

УДК 597.593.4:597—116

О СОЗРЕВАНИИ ООЦИТОВ КЕФАЛЕЙ IN VITRO ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИПОФИЗОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ И ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА

Гнатченко Л. Г.

При выборе гипофизарного препарата для стимулирования созревания рыб необходимо учитывать зоологическую специфичность гонадотропинов, которая установлена как для грубых экстрактов гипофизов (Pickford, Atz, 1957; Baag, 1968), так и для очищенных препаратов (Fontaine et al., 1972; Burzawa—Gerard, 1974).

В настоящее время созревание кефалей индуцируют гипофизами кефалей (Tang, 1964; Апекин, Тронина, 1972), сазана (Yashouv, 1969), лосося (Shehadeh et al., 1973; Kuo et al., 1974), хорионическим гонадотропином человека (Kuo et al., 1973).

Оценить чувствительность ооцитов кефалей к гормонам можно по их реакции в системе in vitro (см. статью В. С. Апекина, Л. Г. Гнатченко в данном сборнике). В предлагаемой работе сравнивали действие различных концентраций гипофизов кефалей, осетра, сазана и хорионического гонадотропина человека на созревание in vitro ооцитов сингиля (*Mugil auratus* R.) и лобана (*Mugil cephalus* L.).

Свежие гипофизы кефалей собирали от самок с гонадами на IV стадии зрелости; гипофизы осетра и сазана получали от Главрыбвода. В опытах использовали препарат хориогонина фирмы «Гедеон Рихтер» (Венгрия). Суспензию гипофизов готовили на 0,65% NaCl.

Самок сенсibilизировали гипофизарными препаратами и забивали через 24—28 ч после инъекции, когда ооциты сингиля достигали размеров 525—530 мкм, ооциты лобана — 520—525 мкм в фазах «5—10 ЖК»—«1 ЖК». Состояние яйцеклеток определяли на основании анализа шуповых проб согласно выделенным визуальным критериям созревания кефалей in vivo (Апекин, 1973).

Ооциты инкубировали в растворе Рингера для морских рыб. В среду добавляли яичный альбумин и антибиотики (Скоблина, 1970); pH раствора довели до 8,0—8,2. Кусочки яичника помещали в свежеприготовленный раствор и разделяли петлями на фрагменты по 5—15 фолликулов в каждом; 80—100 яйцеклеток переносили в чашку Петри с 5 мл раствора, содержащего определенное количество препарата и инкубировали 24 ч при температуре $20 \pm 1^\circ \text{C}$.

Реакцию ооцитов на действие гормонов оценивали по проценту клеток, в которых завершилось растворение желточных гранул и которые в результате оводнения достигли размера зрелых яиц.

Опыт проводили на ооцитах сингиля, в которых происходило слияние жировых капель, а гомогенизация желтка еще не началась. Сред-

ный диаметр клеток составлял 525 мкм. За 24 ч инкубации в присутствии гормонов во всех ооцитах жировые капли слились в одну, у части клеток полностью завершились гомогенизация и гидратация и они достигли размеров зрелых яиц — 750—775 мкм. Такие яйцеклетки прозрачны, легко отличаются от клеток других состояний. При культивировании в среде без гормонов была отмечена некоторая инерция созревания — в большинстве ооцитов завершилось образование одной капли, у 3% — наблюдали частичную гомогенизацию желтка. Однако средний диаметр клеток в контроле не превышал 525 мкм.

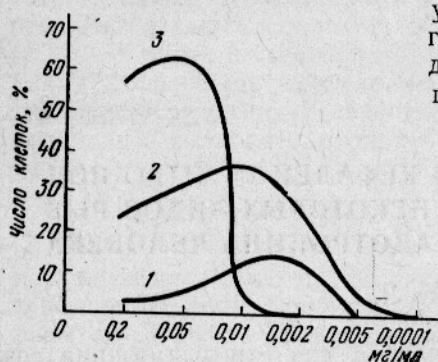


Рис. 1. Созревание ооцитов сингиля под действием различных концентраций гипофизов сингиля, осетра и сазана:

1 — азетонированный гипофиз сазана; 2 — свежий гипофиз сингиля; 3 — азетонированный гипофиз осетра.

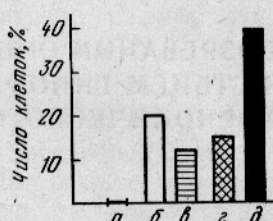


Рис. 2. Созревание ооцитов сингиля в присутствии хориогонина, гипофиза сазана и их смесей:

а и б — 10 и 50 ед./мл хориогонина соответственно; в — 0,003 мг/мл гипофиза сазана; г — 10 ед./мл хориогонина и 0,003 мг/мл гипофиза сазана; д — 50 ед./мл хориогонина и 0,003 мг/мл гипофиза сазана.

