

УДК 597—114

**О ВОЗМОЖНОСТИ ОЦЕНКИ ГОНАДОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ
ГИПОФИЗОВ РЫБ ПО СОЗРЕВАНИЮ ООЦИТОВ IN VITRO****В. С. Апекин**

Необходимость стандартизации гипофизарных препаратов, применяемых для индуцирования нереста рыб, подчеркивалась еще Н. Л. Гербильским (1947). Эта задача может быть решена только после получения эталонов гонадотропинов.

В настоящее время активность гипофизов оценивают биологическим путем: по реакции овуляции у вьюна (*Misgurnus fossilis*) (Казанский и Нусенбаум, 1947; Казанский, 1949), по спермиации у лягушек (Алпатов и Строганов, 1950) и по созреванию самок ерша (Травкин, Боев, 1969); находят минимальную дозу, дающую 50% положительных результатов, и выражают активность 1 мг препарата в условных «вьюновых» (в.е.) или «лягушачьих» (л.е.) единицах. Так, пороговая доза ацетонированных гипофизов осетра, вызывающая овуляцию у вьюна, составляет 0,2—0,3 мг (Баранникова, 1949), активность гипофизов — 5—3 в.е., а спермиацию у *Rana temporaria* — 0,15—0,25 мг (Алпатов и Строганов, 1950; Травкин, Боев, 1969) — 6—4 л.е. Сравнимые препараты тестируют на одной партии животных, так как реактивность на гонадотропины может меняться от партии к партии, а также в течение сезона. На каждую исследуемую точку берут 3—5, редко более 10 животных. Относительно невысокая чувствительность ограничивает возможности методов тестирования при сравнительном изучении гонадотропинов рыб.

К настоящему времени предложен метод количественного определения гонадотропинов амфибий по реакции созревания их ооцитов *in vitro* (Thornton, 1971; Гончаров, 1971).

Б. Ф. Гончаров (1972) применил его для оценки активности гипофизов рыб. Автор сравнивал между собой гипофизы осетра и севрюги по их индуцирующему действию на созревание ооцитов севрюги. Активность оценивали по проценту яйцеклеток, созревших в одинаковых разведениях. Выбор севрюги в качестве теста обоснован тем, что активность двух препаратов можно сравнивать только по отношению к объекту, на котором выполнено тестирование, так как для других видов обнаруженные различия могут оказаться несущественными, и тем, что в рассмотренном случае гонадотропную активность гипофизов необходимо знать применительно к севрюге, для стимулирования которой они используются на рыбоводных заводах.

Возможность прямого подхода к анализу гипофизов костистых рыб не выяснена. Созревание их ооцитов *in vitro* пока получено для нескольких видов (Скоблина, 1973).

Чувствительность к гонадотропинам фолликулов *in vitro* значительно выше, чем самок вьюна и самцов лягушки. Ооциты севрюги созревают в 0,002 мг/мл вещества гипофиза осетра.

Представительность обследования методом *in vitro* также выше, так как в каждом опыте может участвовать 50 яйцеклеток и более. Новый метод тестирования открывает широкие возможности для сравнительного изучения зоологической специфичности гонадотропинов рыб, так как позволяет подобрать объекты, имеющие практически неограниченное количество близких по состоянию тест-ооцитов. Интересно проверить возможность использования в качестве таких объектов амфибий, для ряда видов которых экспериментально доказан гормональный контроль созревания и хорошо освоена техника культивирования ооцитов *in vitro* (Wright, 1945, 1960; Masui, 1967; Schuetz, 1967 и др.). Показано, что гипофизы осетровых хорошо индуцируют созревание ооцитов *Rana ridibunda*.

В предлагаемой работе исследовали индуцирующее действие гипофизов нескольких видов рыб на созревание ооцитов зеленой жабы (*Bufo viridis*). Сравнили результаты тестирования двух партий гипофизов осетра и севрюги по овуляции вьюна и по реакции созревания *in vitro*. Была сделана попытка оценить точность метода на фолликулах озерной лягушки (*Rana ridibunda*).

