

УДК 597.593.4:597—116

О РЕАКЦИИ ООЦИТОВ КЕФАЛЕЙ НА ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ IN VITRO

Апекин В. С., Гнатченко Л. Г.

Для успешного индуцирования созревания и нереста самок рыб необходимо знать чувствительность ооцитов к гормонам, а также определить дозу гормонального препарата, которая была бы адекватна состоянию реагирующей системы — половой железы. В экспериментах на земноводных и осетровых рыбах показано, что о возникновении чувствительности ооцитов к гормонам можно судить по их созреванию в системе *in vitro* (Гончаров, 1971; Wright, 1945 и др.).

В последние годы освоено культивирование и получены зрелые ооциты некоторых костистых рыб: медаки *Orizias latipes* (Hirose, 1971), радужной форели *Salmo gairdnerii*, карпа *Carassius auratus* (Ialabert, Bry, Szolossi, Fostier, 1973) и вьюна *Misgurnus fossilis* (Скоблина, 1973).

В связи с разработкой биотехники стимулирования созревания и нереста черноморских кефалей (лобан, сингиль) исследовали возможность применения системы созревания ооцитов кефалей *in vitro* при оценке чувствительности самок к гормональным препаратам до и после инъекции.

Опыты проводили на самках кефалей — лобана *Mugil cephalus* и сингиля *Mugil auratus* с половыми железами в IV стадии зрелости. Ооциты брали от забитых самок и от экспериментальных рыб (щупом) до инъекции гипофиза и через разные промежутки времени после инъекции. Кусочек яичника сразу переносили в свежеприготовленный раствор Рингера для морских рыб, содержащий 0,1% кристаллического альбумина (Скоблина, 1968) или 10% бычьей сыворотки (Hirose, 1971). В среду добавляли антибиотики: 1 млн. ед. пенициллина и 250 тыс. ед. стрептомицина на 1 л; pH среды доводили до 7,9—8,2. Ооциты разделяли специальными петлями на кусочки, содержащие 2—10 ооцитов, и помещали в маленькие чашки Петри. Инкубировали клетки в специально изготовленном термоящике при температуре $20 \pm 1^\circ \text{C}$.

В каждом опыте участвовало по 30—50 клеток; контролем служили ооциты, которых культивировали в тех же условиях, но без гормона. Для стимулирования созревания лобана и сингиля *in vivo* применяли свежие гипофизы лобана и заготовленные Главрыбводом, ацетонированные гипофизы сазана с активностью 1 мг — 3,33 л. ед. При исследовании чувствительности ооцитов кефалей в опытах *in vitro* применяли вытяжку ацетонированных гипофизов сазана (одной партии) с исходной концентрацией 10 мг/мл сухого вещества.

Для оценки реакции ооцитов на действие гормонов *in vitro* в качестве критериев использовали следующие последовательные состояния (фазы), выделенные визуально на основании анализа изменений в созревающих ооцитах кефалей (Апекин, 1973): желтковые ооциты (ЖО); начало укрупнения жировых капель (НЖК); жировых капель более 10 (более 10 ЖК); жировых капель 5—10 (5—10 ЖК); жировых капель 2—4 (2—4 ЖК); одна жировая капля (1 ЖК); гомогенный ооцит (ГО)*.

Наиболее трудно отметить начало укрупнения жировых капель. Для дополнительной оценки этого переходного состояния и последующих фаз введен еще один критерий — диаметр жировых капель на препаратах давленных клеток. Для этого 10 или более ооцитов, помещенных в каплю физиологического раствора на предметное стекло, раздавливали покровным стеклом, под бинокляром (увеличением 7×8) измеряли диаметр одной самой крупной жировой капли в содержимом каждого из ооцитов, а затем вычисляли средние значения.

Степень действия гормона определяли по процентному соотношению клеток разных состояний по сравнению с исходными и контрольными ооцитами.

