гормон в течение трёх и четырёх недель, средняя масса была ниже по сравнению с контрольной группой и группой восьми недель. Эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода наблюдения. Изменение массы форели можно описать уравнением $M_i = a \cdot X^b$ (при достоверности величины аппроксимации $R^2 = 0,91-0,95$), где M_i – средняя масса форели в соответствующей группе в граммах; X – возраст форели в сутках; a – константа; b – показатель степени в соответствующей группе рыб.

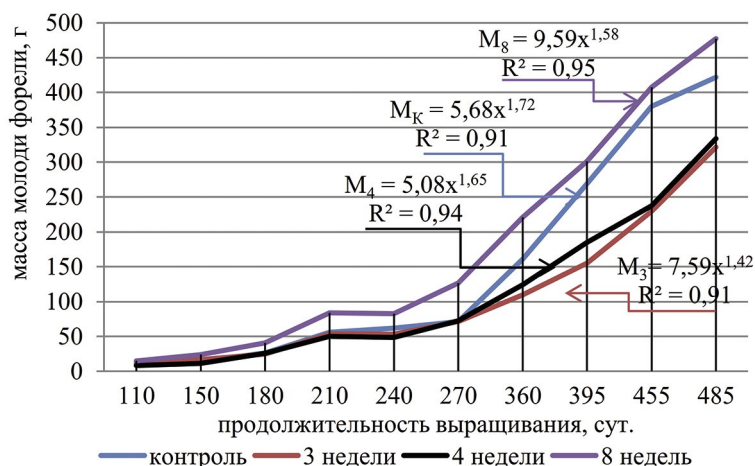


Рис. 1. Изменение массы тела экспериментальных групп форели, с различными сроками применения 17 α -метилтестостероном

Fig. 1. Changes in body weight of experimental trout groups with different periods of 17 α -methyltestosterone feeding

Таким образом, более длительное воздействие 17 α -метилтестостерона (8 недель) способствовало увеличению средней массы рыб по сравнению с трёх- и четырёхнедельной экспозицией гормона. Это указывает на потенциально положительное влияние времени гормонального воздействия на рост радужной форели и что согласуется с литературными данными, где было выдвинуто предположение, что продолжительное применение 17 α -метилтестостерона, добавленного в корм, может ускорять рост [Yamazaki, 1983]. Выживаемость на всех этапах выращивания не отличалась между опытными и контрольной группами и составила 95% в период от 3-х до 8-ми месяцев, что свидетельствует о сохранении стабильного состояния рыб при различных режимах гормонального воздействия.

Результаты гематологических исследований контрольной и экспериментальных групп молоди радужной форели представлены в табл. 1.

В контрольной группе показатели крови соответствовали аналогичным значениям у рыб, получавших корм с 17 α -метилтестостероном в течение 3-х недель. Однако у рыб, получавших гормоны в течение 4 и 8 недель, наблюдали некоторое снижение уровня гемоглобина, гематокрита и количества эритроцитов. Снижение гемоглобина сопровождалось достоверным снижением числа эритроцитов по сравнению с контрольной группой. Количество молодых форм эритроцитов, указывающих на активность эритропоэза, было выше у групп, получавших 17 α -метилтестостерон в течение 8 недель. В лейкоцитарной формуле преоблада-

Таблица 1. Характеристика крови молоди радужной форели в возрасте 15 месяцев в различных вариантах продолжительности применения 17 α -метилтестостерона

Table 1. Blood parameters in 15-month-old juvenile rainbow trout subjected to 17 α -methyltestosterone treatments of varying duration

Показатели	Группа рыб				Референсные значения**
	Контроль	3 недели	4 недели	8 недель	
Гемоглобин, г/л	104,4 \pm 5,1	104,2 \pm 9,6	95,2 \pm 6,1	95,1 \pm 9,7	83-122
Эритроциты, млн/мкл	0,80 \pm 0,03	0,78 \pm 0,04	0,63 \pm 0,04*	0,65 \pm 0,03*	0,87-1,34
Гематокрит, %	47,1 \pm 3,7	42,2 \pm 3,5	40,6 \pm 1,5	40,2 \pm 3,1	36-55,4
Незрелые эритроциты, %	7,7 \pm 0,1	5,9 \pm 0,8	6,9 \pm 0,6	9,2 \pm 0,9	\leq 20,0
Лимфоциты, %	89,4 \pm 1,4	88,4 \pm 2,0	89,5 \pm 1,5	87,4 \pm 2,7	\geq 77,0
Нейтрофилы, %	7,8 \pm 0,6	9,6 \pm 1,5	8,0 \pm 1,4	10,8 \pm 2,2	\leq 14,4
Моноциты, %	3,5 \pm 0,9	2,0 \pm 0,2	2,5 \pm 0,4	1,8 \pm 0,5	\leq 4,9
Кол-во лейкоцитов, %	8,5 \pm 0,9	10,7 \pm 1,4	9,6 \pm 0,9	13,0 \pm 2,2	-
Кол-во тромбоцитов, %	2,6 \pm 0,7	2,9 \pm 0,6	5,1 \pm 1,3	4,3 \pm 1,2	-

Примечание: * – различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$; ** – Серпунин, 2010; Keen et al., 1989; Nabi et al., 2022; Řehulka et al., 2004.

дали лимфоциты, и значения этих показателей были схожи между экспериментальными группами. Тем не менее, у группы, получавшей 17 α -метилтестостерон в течение 8 недель, наблюдалось незначительное снижение доли лимфоцитов и увеличение доли нейтрофилов. Относительное содержание лейкоцитов в крови экспериментальных групп была выше, чем в контрольной группе, при максимуме у рыб, получавших препарат в течение 8 недель. Кроме того, было зафиксировано увеличение содержания тромбоцитов в 1,9 раза у рыб, получавших 17 α -метилтестостерон в течение 4 и 8 недель. Это наблюдение может указывать на активацию тромбоцитарного звена гемостаза в ответ на применение гормонального препарата, однако требует дополнительного изучения для установления механизмов обнаруженных изменений. В то же время, отмеченные различия показателей между вариантами опыта не выходят за пределы референсных значений,

приводимых в различных источниках [Řehulka et al., 2004; Серпунин, 2010; Nabi et al., 2022].

Патологических изменений в составе красных и белых клеток крови не было выявлено ни в одной из групп (рис. 2). Эритроциты имели типичную овальную форму с центрально расположенным ядром, однородные размеры и равномерное окрашивание цитоплазмы. Лейкоциты характеризовались нормальной морфологией и структурной целостностью, признаки дегенеративных изменений отсутствовали.