В работе использованы ацетонированные гипофизы восьми видов рыб, относящихся к шести отрядам:

осетр — *Acipenser güldenstädti*, *Acipenseriformes*;
сазан — *Cyprinus carpio* L., *Cypriniformes*;
горбуша — *Oncorhynchus gorboscha* Walb., *Clupeiformes*;
бычок-кругляк — *Gobius melanostomus* Pall., *Perciformes*;
лобан — *Mugil cephalus* }
сингиль — *Mugil auratus* } *Mugiliformes*;

камбала-калкан — *Scophthalmus maeoticus* Pall.;
глосса — *Platichthys flesus luscus* Pall., *Pleuronectiformes*.

Гипофизы осетра и сазана были заготовлены Главрыбводом, горбуши — любезно представлены Г. М. Персовым, гипофизы остальных видов рыб собраны нами от самцов и самок IV стадии зрелости. Железы сразу же ацетонировали, по рекомендации Т. И. Фалеевой (1968), и сохраняли над обезвоженным CaCl_2 в холодильнике. Перед опытами гипофизы растирали в ступке, суспендировали в 0,65 %-ном растворе NaCl из расчета 20 мг сухого вещества на 1 мл раствора и экстрагировали на холоде в течение 12—20 ч. Надосадочную фракцию отделяли центрифугированием при 4—6 тыс. об/мин в течение 30 мин и использовали в опытах.

Были приготовлены вытяжки из партии гипофизов осетра и партии гипофизов севрюги. Вытяжки из 61 гипофиза осетра (масса 560 мг) и 82 гипофизов севрюги (масса 600 мг) были приготовлены, как предыдущие, расфасованы по 1,5 мл и заморожены. Сохраняли их при температуре минус 10°C и размораживали только перед употреблением. В некоторых экстрактах определяли количество белка по Лоури. Для индуцирования созревания использовали также гипофизы самих амфибий и прогестерон. Маточную суспензию гипофизов готовили заранее на весь сезон (один гипофиз на 50 мл физиологического раствора), расфасовывали и хранили в замороженном виде.

Опыты на вьюнах выполняли в начале апреля. Самок массой 20—30 г за сутки до опыта постепенно акклимировали к комнатной температуре. Препараты в объеме 0,2 мл вводили в спинные мышцы. Результаты оценивали через двое суток.

Жаб и лягушек для тестирования заготавливали поздней осенью и содержали при температуре 0—4° С. Опыты ставили в апреле. Метод культивирования ооцитов сводился к следующему. Последовательно растворяли в 1 л дистиллированной воды 6,5 г NaCl, 250 мг KCl, 300 мг CaCl₂ и 200 мг NaHCO₃. Содой доводили рН раствора до 7,8. Затем растворяли 1 г яичного альбумина и антибиотики: пенициллин 1·10⁶ ед. и стрептомицин 25·10⁴ ед. Готовый раствор Рингера хранили в холодильнике и использовали в течение 2—6 дней. Готовили дву- или четырехкратные разведения экстрактов гипофизов. Ооциты культивировали во флаконах объемом 20 мл. В каждом из них было по 4 мл раствора Рингера с определенной концентрацией гипофиза. Затем яичник жабы или лягушки разделяли петлями на фрагменты по 2—10 фолликулов и помещали в пузырьки по 50±10 шт. Пузырьки закрывали пробками, клали на бок и оставляли на 40—48 ч при комнатной температуре. После инкубации фолликулы варили непосредственно во флаконах, перенесли на пластинку из пенопласта, разрезали под бинокуляром бритвой и определяли наличие или отсутствие зародышевого пузырька. Критерием созревания служило его растворение.

Действие гипофизов рыб на ооциты жабы *in vitro*. Как видно из данных табл. 1, гипофиз осетра обладал высокой индуцирующей активностью — почти во всех случаях он вызывал созревание большей части клеток в широком диапазоне концентраций. Нижний предел при пересчете на белок составил 1,8 мкг/мл.

У двух из четырех подопытных амфибий ооциты, вынесенные *in vitro*, оказались инерционными, и некоторая их часть созревала в контроле — растворе Рингера без гипофиза. Эти опыты представляют интерес для оценки действия гипофиза на ооциты разной чувствительности. В опыте с самкой № 4, несмотря на то что часть ее ооцитов была инерционной, созрело клеток меньше, чем в опытах с другими самками.