Чувствительность ооцитов интактных самок. В предварительных экспериментах было установлено, что ооциты сингиля как *in vivo*, так и *in vitro* удовлетворительно отвечают на действие гипофизов сазана. Для определения диапазона концентраций, в которых исходные ооциты могут реагировать на гонадотропины сазана, были выполнены опыты с 22 интактными самками сингиля. Из приведенных в табл. 1 данных видно, что среди интактных самок сингиля присутствуют самки с желтковыми ооцитами, диаметр жировых капель которых составляет менее 14—17 мкм; с ооцитами в фазе «НЖК» диаметр капель 38 мкм и в фазе «более 10 ЖК» с диаметром жировых капель 52 мкм. После 36 ч инкубации таких клеток в растворе Рингера их состояние не изменилось. Это было выявлено как визуально, так и при измерении диаметра жировых капель.

После культивирования с гипофизом состояние самых мелких из испытанных ооцитов (диаметром 477 мкм) не отличалось от контрольных. Во всех остальных случаях под действием гормона в ооцитах произошли закономерные изменения, выраженные в разной степени. У части самок они незначительны: укрупнение жировых капель до фазы «более 10 ЖК» диаметром до 112 мкм. В остальных случаях образовалось до 2—4 и в одном случае — одна жировая капля; диаметр жировых капель увеличился до 210 мкм. В этом состоянии процесс останавливался, и при более длительном культивировании (более 48 ч) ооциты начинали деградировать, что выражалось в отслоении оболочек и образовании каверн. Уровень ответа зависит и от концентрации гонадотропинов. Наибольшие изменения наблюдали в концентрациях гормона 0,2, 0,05 мг/мл. При этом доза в 0,2 мг/мл иногда оказывалась менее эффективной, чем в 0,05 мг/мл, в частности, для самок, у которых жировые капли в ооцитах были более крупными.

Распределение ооцитов 22 самок по уровню их реакций показано на рис. 1. Уровень ответа определяли по наибольшему числу клеток (не менее 50%), отнесенных к данной фазе. Не ответили или ответили слабо ооциты диаметром 477 и 490 мкм. Можно предполагать, что они не достигли еще дефинитивного состояния. У большинства самок про-

* Указанные состояния, как это видно из рисунка статьи В. С. Апекина, Г. А. Вальтер, Л. Г. Гнатченко, опубликованной в данном сборнике, четко отличаются друг от друга. Поскольку осеменение яиц, полученных *in vitro*, не проводили, фаза «ЗЯ» (зрелые яйца) заменена здесь фазой «ГО» (гомогенного ооцита).

Реакция ооцитов интактных самок сингиля в различных концентрациях гипофиза сазана

Номер самки	Исходное состояние ооцитов			Концентрация гипофиза, мг/мл	Число клеток в опыте	Результаты культивирования, %						диаметр жировых капель, мкм	
	диаметр ооцитов, мкм	фаза	диаметр жировых капель, мкм			ЖО	НЖК	более 10 ЖК	5—10 ЖК	2—4 ЖК	1 ЖК		
1	477	ЖО	<14	0,2	36	100							14
				0,05	40	100							14
				Контроль	30	100							14
640	497	ЖО	14	0,2	31		19	81					95
				0,05	52		13	87					113
				0,01	36		42	58					88
				0,003	39	100							31
				Контроль	33	100							21
631	500	ЖО	17	0,2	31				68	32			186
				0,05	41				88	12			168
				0,01	39			31	69				187
				0,003	38			79	21				84
				Контроль	56	100							15
630	513	НЖК	38	0,2	31			9	29	62			157
				0,05	42				5	95			200
				0,01	38			10	16	74			155
				0,003	36				100				115
				Контроль	30		100						38
633	510	Более 10 ЖК	52	0,2	37				43	57			157
				0,05	59				5	93	2		218
				0,01	46				9	91			183
				0,003	40		7		63	30			189
				Контроль	48		100						53

цесс достиг фаз «более 10 ЖК» и «5—10 ЖК». У двух из трех рыб, ооциты которых отреагировали сильнее (до фазы «2—4 ЖК»), клетки уже исходно находились в фазах «НЖК» и «более 10 ЖК».

Чтобы рассмотреть возможную связь между уровнем ответа и некоторыми характеристиками самок (масса тушки, ГСИ), результаты разделили на две группы: 1 — отсутствие ответа или ответ до фазы «более 10 ЖК» (9 проб); 2 — ответ до фазы «5—10 ЖК» и «2—4 ЖК» (13 проб).