С целью более детального анализа возможных физиологических изменений у рыб были проведены исследования морфометрических показателей красной крови. Данная характеристика позволяет оценить адаптационные изменения в системе крови, охарактеризовать функциональное состояние эритропоэза и выявить возможные цитоморфологические нару-

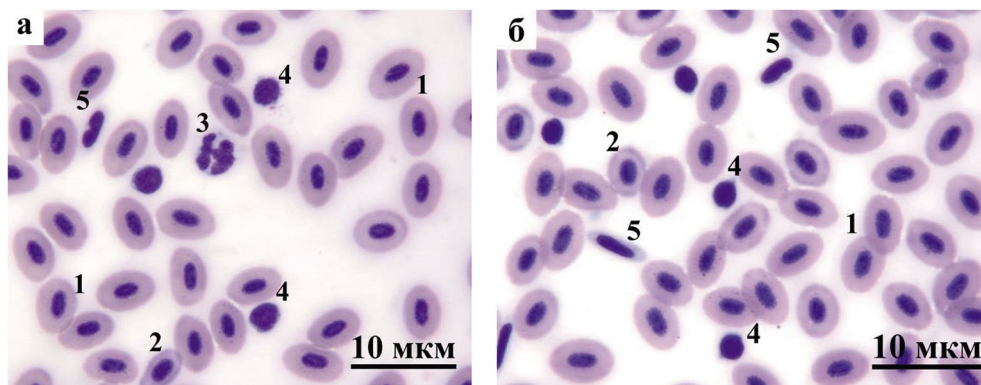


Рис. 2. Картина крови радужной форели, контроль (а) и опытная группа (б): зрелые (1) и молодые (2) эритроциты; нейтрофил (3); лимфоциты (4); тромбоциты (5)

Fig. 2. Blood smear of rainbow trout, control (a) and experimental group (b): mature (1) and immature (2) erythrocytes; neutrophil (3); lymphocytes (4); thrombocytes (5)

Таблица 2. Морфометрические характеристики зрелых эритроцитов радужной форели в возрасте 15 месяцев, в различных вариантах применения 17 α -метилтестостерона, M \pm m

Table 2. Morphometric characteristics of mature erythrocytes in 15-month-old rainbow trout under various 17 α -methyltestosterone treatment regimens, M \pm m

Показатель	Группа рыб			
	Контроль	3 недели	4 недели	8 недель
Диаметр эритроцита, мкм	13,2 \pm 0,06	13,4 \pm 0,07	13,4 \pm 0,06*	13,1 \pm 0,05
	8,81 \pm 0,05	8,72 \pm 0,04	8,94 \pm 0,05*	9,24 \pm 0,04*
Диаметр ядра, мкм	5,92 \pm 0,05	6,18 \pm 0,05*	6,13 \pm 0,04*	5,87 \pm 0,04
	3,05 \pm 0,03	3,03 \pm 0,03	3,02 \pm 0,02	3,04 \pm 0,02
Толщина эритроцита, мкм	2,33 \pm 0,01	2,34 \pm 0,01	2,35 \pm 0,01	2,32 \pm 0,01
Объём эритроцита, мкм ³	230,1 \pm 2,1	233,2 \pm 2,2	237,8 \pm 1,9*	233,8 \pm 1,8
Объём ядра, мкм ³	29,5 \pm 0,6	30,2 \pm 0,5	29,6 \pm 0,4	28,7 \pm 0,4
Ядерно-плазматическое отношение	0,13	0,13	0,13	0,12

Примечание: над чертой – большой диаметр эритроцита/ядра; под чертой – малый диаметр эритроцита/ядра; * – различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

шения. Результаты морфологических исследований представлены в табл. 2.

Цитометрические измерения эритроцитов показали, что размеры клеток были схожи у всех групп рыб. Однако достоверные отличия по сравнению с контрольной группой были обнаружены у рыб, получавших 17 α -метилтестостерон в течение 4 недель. Объем эритроцитов в этой группе был выше, что может свидетельствовать об адаптации к гормональному воздействию. Ядерно-плазматическое отношение эритроцитов было на порядок ниже у рыб, получавших гормональный препарат в течение 8 недель, что указывает на созревание клеток и возможное увеличение их функциональной активности.

Таким образом, продолжительное применение 17 α -метилтестостерона вызывает незначительные изменения гематологических показателей и морфологии крови, что может свидетельствовать об адаптационной реакции организма на гормональное воздействие.

Более существенные отличия между контрольным и опытными вариантами отмечены по биохимическим показателям крови рыб (табл. 3).

Анализ биохимических показателей крови выявил наиболее выраженные изменения метаболического статуса у рыб 4-недельной группы. В данной группе отмечено достоверное снижение уровня альбумина на 18,9% ($p < 0,05$) и общего белка на 11,1% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. У опытных групп рыб, получавших 17 α -метилтестостерон в течение 8 недель, содержание альбумина восстанавливалось до контрольных значений, что может свидетельствовать о развитии адаптивных механизмов в ответ на продолжительное гормональное воздействие. Изменения

в показателях азотистого обмена характеризовались тенденцией к снижению содержания азота мочевины во всех экспериментальных группах, хотя различия не достигали статистической значимости. Скорее всего, это может указывать на некоторое снижение интенсивности катаболизма белков или улучшение их утилизации в анаболических процессах под влиянием андрогенного препарата. Достоверное снижение уровня креатинина в группах с 4- и 8-недельной обработкой на 20,2% и 19,8% соответственно ($p < 0,05$) может быть обусловлено влиянием 17 α -метилтестостерона на мышечный метаболизм либо отражать изменения в функциональной активности почек при длительном применении гормона.

Показатели углеводного и липидного обмена демонстрировали относительную стабильность. Однако наблюдалась тенденция к снижению уровня глюкозы во всех экспериментальных группах, различия с контролем не были статистически значимыми. 17 α -метилтестостерон способен влиять на углеводный обмен, изменяя активность ключевых ферментов гликолиза и глюконеогенеза [Ahmed et al., 2020], однако в данном исследовании эти изменения не носили выраженного характера. Содержание триглицеридов также имело тенденцию к снижению, особенно в группе с 4-недельной обработкой, что может свидетельствовать об усилении липидного катаболизма для энергетических обменных процессов организма.