Гипофиз сазана закономерно индуцировал созревание ооцитов зеленой жабы, но менее эффективно, чем гипофиз осетра (реагирующие концентрации выше, а доля созревших клеток ниже 17—24%).

Гипофиз бычка-кругляка не дал созревания.

Гонадотропины горбуши, лобана, сингиля, камбалы-калкана и глоссы вызывали растворение зародышевых пузырьков в единичных ооцитах некоторых проб. Видимой связи между концентрацией гипофизарного материала и количеством созревших клеток не наблюдалось. В подтверждение факта, что гипофизы этих рыб слабо, но все-таки проявляют гонадотропное действие, можно привести несколько доводов. У неинерционных ооцитов спонтанного растворения зародышевых пузырьков в контроле не происходило. В присутствии гипофизов бычков ядра тоже не растворялись. У инерционной самки № 4 при повышении концентрации гонадотропинов до 6,4 мг/мл эффект усиливался. Высокая концентрация суммарных белков гипофиза (1,6—6,4 мг/мл), вероятно, действует на ооциты угнетающе, так что для исследования более высоких доз гонадотропинов необходимо иметь очищенные препараты. Мозаичность ответов объясняется, на наш взгляд, низким уровнем компетенции реагирующей системы по отношению к гонадотропинам, а не недостатком их в среде.

Таким образом, гипофизы восьми исследованных видов рыб по их способности индуцировать созревание ооцитов *in vitro* можно разделить на четыре группы: 1) высокоактивные — осетр; 2) среднеактивные — сазан; 3) низкоактивные — горбуша, лобан, сингиль, камбала-калкан, глосса; 4) неактивные — бычок-кругляк. Различия в реакции, вероятно, связаны с биологической разнокачественностью соответствующих

Индукция гипофизами рыб созревания ооцитов *Bufo viridis* (% созревших от 50 ± 10 клеток)

Таблица 1

Показатели	Осетр	Горбуша	Сазан	Лобан	Сингиль	Бычок- кругляк	Камбала- калкан	Глосса	Контроль	
									1	2
Исходная концентрация гипофиза 20 мг/мл										
Число желез	—	4	4	3*	9*	37*	2*	3		
Белок, мг/мл	4,8	2,9	5,1	6,4	4,6	—	3,6	0,9		
Сухое вещество, мг/л										
0,4	95	3	17	3	0	0	0	0		
0,1	65	8	5	0	3	0	9	8		
0,025	62	0	3	6	0	0	8	0		
Раствор Рингера	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
0,4	—	0	26	7	0	—	8	11		
0,1	97	0	10	0	5	—	0	0		
0,025	95	2	7	5	8	—	0	5		
Раствор Рингера	—	—	—	—	—	—	—	—	12	3
Число желез	2	6	5	4*	12**	179*	3*	6		
Белок, мг/мл	6,0	2,7	6,3	5,1	5,9	—	3,5	2,4		
Сухое вещество, мг/л										
1,6	—	0	—	2	3	0	3	0		
0,4	—	0	24	0	0	0	2	2		
0,1	96	0	0	0	0	0	0	3		
0,025	88	0	0	0	0	0	0	5		
0,006	6	0	0	0	0	0	0	0		
Раствор Рингера	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0
Исходная концентрация гипофиза 60 мг/л										
Число желез	33	43	28	—	40	1000	24	29		
Белок, мг/мл	19,4	11,4	20,1	—	10,6	17,4	18,4	20,1		
Сухое вещество, мг/л										
6,4	—	8	42	—	22	10	12	7		
1,6	—	25	20	—	10	14	26	40		
0,4	43	—	—	—	—	—	—	—		
0,1	24	—	—	—	—	—	—	—		
Раствор Рингера	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2

* Самки.
** Самцы.

гонадотропинов, существование которой убедительно показано результатами работ с грубыми экстрактами гипофизов многих видов рыб (Казанский, 1940; Pickford & Atz, 1957; Bagg, 1968 и др.), а в последние годы подтверждено и при исследовании очищенных препаратов (Fontaine et al., 1972). Как видно, фолликулы жабы пригодны только для исследования гипофизов осетра и сазана.