По суммарным вариационным рядам для каждой из групп построены кривые размеров ооцитов (рис. 2). Сравнимые группы очень близки по всем показателям, что, вероятно, указывает на морфологическую однородность исследуемого материала.

Наибольший интерес представляют крайние состояния ооцитов, отмеченные у интактных самок сингиля: клетки диаметром 477—490 мкм и ооциты с заметными признаками созревания. Для анализа яйцеклеток этих состояний необходимы дополнительные данные. Можно лишь утверждать, что желтковые ооциты сингиля, достигшие дефинитивного состояния, специфически отвечают на действие гипофизарных гонадотропинов укрупнением жировых капель. Это наблюдается и на ранних этапах созревания ооцитов.

Чувствительность ооцитов после инъекции. Интенсивность реакции ооцитов на гонадотропины сазана *in vitro* заметно изменяется, если самку предварительно сенсibilизировать гипофизами сазана. В табл. 2 приведены результаты эксперимента с самкой сингиля № 625, которая

в исходном состоянии имела желтковые ооциты. После 36 ч инкубирования с гормоном в них образовалось 5—10 жировых капель. Через 12 ч после введения самке 2 мг гипофиза ооциты *in vivo* несколько увеличились в диаметре и были определены как желтковые. В таких ооцитах, помещенных в раствор Рингера с гормоном, изменения в связи с созреванием были выражены много ярче, чем в ооцитах интактных самок (см. табл. 1 и рис. 1).

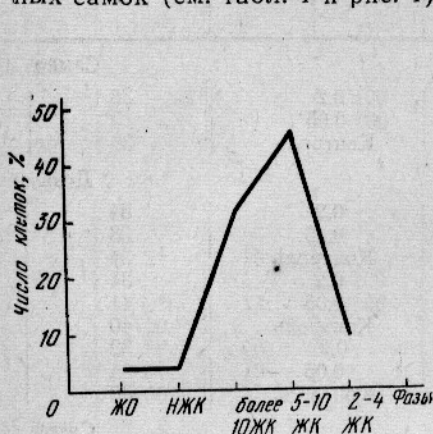


Рис. 1. Реакция ооцитов 22 самок сингиля в суспензии гипофизов сазана (0,05 мг/мл).

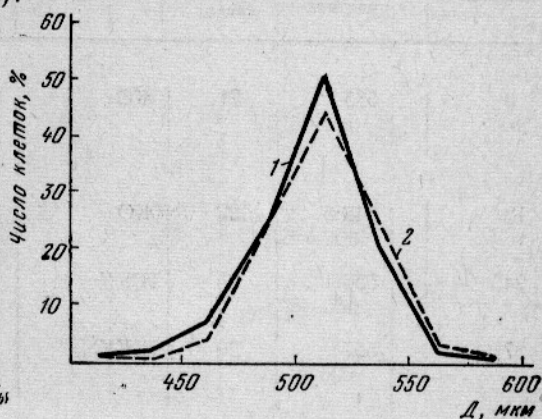


Рис. 2. Сравнение размерных вариационных рядов двух групп ооцитов, ответивших *in vitro* до фазы «более 10 ЖК» (1) и до фазы «5-10 ЖК» и «2-4 ЖК» (2).

Во всех клетках, находившихся в 0,05 мг/мл гипофиза, образовалась одна жировая капля; были хорошо выражены процессы гомогенизации желтка и гидратации, в результате чего диаметр ооцитов увеличился до 625—700 мкм. В контрольной пробе за время инкубации в яйцеклетках жировые капли укрупнились до фазы «НЖК» и «более 10 ЖК». Таким образом, реакция ооцитов *in vitro* отражает их чувствительность к гонадотропинам; морфологическая картина процесса может не соответствовать реактивности яйцеклетки. После введения подпороговой дозы чувствительность клеток нарастает, а затем снижается, при этом, вероятно, можно оценивать ее на разных этапах процесса. Наибольшей чувствительности ооциты достигают через 12 ч, а затем последовательно утрачивают ее.