Изменения выявлены в динамике содержания холестерина: в 4-недельной группе отмечена тенденция к его повышению ($6,0 \pm 0,4$ ммоль/л против $5,7 \pm 0,2$ ммоль/л в контроле), хотя различия не достигали статистической значимости. Учитывая одновременное снижение общего белка крови в этой группе,

Таблица 3. Биохимические показатели крови радужной форели в возрасте 15 месяцев в различных вариантах продолжительности применения 17 α -метилтестостерона

Table 3. Blood biochemical parameters in 15-month-old rainbow trout under various 17 α -methyltestosterone treatment durations

Показатель	Ед. измерений	Группа рыб				Референтные значения **
		Контроль	3 недели	4 недели	8 недель	
Альбумин	г/л	14,8 \pm 0,2	13,3 \pm 0,4*	12,0 \pm 0,5*	15,1 \pm 0,3	9,81-21,1
Аспартатамино-трансфераза (АСТ)	ед/л	86,4 \pm 7,2	81,0 \pm 7,0	73,2 \pm 8,5	79,3 \pm 5,1	235-713
Азот мочевины	ммоль/л	5,2 \pm 0,3	4,9 \pm 0,5	4,3 \pm 0,3	5,0 \pm 0,2	-
Глюкоза	ммоль/л	3,9 \pm 0,5	3,0 \pm 0,2	3,2 \pm 0,3	3,2 \pm 0,1	1,6-3,9
Креатинин	ед/л	26,2 \pm 0,8	23,5 \pm 1,1	20,9 \pm 0,2*	21,0 \pm 0,6*	10,6-43,9
Общий белок	г/л	41,4 \pm 0,9	40,3 \pm 1,6	36,8 \pm 1,6*	40,5 \pm 0,7	30-60
Триглицериды	ммоль/л	2,8 \pm 0,5	2,3 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2	2,6 \pm 0,1	1,6-12,9
Холестерин	ммоль/л	5,7 \pm 0,2	5,3 \pm 0,1	6,0 \pm 0,4	5,8 \pm 0,1	2,1-12,1

Примечание: * – различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$; ** – Rozas-Serri et al., 2022; Nabi et al., 2022.

можно предположить активацию стероидогенеза, поскольку холестерин является необходимым предшественником для синтеза стероидных гормонов. Согласно литературным данным 17 α -метилтестостерон способен стимулировать эндогенный гормональный синтез [Inapan, Asar, 2020; Fazio et al., 2015], что может объяснять наблюдаемую динамику липидного профиля.

Активность аспартатаминотрансферазы (АСТ) во всех экспериментальных группах имела тенденцию к снижению, наиболее выраженную в 4-недельной группе (73,2 \pm 8,5 ед/л против 86,4 \pm 7,2 ед/л в контроле), однако различия не были статистически достоверными. Снижение активности АСТ может объясняться модулирующим действием андрогенов на активность аминотрансфераз или быть следствием адаптивных изменений в печёночном метаболизме. В то же время отмеченные в вариантах опыта изменения, за исключением показателя АСТ, не выходят за диапазон референсных значений, приведённых для нескольких видов лососевых рыб, включая форель, в обширном исследовании M. Rozas-Serri с соавторами [2022]. Отличия от референсных данных в показателе АСТ могут быть связаны со значительно более высоким уровнем липидов высокоэнергетических комбикормов, используемых в промышленной товарной аквакультуре форели, где их содержание в корме достигает 28-30%.

Таким образом, у радужной форели, получавшей 17 α -метилтестостерон, отмечены изменения гематологических параметров, выразившиеся в снижении уровня гемоглобина, количества эритроцитов, гематокрита, общего числа лейкоцитов и тромбоцитов при одновременном усилении эритропоэза. Во всех экспериментальных группах зафиксировано относительное понижение уровня основных биохимических показателей крови, наиболее выраженное в 4-недельной группе, что может свидетельствовать о перестройке белкового, углеводного и липидного обмена под влиянием гормонального воздействия. При более длительном воздействии значения были ближе к контрольным.

Известно, что гематологические показатели достаточно лабильны и дают относительно кратковременную характеристику состояния организма. Они позволяют выявить острые состояния и функциональные нарушения различных органов. В то же время при длительном наблюдении и оценке пролонгированного эффекта какого-либо воздействия более информативными являются гистологические методы исследований, позволяющие получить более детальную картину возможных изменений и оценить влияние применения препарата.

Гистологические исследования жизненно важных органов, проведённые для экспериментальных рыб в возрасте 5 и 15 месяцев позволили отметить, что по результатам оценки органов, обеспечивающих пищеварительную, выделительную, кроветворную функции, в 3-х опытных и контрольном варианте значительных различий обнаружено не было.

Печень. Влияние продолжительности обработок гормональным препаратом на пищеварительную систему молоди форели оценивали по гистологическим характеристикам состояния печени и ворсинок кишечника. Печень рассматривали как основной орган, обеспечивающий метаболизм белков, липидов, углеводов, витаминов и депонирование гликогена. Гистологический анализ печени показал, что в возрасте 5 месяцев у рыб всех экспериментальных групп в гепатоцитах присутствовали жировые включения в сопоставимых количествах. Структурная организация паренхимы соответствовала норме – имела трубчато-сетчатое строение без долевого деления, с комплексами секреторных трубок и равномерным распределением внутриспечёночных протоков (рис. 3 а, б).

К 15 месяцам у большинства особей отмечалось уменьшение липидных включений и восстановление типичной гистологической структуры печени с многогранными гепатоцитами, имеющими центральные ядра и чётко выраженную цитоплазму, что свидетельствует о функциональной полноценности органа (рис. 3 в). В отдельных случаях, вне зависимости от вариантов опыта, у некоторых особей сохранялись жировые включения в паренхиме печени, характеризующиеся избыточным накоплением липидов в гепатоцитах (рис. 3 г). Вероятнее всего, данные отклонения носят индивидуальный характер и отражают специфическую реакцию отдельных особей форели на условия кормления, не будучи следствием длительности гормональных обработок.

Кишечник. Кишечные ворсинки и бокаловидные клетки кишечника являются функционально активными элементами пищеварительной и защитной систем организма. Они обеспечивают процессы расщепления пищи, всасывания питательных веществ, защиту эпителиального слоя, являясь также субстратом для микрофлоры, а также участвуют в выведении содержимого кишечника. Под воздействием стрессовых факторов может, например, уменьшаться высота кишечных ворсинок и толщина эпителиальных клеток [Голубев, Дубицкая, 2021]. Следствием подобных изменений является снижение функциональной активности кишечника.