Интересно выяснить, в какой степени связана чувствительность к высокоактивным гонадотропинам с чувствительностью к низкоактивным. Чтобы ответить на этот вопрос, мы провели несколько экспериментов с фолликулами гипофизов лягушки, осетра, сазана и камбалы-калкана.

Таблица 2

Созревание ооцитов лягушки (в %) под влиянием гипофизов лягушки, осетра, сазана и камбалы-калкана

Гипофиз	Концентрация, мг/мл	Номер самки				
		1	2	3	4	5
Лягушки	0,005*	0	7	11	25	43
Осетра	0,1	3	0	8	6	100
Сазана	0,1	0	0	0	0	0
Камбалы-калкана	0,1	0	0	0	0	0
Физиологический раствор		0	0	0	0	0

Продолжение табл. 2

Гипофиз	Концентрация, мг/мл	Номер самки				
		6	7	8	9	10
Лягушки	0,005*	47	62	78	94	97
Осетра	0,1	38	23	92	89	100
Сазана	0,1	0	—	—	—	74
Камбалы-калкана	0,1	0	6	0	0	0
Физиологический раствор		0	0	0	0	0

* шт./мл.

В табл. 2 результаты расположены в порядке возрастания количества яйцеклеток, созревших в гипофизе лягушки. При низкой (№ 1—3) и высокой (№ 8—10) чувствительности фолликулов осетровый гипофиз вызывал реакцию, сходную по интенсивности с вызванной лягушачьим гипофизом. В группе со средней чувствительностью (№ 4—7) ответы на эти два гонадотропина изменялись неоднозначно. Гипофиз сазана индуцировал созревание только высокочувствительных ооцитов (№ 10). Гипофиз камбалы и в этом случае оказался неэффективен, хотя он и вызывал слабый ответ у лягушки (№ 7). По-видимому, повышение чувствительности фолликулов к своему гонадотропину распространяется только на некоторые его гетерологичные формы, допустимые специфичностью реагирующей системы. Во всяком случае для обнаружения гонадотропинов рыб *in vitro* необходимо отбирать лягушек с высокочувствительными фолликулами.

Сравнение двух партий гипофизов. Была проверена возможность количественной оценки активности гипофизов по реакции созревания ооцитов жабы. Две партии желез (осетра и севрюги) сравнивали раз-

ными методами: на вьюне и по реакции ооцитов. При тестировании на вьюнах активность гипофиза сеvрюги оказалась примерно в 2 раза выше, чем у осетра (табл. 3). Эти же препараты испытывали в опытах *in vitro* (табл. 4).

Таблица 3
Активность двух партий гипофизов при тестировании на вьюнах

Вид гипофиза	Доза введенного гипофиза, мг				
	0,7—0,5	0,4—0,3	0,25—0,20	0,12—0,1	0,05
Осетр	$\frac{6}{0}$	$\frac{10}{1}$	$\frac{4}{6}$	$\frac{0}{6}$	$\frac{0}{1}$
Сеvрюга	$\frac{3}{0}$	$\frac{2}{0}$	$\frac{7}{2}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{0}{6}$

Примечание. В числителе — количество овулировавших самок; в знаменателе — отрицательный ответ.

В первых двух опытах по предельным реагирующим разведениям и по проценту созревших клеток сеvрюжий гипофиз действовал несколько активнее осетрового. В следующих двух, наоборот, гипофиз осетра был не менее, чем в 2 раза эффективнее сеvрюжьего. Наконец, фолликулы самки № 5 не обнаружили различий между ними.

Таким образом были получены противоречивые результаты и оттестировать активность гипофизов по реакции созревания ооцитов было невозможно.

Чтобы получить представление о точности метода, мы совместно с Л. Г. Лошаковой исследовали устойчивость процента созревания ооцитов в пяти параллельных постановках (табл. 5). Эксперименты выполнены на двух самках лягушки, первая из которых давала высокий процент созревания *in vitro*, а вторая слабо отвечала на гормоны. Созревание индуцировали прогестероном (ПГ 5 γ /мл), гипофизом лягушки (Г 0,005 шт./мл) и смесью этих перапаратов (ПГ 5 γ /мл + Г 0,005 шт./мл).