В следующем эксперименте исследовали поведение ооцитов, взятых от самки сингиля № 664, которую инъецировали гипофизами сазана дважды (табл. 2). Исходные ооциты исследуемой самки были менее чувствительны, чем ооциты самки № 625, и в присутствии гормонов гипофиза *in vitro* жировые капли в них укрупнились до фазы «более 10 ЖК». После одной инъекции (2 мг) реакция ооцитов вне организма, взятых через 8—24 ч, несколько усилилась (до фазы «5-10 ЖК»), однако все еще отражала более низкий уровень чувствительности. Яйцеклетки, вынесенные *in vitro* через 32 ч после инъецирования, уже слабее реагировали на действие гонадотропинов — большая часть клеток (51%) находилась в фазе «НЖК». Таким образом, в первой части эксперимента, так же как и в опыте с ооцитами самки № 625, было заметно некоторое повышение реактивности клеток *in vitro*, а потом ее спад. За этот период в ооцитах началось слияние жира (фаза «НЖК») и диаметр жировых капель увеличился до 35 мкм.

Через 32 ч самке дополнительно ввели 5 мг гипофиза сазана. Эта доза в ряде случаев обеспечивает полное созревание самок. Через 8 ч

Реакция ооцитов сингиля in vitro на гипофиз сазана через разные

Продолжительность действия гипофиза, ч	In vivo			Концентрация гипофиза, мг/мл	Число клеток в опыте
	Состояние ооцитов				
	диаметр, мкм		Фаза		
	ооцитов	жировых капель			
					Самка
0	535	21	ЖО	0,2	38
				0,05	39
				Контроль	36
					Доза
12	548	22	ЖО	0,2	34
				0,05	38
				Контроль	34
24	558	25	НЖК	0,2	34
				0,05	41
				Контроль	40
37	557	20	НЖК	0,2	32
				0,05	54
				Контроль	30
					Самка
0	512,5	14	ЖО	0,05	46
				Контроль	32
					Доза
8	508,5	14	ЖО	0,05	38
				Контроль	31
16	504	14	ЖО	0,05	33
				Контроль	44
24	509	20	ЖО	0,05	30
				Контроль	33
					Доза
32	500,5	35	НЖК	0,05	35
				Контроль	47
40(8)*	509,5	63	НЖК	0,05	32
				Контроль	30
48(16)	510		НЖК— 5—10 ЖК	0,05	33
				Контроль	33
56(24)	522,5		НЖК— 2—4 ЖК	0,05	37
				Контроль	37

* В скобках — время после второй инъекции.

после второй инъекции ооциты в яичнике продолжали оставаться в фазе «НЖК». В клетках, вынесенных в это время из организма, в присутствии гормонов гипофиза жировые капли укрупнились до состояния «2—4 ЖК», а в контрольных ооцитах — до фазы «более 10 ЖК». Через 16 ч часть яйцеклеток в яичниках достигла фазы «5—10 ЖК». В таких ооцитах, помещенных в среды с гормоном, произошло слияние жира до одной капли (фаза «1 ЖК»). Клетки, взятые через 24 ч после инкубации как с гормоном, так и без него, не только достигли фазы «1 ЖК», но и заметно увеличились за счет гомогенизации желтка и гидратации. Часть ооцитов самки созрела и овулировала, а часть отстала в развитии. Группа отстающих клеток хорошо прослеживается и в опытах.

Таблица 2

промежутки времени после инъекции

In vitro							
Результаты культивирования, %							
ЖО	НЖК	более 10 ЖК	5-10 ЖК	2-4 ЖК	1 ЖК	диаметр, мкм	
						ооцита	жировых капель
№ 625							
100			100 100			525-550	
гипофиза 2 мг							
	21	79	100 56	37 30	63 100	625-650 625-700	
	100 87 81 100	14 13 19				525-550 525-550	
№ 664							
100		89	11				18
гипофиза 2 мг							
68	5 32 9	45 76	50 15				126 22 134
80	20 13 30	37	50				32 130 56
гипофиза 5 мг							
14	51	29	6				109
21	79						31
9		23	18	50			104
10	23	53	14				43
22		17		17	44	450-550	
9		34	22	22	13	450-550	
	65		7		28	575-700	
35		18	12		35	575-700	

Таким образом, реакция ооцитов *in vitro* отражает состояние ячника и изменение его состояния под действием гипофизарных инъекций. Уровень реакции ооцитов *in vitro* может служить показателем чувствительности яйцеклеток к гипофизарным гормонам.