На гистологических препаратах кишечника исследованных рыб в возрасте 5 месяцев (рис. 3 д,

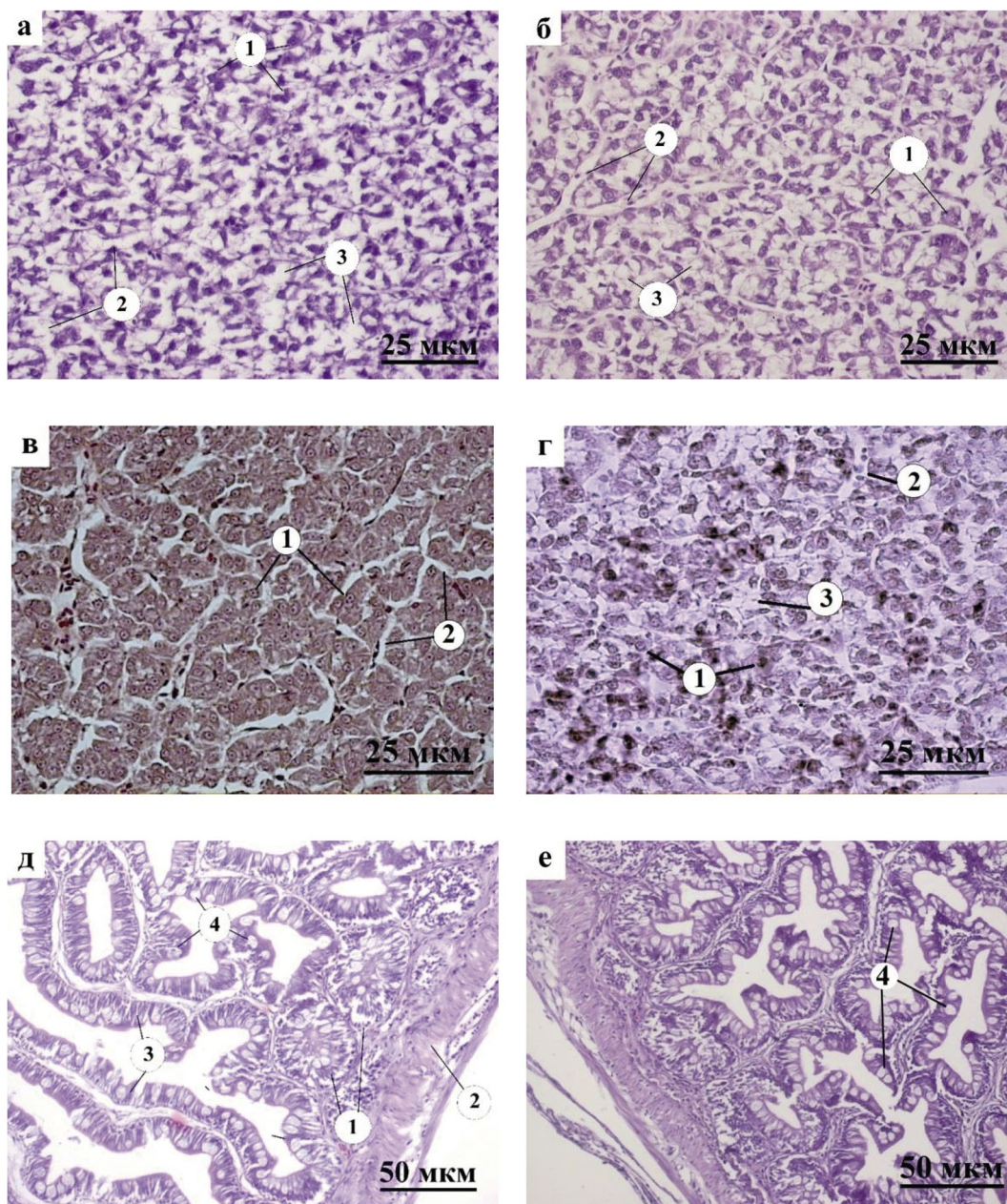


Рис. 3. Гистологические срезы печени и кишечника радужной форели. а-г – печень: а, в – контроль (5 и 15 мес.), б, г – опыт (5 и 15 мес.): 1 – гепатоциты, 2 – синусоидные капилляры, 3 – жировые включения; д, е – кишечник (5 мес.): д – контроль, е – опыт: 1 – крипты слизистой оболочки, 2 – мышечная оболочка, 3 – кишечные ворсинки, 4 – бокаловидные клетки

Fig. 3. Histological sections of the liver and intestine of the rainbow trout. a-d – liver: a, c – control (5 and 15 months), b, d – experimental group (5 and 15 months): 1 – hepatocytes, 2 – sinusoidal capillaries, 3 – lipid inclusions; e, f – intestine (5 months): e – control, f – experimental group: 1 – mucosal crypts, 2 – muscular layer, 3 – intestinal villi, 4 – goblet cells

е) можно видеть три оболочки – серозную, мышечную и слизистую. Кишечный эпителий состоит из клеток, обладающих хорошо заметной исчерченной каёмкой (микроворсинки) и бокаловидных (секретирующих слизь) клеток. Микроворсинки – пальцевидные выросты плазматической мембраны, которые характерны для эпителия тонкого кишечника. В каждой микроворсинке содержатся пучки актиновых и миозиновых

нитей (актин и миозин – белки мышц, участвующие в мышечном сокращении). Ворсинки специализируются на всасывании в тонком кишечнике.

На слизистой оболочке видна щётчатая кайма, образованная микроворсинками. Также видны бокаловидные клетки, продуцирующие слизь и трубчатые углубления эпителия слизистой оболочки кишечника –

крипты (кишечные железы), имеющие форму микроскопических толстостенных трубок (рис. 3 д).

Патологические изменения, такие как некроз эпителиальных клеток ворсинок, отёк слизистой оболочки или отслоение эпителия от базальной мембраны, не выявлены ни в контрольной, ни в опытных группах. Отмечены лишь единичные случаи гипертрофии бокаловидных клеток (рис. 5 е). Гистологические исследования пищеварительной системы подтвердили, что структуры кишечника, обеспечивающие всасывание

питательных веществ из переваренных частиц пищи, во всех вариантах эксперимента находятся в удовлетворительном морфологическом состоянии. Зависимости между продолжительностью гормональных обработок и морфологическим состоянием кишечника рыб разных вариантов опыта не обнаружено.

Селезёнка. У радужной форели как опытных, так и контрольных групп в возрасте 5 месяцев селезёнка имела ярко-бордовый цвет и нормальное строение без существенных морфологических различий между