Таблица 4
Сравнение двух партий гипофизов: осетра и сеvрюги—по реакции созревания ооцитов жабы (в %)

Апрель	Концентрация гипофиза, мг/мл								Контроль
	0,2	0,1	0,05	0,025	0,012	0,006	0,003	0,001	
11	—	100	84	56	24	0	0	0	0
		100	95	51	10	14	0	0	
12	—	76	28	2	0	0	0	0	0
		92	54	0	2	0	0	0	
16	90	100	91	44	12	0	0	0	0
	93	82	33	4	0	0	0	0	
20	85	94	98	77	78	9	0	0	0
	76	94	82	52	0	—	0	0	
24	92	91	80	74	32	12	0	0	0
	97	93	92	59	31	20	0	0	

Примечание. В числителе — осетр; в знаменателе — сеvрюга.

Устойчивость созревания ооцитов лягушки
(ПГ — прогестерон 5 γ /мл; Г — гипофиз лягушки 0,005 шт/мл)

Индуктирующие препараты	Повторности									
	1		2		3		4		5	
	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%
Первая самка										
ПГ	34	91,9	43	87,7	48	94,1	46	93,9	44	89,8
	37		49		51		49		49	
ПГ+Г	45	98,0	41	87,2	45	100,0	47	97,9	43	91,5
	50		47		46		48		47	
Г	41	93,2	47	90,4	45	90,0	36	87,8	39	95,1
	44		52		50		41		41	
Раствор Рингера	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	52		36		40		40		41	
Вторая самка										
ПГ	0	0,0	0	0,0	5	11,1	2	4,3	3	7,5
	42		32		45		46		40	
ПГ+Г	12	28,6	7	16,6	7	15,5	16	36,4	20	45,4
	42		42		45		44		44	
Г	1	2,2	0	0,0	0	0,0	2	5,4	2	4,8
	46		47		37		37		42	
Раствор Рингера	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	40		40		40		40		40	

Примечание. В числителе — количество созревших клеток; в знаменателе — количество клеток в пробе.

Из данных табл. 5 видно, что при высокой чувствительности фолликулов (первая самка) ответы колебались для ПГ — от 87,7 до 94,1%, для ПГ+Г — от 87,2 до 100%, для Г — от 87,8 до 95,1%. Максимальное расхождение величин для ПГ+Г—12,8%, т. е. устойчивость результатов высокая. Фолликулы второй самки ответили на ПГ — от 0 до 11%, на ПГ+Г — от 15 до 45,4% и на Г — от 0 до 5,4%.

В данном случае вариабельность значительно выше: для ПГ+Г—29,9%. Так как при тестировании учитывали предельные или близкие к ним разведения гипофизов, вызывавшие созревание только части клеток, ошибка могла достигать 30%. В опытах с каждой самкой разведения готовили запово, что вносило дополнительные погрешности. При сравнении экспериментов с первой и второй самками неясно, можно ли рассматривать отдельные яйцеклетки в опыте как самостоятельные тест-единицы и не взаимодействуют ли они при созревании.

Выводы

1. Фолликулы зеленой жабы и озерной лягушки чувствительны к гонадотропинам осетровых и обнаруживают их в концентрации 0,006 мг/мл вещества гипофиза. Реакция созревания может быть использована также для выявления гонадотропина сазана. Гипофизы горбуши, лобана, сингиля, камбалы-калкана слабо, а бычка-кругляка вовсе не индуцируют созревания. Возможно, для проявления их действия необходимы дополнительные условия. Показано, например, что эффективность созревания ооцитов выюна в значительной степени зависит от рН среды (Скоблина, 1973).