Мы сопоставили результаты опытов *in vivo* и *in vitro* с 32 самками лобана. Самок инъецировали свежими гипофизами лобана в дозах до 60 мг на самку. Щуповые пробы брали дважды, через 12-16 и 23-26 ч после инъекции. В зависимости от уровня реакции всех рыб подразделили на три группы. К первой группе отнесли рыб, созревание которых завершилось полностью и в ряде случаев были получены икра и личинки, ко второй группе — созревание которых остановилось на фазе «1 ЖК», и к третьей группе — не прореагировавших на гормо-

нальный стимул. В опытах *in vivo* и *in vitro* получены близкие результаты. Ооциты созревающих самок (7 шт.), вынесенные *in vitro* через 12—16 ч после инъекции гипофиза, созревали далее в культуре под действием гонадотропинов вплоть до овуляции. В контрольных чашках без гормона процесс останавливался. Если созревание в яичниках самок останавливалось на фазе «1 ЖК» (8 шт.), процесс прерывался и *in vitro*. У самок, не ответивших на гипофизарные инъекции (17 шт.), не отмечено никаких изменений ооцитов и *in vitro*, взятых в опыт как через 12—16 ч, так и через 23—26 ч после инъекции.

Таким образом, по созреванию ооцитов *in vitro* можно судить о подготовленности самок к нересту, о чувствительности яичников к гонадотропинам и заранее отбирать самок, пригодных для эксперимента.

Выводы

1. Ооциты интактных самок сингиля, помещенные *in vitro*, отвечают на действие гормона укрупнением жировых капель от фазы «НЖК» до фазы «2—4 ЖК». Уровень реакции половых клеток зависит от их исходного состояния.

2. Изменения, происходящие в ооцитах самок сингиля после сенсбилизации, завершаются *in vitro* гомогенизацией желтка и гидратацией клеток. Наблюдение за поведением ооцитов позволяет судить о степени и характере изменений в яичниках опытных самок.

3. Соответствие изменений, наблюдаемое в параллельных опытах *in vivo* и *in vitro* на ооцитах лобана под действием гормональных препаратов, позволяет отбирать самок для стимулирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Апекин В. С. Регуляция созревания и нереста в связи с проблемой искусственного воспроизводства морских рыб. — «Тезисы докладов Второй конференции по экологической физиологии рыб». М., 1973, с. 84—86.

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.

Скоблина М. Н. Созревание кортекса безъядерных ооцитов лягушки и сеuryги под влиянием гонадотропных гормонов гипофиза. — «ДАН СССР», 1968, т. 183, вып. 4, с. 982—984.

Скоблина М. Н. Созревание ооцитов выюнов под влиянием хориогонина. — «Онтогенез», 1973, № 3, с. 309—311.

Jalabert B., Bry C., Szöllösi D., Fostier A. Etude comparée de l'action des hormones hypophysaires et stéroïdes sur la maturation *in vitro* des oocytes de la truite et du carassin (poissons téléostéens). *Am. biol. anim. biochim., biophys.* 13, 1973, p. 59—72.

Hirose K. Biological study on ovulation *in vitro* of fish. I. Effects of pituitary and chorionic gonadotropins on ovulation *in vitro* of Medaka, *Oryzias latipes*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 37 (7), 1971, p. 585—591.

Wright P. A. Factors affecting *in vitro* ovulation in the frog. *J. Exp. Zool.* 100, 1945, p. 565—575.

On response of oocytes of mullet to hormonal drugs in vitro

V. S. Apekin, L. G. Gnatchenko

SUMMARY

The oocytes of intact females of mullet respond to gonadotropins of carp by enlarged lipid droplets. The intensity of the process is dependent upon the initial state of females. Knowing the response of oocytes of mullet *in vitro* after the injection is made it is possible to predict maturation of females judging from the extent and character of changes in the ovaries of the fish tested.