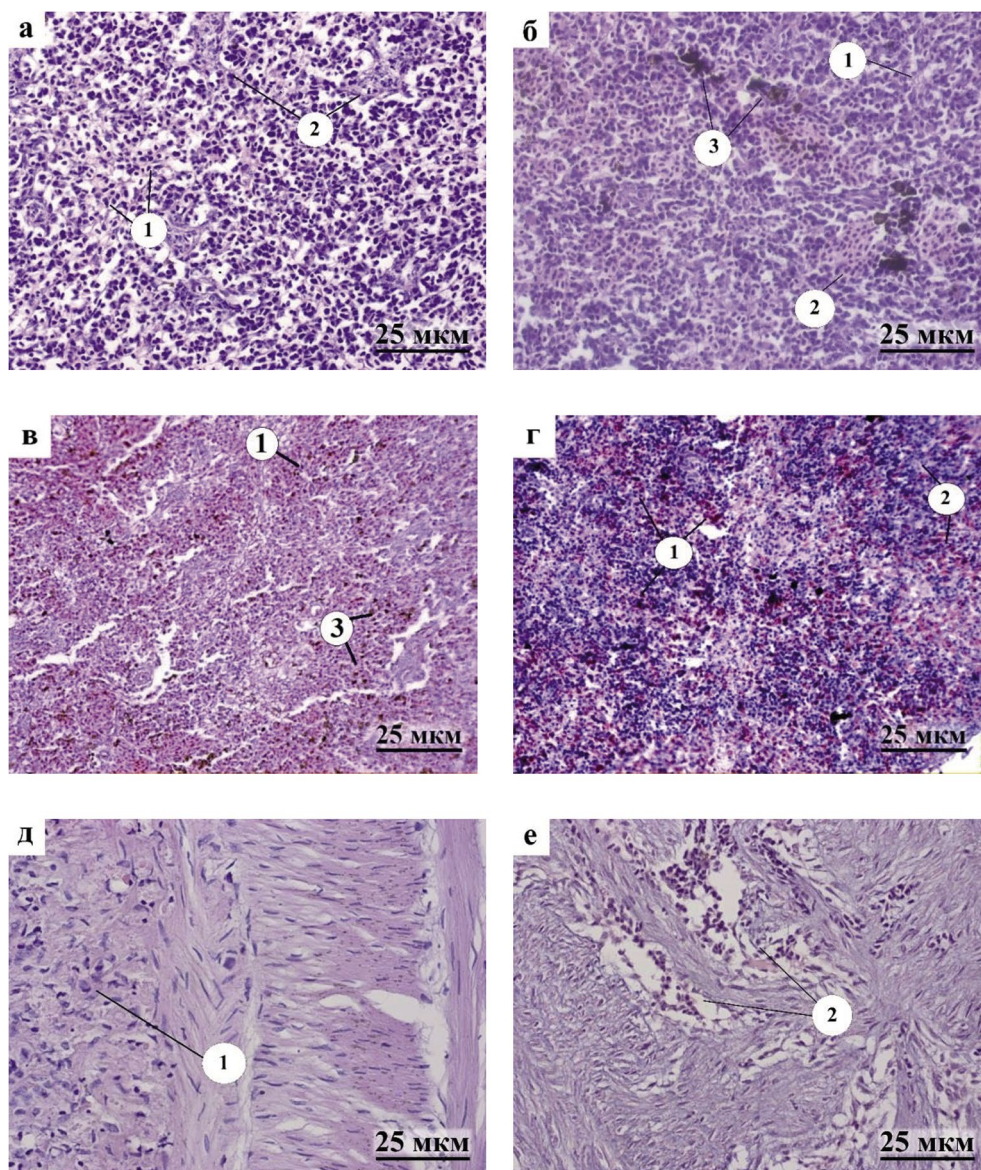


Рис. 4. Гистологические срезы тканей радужной форели: а-г – селезёнка: а, б – 5 мес. (контроль и опыт): 1 – трабекула, 2 – эритроциты и тромбоциты, 3 – меланомакрофаги; в, г – 15 мес. (контроль и опыт): 1 – красная пульпа, 2 – белая пульпа, 3 – скопление эритроцитов; д, е – сердце, 5 мес. (контроль и опыт): 1 – кардиомиоциты, окруженные коллагеновыми волокнами, 2 – группа эритроцитов

Fig. 4. Histological sections of rainbow trout tissues. a-d – spleen: a, b – 5 months (control and experimental group): 1 – trabecula, 2 – erythrocytes and thrombocytes, 3 – melanomacrophages; c, d – 15 months (control and experimental group): 1 – red pulp, 2 – white pulp, 3 – erythrocyte accumulation; e, f – heart, 5 months (control and experimental group): 1 – cardiomyocytes surrounded by collagen fibers, 2 – erythrocyte group

группами. Паренхима органа характеризовалась однородной структурой, без выраженного разделения на белую и красную пульпы. Форменные элементы крови располагались среди многочисленных мелких лимфоцитов (рис. 4 а). Часто встречались центры меланомакрофагов, которые состоят из макрофагов и пигментов (тёмные пятна) и представляют собой характерные элементы иммунной системы костистых рыб (рис. 4 б).

В возрасте 15 месяцев на гистологических срезах селезёнки наблюдалось чёткое морфологическое разделение на красную и белую пульпы (окрашенные в фиолетово-синий цвет) (рис. 4 в, г). При этом красная пульпа преобладала количественно, а лимфоидные зоны белой пульпы были относительно менее развиты.

В целом, в обеих возрастных группах гистологическая картина селезёнки соответствовала норме, что свидетельствовало о стабильности её морфологической организации и сохранении функциональной активности в условиях проведённого эксперимента. Какие-либо значимые отличия между контрольным вариантом и опытными отмечены не были.

Сердце. У молоди в возрасте 5 месяцев в предсердии наблюдали многочисленные пространства, заполненные эритроцитами (рис. 4 е), которые были окружены мышечными тяжами (рис. 4 д). На гистологических срезах сердца коллагеновые волокна желудочка имели нормальное строение, также были чётко видны кардиомиоциты (рис. 4 е). Нарушений в структуре сердечной системы не отмечалось, что свидетельствует о её нормальном функционировании на данном этапе развития.

В возрасте 15 месяцев у обследованных рыб гребневидные мышцы предсердия сохраняли нормальное строение, подтверждая стабильность сердечной структуры (рис. 5 а). В желудочке сердца был выявлен самый толстый слой кардиомиоцитов, что свидетельствует о его способности поддерживать эффективное кровообращение (рис. 5 б). Во всех исследованных вариантах было отмечено умеренное содержание жировой ткани на поверхности сердца, обусловленное возрастными изменениями и адекватной адаптацией к условиям окружающей среды.

Сравнительная оценка гистологических срезов жизненно важных органов экспериментальных групп рыб всех вариантов в возрасте 5 и 15 месяцев позволяет отметить нормальные возрастные изменения в структуре внутренних органов. Однако какое-либо заметное влияние воздействия 17 α -метилтестостерона, использованного на ранних стадиях развития экспериментальных рыб, на структуру внутренних органов выявлено не было.

Гонады. Исследование состояния гонад представляло наибольший интерес, т. к. одной из основных задач выполнявшейся работы было получение инверсии пола с использованием внешнего воздействия гормонами. Как было отмечено ранее, в экспериментах была использована молодь форели, полученная из икры феминизированных самок. В этой связи несомненный интерес представляла возможность самого факта получения самцов. Гистологические исследования гонад рыб из разных вариантов опыта позволили получить следующие результаты.

В контрольной группе в возрасте 15 месяцев, все рыбы развились как самки. Около 30% из них находились на II стадии зрелости с ооцитами цитоплазматического роста (рис. 5 в), а у 70% самок начался переход на III стадию зрелости (рис. 5 г). Ооциты старшей генерации находились в состоянии вителлогенеза, в их цитоплазме были обнаружены многочисленные гранулы желтка и процесс их слияния.