2. Количественно оценить активность гипофизов не удалось, что объясняется, очевидно, неустойчивостью процента созревания ооцитов при значительных разведениях гонадотропинов и погрешностями, связанными с их приготовлением. Необходимо стандартизировать условия эксперимента и ставить в зоне пороговых концентраций несколько параллельных опытов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Алпатов В. В. и Строганов Н. С. Новая единица измерения активности гипофиза у рыб. — ДАН СССР, 1950, т. 74, № 2, с. 405—407.
- Баранникова И. А. Локализация гонадотропного гормона в гипофизе севрюги (*Acipenser stellatus* Pall.). — ДАН СССР, 1949, т. 69, № 1, с. 117—120.
- Гербильский Н. Л. Современное состояние и перспективы метода гипофизарных инъекций в рыбоводстве. — «Труды лаборатории основ рыбоводства», 1947, т. 1, с. 5—24.
- Гончаров Б. Ф. Зависимость величины гормонозависимого периода созревания фолликулов травяной лягушки от разведения суспензии гипофизов. Новый метод тестирования гипофизов. — «Онтогенез», 1971, т. 2, № 1, с. 64—70.
- Гончаров Б. Ф. Изучение закономерностей перехода ооцитов амфибий и осетровых рыб от роста к созреванию. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата наук. М., 1971, 27 с.
- Гончаров Б. Ф. Опыт определения гонадотропной активности гипофиза осетровых рыб, по реакции созревания ооцитов *in vitro*. — В кн.: «Осетровые и проблемы осетрового хозяйства». Под ред. Ю. Ю. Марти и И. Ф. Баранниковой. М., 1972, с. 257—262.
- Казанский Б. Н. К вопросу о таксономической специфичности гонадотропного гормона у рыб. — ДАН СССР, 1940, т. 27, № 2, с. 40—43.
- Казанский Б. Н. Выюновая единица (ВЕ) для измерения гонадотропной активности препаратов гипофиза рыб. — «Труды лаборатории основ рыбоводства», 1949, т. 2, с. 29—36.
- Казанский Б. Н. и Нусенбаум Л. М. Выюн (*Misgurnus fossilis* L.) как объект для определения гонадотропной активности препаратов гипофиза рыб. — «Труды лаборатории основ рыбоводства», 1947, т. 1, с. 111—120.

- Скоблина М. Н. Созревание ооцитов вьюна *in vitro* под влиянием хориогонина — «Онтогенез», 1973, т. 3, № 3, с. 309—311.
- Травкин Б. Г., Боев А. А. Опыт определения гонадотропной активности гипофизов различных видов рыб с помощью тест-объектов. — В сб.: «Современное состояние метода гипофизарных инъекций». Астрахань, 1969, с. 71—78.
- Фалеева Т. И. Методическое указание по сбору и обработке гипофизов рыб, как препарата для гипофизарных инъекций. М., «Знание», 1968. 16 с.
- Bagg, W. A. Pattern of ovarian activity. *Perspectives in Endocrinology*, 1968, 168—232.
- Fontaine, Y. A., Salmon, C., Fontaine-Bertrand, E., Burzawa-Gerard, E., Donaldson, E. M. Comparison of the activities of two purified fish gonadotropins on adenylcyclase activity in the goldfish ovary. *Canad. J. Zool.* v. 50, N 12, 1972, 1673—1676.
- Masui, Y. Relative roles of the pituitary, follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* v. 166, 1967, 363—376.
- Pickford, G. E. and Atz, J. W. The physiology of the pituitary gland of fishes. *New York Zool. Soc. N. Y.*, 1957.
- Schuetz, A. W. Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (*Rana pipiens*) oocytes. *J. Exptl. Zool.* v. 166, 1967, 347—354.
- Thornton, V. F. A bioassay for progesterone and gonadotropins based on the meiotic division of *Xenopus* oocytes *in vitro*. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, v. 16, 1971, 599—605.
- Wright, P. A. Factors affecting *in vitro* ovulation in the frog — I. *Exptl. Zool.* v. 100, 1945, 565—575.
- Wright, P. A. Non-specificity of pituitary induced anuran ovulation *in vitro*. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* v. 104. 1960, 77—79.
- To the assessment of gonadotropic activities of hypophyses of fish judging from maturation of oocytes

V. S. Apekin

SUMMARY

Hypophyses of eight species of fish investigated may be divided into four groups judging from their capacities to induce maturation of oocytes of the green toad (*Bufo viridis*): highly-active (sturgeon); active (carp); low active (pink salmon, large mullet, shad, turbot and flounder) and inactive (round goby). Due to the fact that the maturation rate of oocytes was unstable when the hypophysis was strongly diluted the quantitative estimate of its activity by the maturation response could not be obtained.