В варианте с 3-мя неделями воздействия 17 α -метилтестостерона оказалось до 50% не переопределённых самок, достигших II стадии зрелости. До 50% рыб имели гонады со сформированными ампулами и сперматогониями в начале II стадии зрелости самцов. Таким образом, доза и продолжительность кормления в этом варианте оказались недостаточными для полноценной инверсии самок в самцов.

В варианте с 8-ю неделями применения 17 α -метилтестостерона получился небольшой процент самок, достигших II стадии зрелости, но с ооцитами, подвергающимися резорбции. Основная масса, до 90% рыб, оказались стерильными и с жировым перерождением гонад. Небольшой процент составили переопределённые самцы в начале II стадии зрелости.

Среди вариантов, где рыбы были подвергнуты гормональной инверсии пола в сторону самцов, наиболее удачным оказался вариант, в котором молодь форели получала 17 α -метилтестостерон в течение 4 недель. В этом варианте основная масса рыб (до 90%) переопределилась в самцов, и большинство из них достигло III стадии зрелости (рис. 5 д). Остался небольшой процент рыб, развивающихся как самки и гермафродиты, которые, вероятно, созреют как самцы (рис. 5 е).

Таким образом, исследования гонад рыб, подвергнутых гормональной обработке, позволили выявить существенное влияние применения 17 α -метилтестостерона на формирование пола и развитие гонад у молоди радужной форели в зависимости от продолжительности использования препарата. Несмотря на то, что опыты проводили на феминизированной икре, удалось добиться реверсии пола. Различная продолжительность обработки 17 α -метилтестостероном позво-

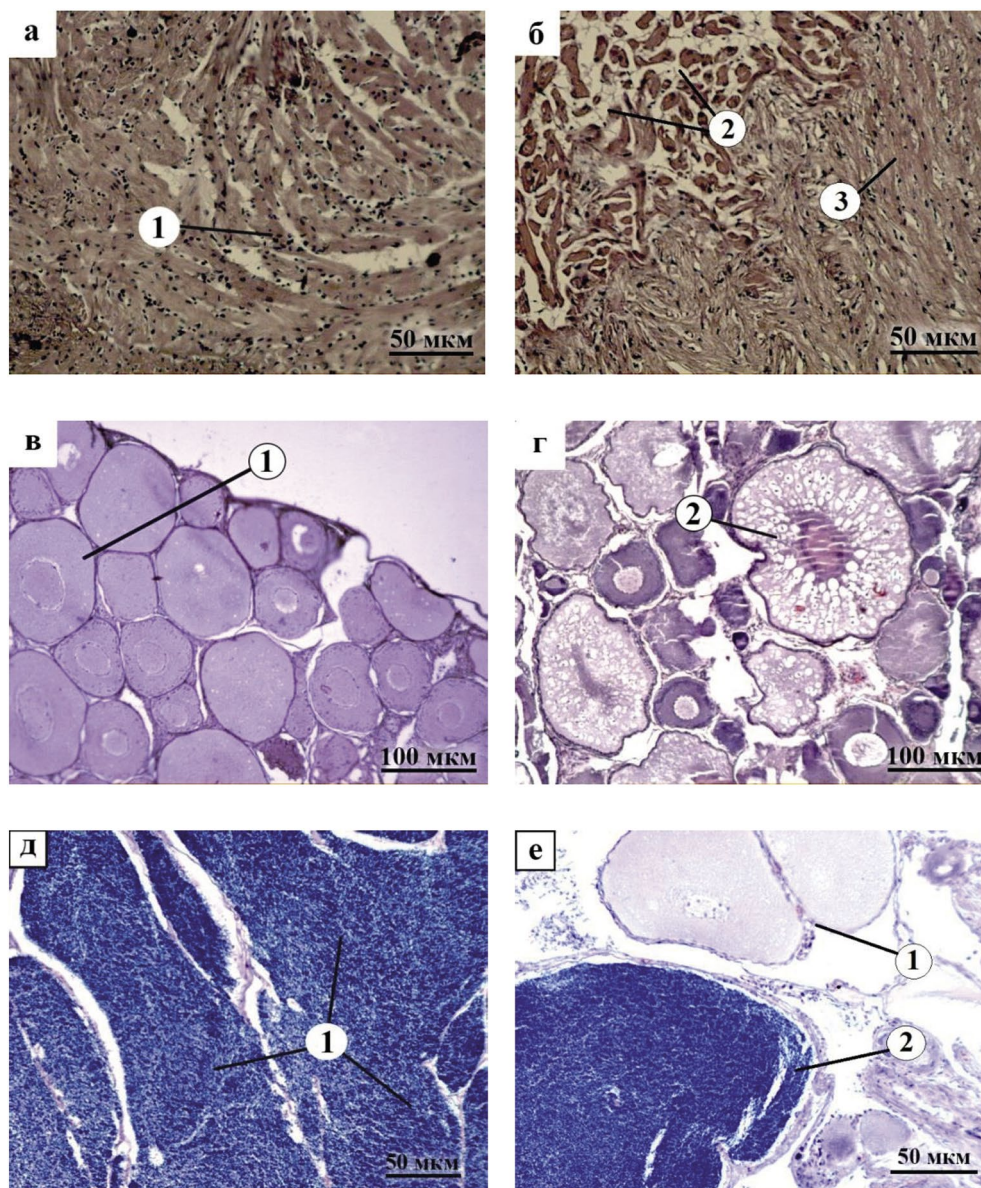


Рис. 5. Гистологические срезы тканей радужной форели (15 мес.). а, б – сердце (контроль и опыт): 1 – кардиомиоциты желудочка сердца, 2 – жировое включение в желудочке, 3 – предсердие с большим количеством кардиомиоцитов; в, г – гонады самки (контроль и опыт): 1 – ооциты цитоплазматического, 2 – ооциты трофоплазматического роста; д – гонады самца (опыт, вариант 4): 1 – сперматоциты 2-го порядка и сперматиды; е – гонады гермафродита (опыт, вариант 4): 1 – ооциты цитоплазматического роста, 2 – сперматиды

Fig. 5. Histological sections of rainbow trout tissues (15 months). а, б – heart (control and experimental group): 1 – ventricular cardiomyocytes, 2 – lipid inclusion in the ventricle, 3 – atrium with a high density of cardiomyocytes; в, г – female gonads (control and experimental group): 1 – oocytes at the cytoplasmic growth stage, 2 – oocytes at the trophoplasmic growth stage; д – male gonads (experimental group, variant 4): 1 – secondary spermatocytes and spermatids; е – hermaphrodite gonads (experimental group, variant 4): 1 – oocytes at the cytoplasmic growth stage, 2 – spermatids

лила получить от 90% самцов (4 недели применения препарата) до 90% стерильных рыб (8 недель применения препарата).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение 17 α -метилтестостерона при его добавлении в корм в концентрации 2 мг/кг личинкам и молоди форели в течение 3, 4 и 8 недель не приве-

ло к различиям в выживаемости. Продолжительность воздействия препарата оказала различное влияние на формирование воспроизводительной системы молоди форели. Все рыбы контрольной группы развились как самки. Трёхнедельное воздействие обеспечило 50% самцов, четырёхнедельное – 90% переопределения в самцов, а восьминедельное привело к 90% стерильности с жировым перерождением гонад.

Анализ гематологических показателей у рыб в возрасте 15 месяцев показал, что применение препарата в течение 4 и 8 недель сопровождалось незначительным снижением уровня гемоглобина, гематокрита и количества эритроцитов, а также увеличением относительного содержания лейкоцитов и тромбоцитов. Кровь рыб, получавших препарат, по содержанию альбумина, общего белка и креатинина были достоверно ниже, по сравнению с рыбами из контрольного варианта. Также, у рыб из опытных групп отмечено некоторое снижение содержания АСТ, азота мочевины, триглицеридов. При этом все различия оставались в пределах референсных значений для форели данной возрастной группы. При гистологическом исследовании печени, кишечника, сердца и селезёнки структурных изменений не выявлено.

Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии 17 α -метилтестостерона на реверсию пола форели при отсутствии патологических изменений в организме рыб.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все применимые этические нормы соблюдены.

Финансирование

Исследования выполнены в рамках госзадания № 076-00005-25-00 ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО».

ЛИТЕРАТУРА

- Барулин Н.В., Лиман М.С., Новикова Е.Г., Шумский К.Л., Атрощенко Л.О. 2016. Рекомендации по выращиванию рыбобосадочного материала радужной форели в рыбоводных индустриальных комплексах (с временными нормативами). Горки: БГСХА. 180 с.
- Гентен Ф., Тервинге Э., Данги А. 2016. Атлас гистологии рыб. СПб.: Проспект Науки. 216 с. (Genten F., Terwinghe E., Danguy A. 2009. Atlas of Fish Histology. Enfield: Science Publishers).
- Голубев Д.С., Дубицкая А.В. 2021. Особенности морфологического строения слизистой оболочки кишечника у среднего и крупного товарного карпа гибридной породы // Ресурсы дичи и рыбы: использование и воспроизводство. Мат. II Всеросс. науч.-практ. конф. Красноярск, 26 ноября 2021 г. С. 72-76.
- Иванова Н.Т. 1983. Атлас клеток крови рыб. М.: Лёгкая и пищевая промышленность. 184 с.
- Кухарева Т.А. 2019. Клеточный состав крови и гемопоэтических органов у некоторых видов донных рыб (Севастопольская бухта, Чёрное море). Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Севастополь: ИнБЮМ. 21 с.
- Метальникова К.В. 2015. Сохранение разнообразия редких видов рыб при использовании аналогов. Саарбрюккен: Изд-во LAP LAMBERT Academic Publishing является торговой маркой Omni Scriptum GmbH&Co/KG. 121 с.
- Методические указания по проведению гематологического обследования рыб. 1999. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 2. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро. 97 с.
- Микодина Е.В., Седова М.А., Чмилевский Д.А. Микулин, А.Е., Пьянова, С.В., Полуэктова, О.Г. 2009. Гистология для ихтиологов: опыт и советы. М.: Изд-во ВНИРО. 112 с.
- Серпунин Г.Г. 2010. Гематологические показатели адаптаций рыб. Калининград: Изд-во КГТУ. 460 с.
- Ahmed I., Reshi Q.M., Fazio F. 2020. The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: A review // Aquaculture International. V. 28. P. 869-899. DOI: 10.1007/s10499-019-00501-3.
- Devlin R.H., Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences // Aquaculture. V. 208. P. 191-364. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00057-1.
- Fazio F., Saoca C., Casella S., Fortino G., Piccione G. 2015. Relationship between blood parameters and biometric indices of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* cultured in onshore tanks // Mar. Freshw. Behav. Phy. V. 48. P. 289-296. DOI: 10.1080/10236244.2015.1041239.
- Geffen A.J., Evans J.P. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquaculture. V. 182. P. 61-72. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00248-3.
- Hoga C.A., Almeida F.L., Reyes F.G.R. 2018. A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues // CyTA – Journal of Food. V. 16. No. 1. P. 679-691. DOI: 10.1080/19476337.2018.1475423.
- Inanan B.E., Acar Ü. 2020. Comparison of milt and blood parameters including testosterone and gonadotropins levels of sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different steroid hormones // Aquaculture Research. V. 51. No. 12. P. 4879-4887. DOI: 10.1111/are.15036.
- Katongo C. 2013. Effect of 17 α -Methyl Testosterone on Haematology and Histology of Liver and Heart of *Oreochromis andersonii* (Castelnau, 1861) // Journal of Marine Science Research & Development. V. 3(3). P. 123-130. DOI: 10.4172/2155-9910.1000130.
- Keen J.E., Steele A.M.C., Houston A.H. 1989. The circulating erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Comparative Biochemistry and Physiology. Pt A: Physiology. V. 94. No. 4. P. 699-711. DOI: 10.1016/0300-9629(89)90620-8.
- Kuzminski H., Dobosz S. 2010. Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione // Archives of Polish Fisheries. V. 18. No. 1. P. 45-49. DOI: 10.2478/v10086-010-0005-0.
- Nabi N., Ahmad I., Wani G.B., Ahmad S.M., Shafi K.M. et al. 2022. Hematological and serum biochemical reference

- intervals of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* cultured in Himalayan aquaculture: Morphology, morphometrics and quantification of peripheral blood cells // Saudi Journal of Biological Sciences. V. 29. No. 4. P. 2942-2957. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.01.020. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.01.019
- Pandian T.J., Sheela S.G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish // Aquaculture. V. 138. No. 1-4. P. 1-22. DOI : 10.1016/0044-8486(95)01075-0.
- Razmi K., Naji T., Alizadeh M., Hoseinzadeh Sahafi H. 2011. Hormonal sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by ethynylestradiol-17 α (EE2) // Iranian Journal of Fisheries Sciences. V. 10. No. 2. P. 304-315.
- Řehulka J., Adamec V. 2004. Red Blood Cell Indices for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Reared in Cage and Raceway Culture // Acta Veterinaria Brno. V. 73. No. 1. P. 105-114. DOI: 10.2754/avb200473010105.
- Rozas-Serri M., Correa R., Walker-Vergara R., Coñuecar D., Barrientos S., Leiva C. et al. 2022. Reference Intervals for Blood Biomarkers in Farmed Atlantic Salmon, Coho Salmon and Rainbow Trout in Chile: Promoting a Preventive Approach in Aquamedicine // Biology. V. 11. No. 7. P. 1065. DOI: 10.3390/biology11071065.
- Solar I.I., Donaldson E.M., Hunter G.A. 1984. Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in rainbow trout by oral administration of 17 α -methyltestosterone // Aquaculture. V. 42. P. 129-139. DOI: 10.1016/0044-8486(84)90360-0.
- Yamamoto T. 1953. Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*) // J. Exp. Zool. V. 123. P. 571-594. DOI: 10.1002/jez.1401230309.
- Yamazaki F. 1983. Sex control and manipulation in fish // Aquaculture. V. 33. P. 329-354. DOI: 10.1016/0044-8486(83)90413-1.
- fish (Sevastopol Bay, Black Sea). PhD Abstr. in biology. Sevastopol: A.O. Kovalevsky IBSS RAS. 21 p. (In Russ.)
- Metalnikova K.V. 2015. Preservation of the diversity of rare fish species using analogs. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing. 121 p. (In Russ.)
- Methodical instructions for hematological examination of fish 1999. Coll. of instructions for the control of fish diseases. Part 2. Moscow: Otdel marketinga AMB-agro. 97 p. (In Russ.)
- Mikodina E.V., Sedova M.A., Chmylevsky D.A., Mikulin A.E., Pyanova S.V., Polyektova O.G. 2009. Histology for ichthyologists: experience and advice. Moscow: VNIRO Publish. 112 p. (In Russ.)
- Serpunin G.G. 2010. Hematological indicators of fish adaptations. Kaliningrad: KSTU. 460 p. (In Russ.)
- Ahmed I., Reshi Q.M., Fazio F. 2020. The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: A review // Aquaculture International. V. 28. P. 869-899. DOI: 10.1007/s10499-019-00501-3.
- Devlin R.H., Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences // Aquaculture. V. 208. P. 191-364. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00057-1.
- Fazio F., Saoca C., Casella S., Fortino G., Piccione G. 2015. Relationship between blood parameters and biometric indices of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* cultured in onshore tanks // Mar. Freshw. Behav. Phy. V. 48. P. 289-296. DOI: 10.1080/10236244.2015.1041239.
- Geffen A.J., Evans J.P. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquaculture. V. 182. P. 61-72. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00248-3.
- Hoga C.A., Almeida F.L., Reyes F.G.R. 2018. A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues // CyTA – Journal of Food. V. 16. No. 1. P. 679-691. DOI: 10.1080/19476337.2018.1475423.
- Inanan B.E., Acar Ü. 2020. Comparison of milt and blood parameters including testosterone and gonadotropins levels of sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different steroid hormones // Aquaculture Research. V. 51. No. 12. P. 4879-4887. DOI: 10.1111/are.15036.
- Katongo C. 2013. Effect of 17 α -Methyl Testosterone on Haematology and Histology of Liver and Heart of *Oreochromis andersonii* (Castelnau, 1861) // Journal of Marine Science Research & Development. V. 3(3). P. 123-130. DOI: 10.4172/2155-9910.1000130.
- Keen J.E., Steele A.M.C., Houston A.H. 1989. The circulating erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Comparative Biochemistry and Physiology. Pt A: Physiology. V. 94. No. 4. P. 699-711. DOI: 10.1016/0300-9629(89)90620-8.
- Kuzminski H., Dobosz S. 2010. Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione

REFERENCES

- Barulin N.V., Liman M.S., Novikova E.G., Shumskiy K.L., Atroshchenko L.O. 2016. Recommendations on the cultivation of rainbow trout seed material in industrial fish farming complexes (with temporary standards). Gorki: Belarusian State Agricultural Academy. 180 p. (In Russ.)
- Genten F., Terwinghe E., Danguy A. 2016. Atlas of fish histology / V.A. Shutov transl., ed. Saint Petersburg: Prospect Nauki. 216 p. (Genten F., Terwinghe E., Danguy A. 2009. Atlas of Fish Histology. Enfield: Science Publishers. 224 p.). (In Russ.)
- Golubev D.S., Dubitskaya A.V. 2021. Features of the morphological structure of the intestinal mucosa in medium and large marketable hybrid carp // Resources of game and fish: use and reproduction. Proc. II All-Russ. sci-pract. conf. Krasnoyarsk, November 26, 2021. P. 72-76. (In Russ.)
- Ivanova N.T. 1983. Atlas of fish blood cells. Moscow: Legkaya i pishchevaya promyshlennost. 184 p. (In Russ.)
- Kukhareva T.A. 2019. Cellular composition of blood and hematopoietic organs in some species of bottom

- // Archives of Polish Fisheries. V. 18. No. 1. P. 45-49. DOI: 10.2478/v10086-010-0005-0.
- Nabi N., Ahmad I., Wani G.B., Ahmad S.M., Shafi K.M. et al.* 2022. Hematological and serum biochemical reference intervals of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* cultured in Himalayan aquaculture: Morphology, morphometrics and quantification of peripheral blood cells // Saudi Journal of Biological Sciences. V. 29. No. 4. P. 2942-2957. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.01.020. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.01.019
- Pandian T.J., Sheela S.G.* 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish // Aquaculture. V. 138. No. 1-4. P. 1-22. DOI : 10.1016/0044-8486(95)01075-0.
- Razmi K., Naji T., Alizadeh M., Hoseinzadeh Sahafi H.* 2011. Hormonal sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by ethynylestradiol-17 α (EE2) // Iranian Journal of Fisheries Sciences. V. 10. No. 2. P. 304-315.
- Řehulka J., Adamec V.* 2004. Red Blood Cell Indices for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Reared in Cage and Raceway Culture // Acta Veterinaria Brno. V. 73. No. 1. P. 105-114. DOI: 10.2754/avb200473010105.
- Rozas-Serri M., Correa R., Walker-Vergara R., Coñuecar D., Barrientos S., Leiva C. et al.* 2022. Reference Intervals for Blood Biomarkers in Farmed Atlantic Salmon, Coho Salmon and Rainbow Trout in Chile: Promoting a Preventive Approach in Aquamedicine // Biology. V. 11. No. 7. P. 1065. DOI: 10.3390/biology11071065.
- Solar I.I., Donaldson E.M., Hunter G.A.* 1984. Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in rainbow trout by oral administration of 17 α -methyltestosterone // Aquaculture. V. 42. P. 129-139. DOI: 10.1016/0044-8486(84)90360-0.
- Yamamoto T.* 1953. Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*) // J. Exp. Zool. V. 123. P. 571-594. DOI: 10.1002/jez.1401230309.
- Yamazaki F.* 1983. Sex control and manipulation in fish // Aquaculture. V. 33. P. 329-354. DOI: 10.1016/0044-8486(83)90413-1.

Поступила в редакцию 10.11.2025 г.
Принята после рецензий 14.12.2025 г.