Результаты опытов с различными концентрациями суспензии гипофизов сингиля, осетра и сазана представлены на рис. 1. При рассмотрении кривых видно, что реакция четко зависит от концентрации гипофиза. В присутствии гипофиза своего вида максимальный ответ получен при действии 0,01 мг/мл (37%). При уменьшении концентрации количество созревших клеток постепенно снижается. Дозы гипофиза 0,003 мг/мл и ниже стимулировали созревание от 13 до 2% клеток. С увеличением концентрации реакция ооцитов также ослабевает. В гипофизе осетра наиболее сильную реакцию наблюдали при дозе 0,05 мг/мл (65%). С увеличением концентрации количество созревших клеток уменьшилось до 45%. Разведение гипофиза ниже 0,05 мг/мл резко снизило ответную реакцию по сравнению с действием гипофизов сингиля и осетра. Гипофизы сазана даже в оптимальных концентрациях стимулировали созревание только у 16% клеток.

На ооцитах этой же самки исследовали действие хорионического гонадотропина человека в дозах 10 и 50 м. е./мл. Из них только доза 50 м. е./мл вызвала созревание части клеток (22%) (рис 2). Опробована также смесь хориогонина и гипофиза сазана. При действии 10 м. е./мл в сочетании с концентрацией гипофиза 0,003 мг/мл получен ответ, подобный тому, какой получен при соответствующей дозе гипофиза. Смесь 50 м. е./мл хориогонина с 0,003 мг/мл гипофиза оказалась более эффективной, чем каждый из препаратов в отдельности — созрело 40% клеток.

Различные концентрации гипофизов были испытаны также на ооцитах лобана (рис. 3). После сенсibilизации самки средний диаметр клеток, находящихся в фазах «2—4 ЖК» — «1 ЖК», достигал 520 мкм.

In vitro под действием гормонов диаметр ооцитов, так же как и у сингиля, увеличился до 680—720 мкм и они стали прозрачными. В контрольных опытах средний диаметр клеток не изменился (до 520 мкм).

Самую сильную реакцию наблюдали в 0,1 мг/мл гипофиза осетра (95%). В суспензии гипофиза лобана ответ был слабее. Концентрация гипофиза 0,01 мг/мл стимулировала созревание у 51% клеток. Но кривая, отражающая опыт с гипофизом своего вида, более пологая, чем для гипофиза осетра. Гипофиз сазана был наименее эффективен и вызвал созревание только у 16% клеток.

Хориогонин в дозе 10 ед./мл в опыте с ооцитами лобана в отличие от сингиля оказался более действенным—созрело 10% клеток (рис. 4), в дозе 50 ед./мл — несколько выше — 16%. Смесь 10 ед./мл хориогонина с 0,02 мг/мл одного из трех образцов гипофизов лобана, осетра

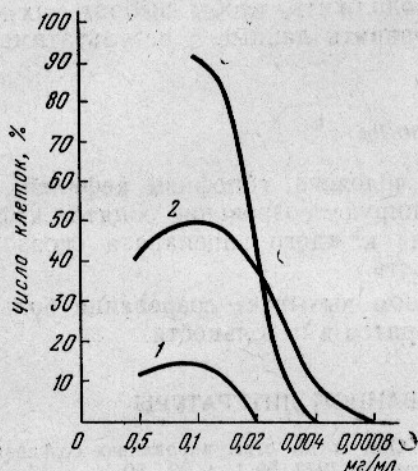


Рис. 3. Созревание ооцитов лобана под действием различных концентраций гипофизов лобана, осетра и сазана:

1 — ацетонированный гипофиз сазана; 2 — свежий гипофиз лобана; 3 — ацетонированный гипофиз осетра.



Рис. 4. Созревание ооцитов лобана в присутствии хориогонина, гипофизов лобана, осетра, сазана и их смесей:

а — 10 ед./мл хориогонина; б, в и г — 0,02 мг/мл гипофиза сазана, лобана и осетра соответственно; д, е и ж — 10 ед./мл хориогонина и 0,02 мг/мл гипофиза лобана, осетра и сазана соответственно.

или сазана вызвала созревание у 83, 75 и 66% клеток соответственно. Как видно, реакции на смесь препаратов намного выше, чем на каждый в отдельности.

При сравнении результатов опытов с ооцитами лобана и сингиля видно, что, несмотря на испытание различных разведений, характер кривых сходен. Гипофизы осетра дают самую сильную реакцию, но диапазон эффективных доз относительно узок. Дозовые кривые собственных гипофизов и гипофизов сазана характеризуются более широким диапазоном концентраций, способных вызвать заметную реакцию. Гипофизы сазана наименее активны. Разная активность исследуемых гипофизов, оцениваемая по уровню ответа и диапазону реагирующих доз, по-видимому, объясняется проявлением видовой специфичности гонадотропинов данных видов рыб. Более высокий процент созревания яйцеклеток в гипофизе осетра в сравнении с собственными гипофизами обнаружен Б. Ф. Гончаровым в 1971 г. в опытах in vitro на ооцитах лягушки. Снижение реакции с увеличением концентрации гипофиза выше

0,1 мг/мл возможно связано с ухудшением условий инкубации из-за избытка белка в инкубационной среде, или проявлением тормозящего действия больших доз гонадотропинов на процесс созревания половых клеток (Гончаров, 1971).

Как было показано выше, хориогонин стимулирует созревание ооцитов сингиля и лобана *in vitro*. Куо с сотрудниками сообщил об успешном применении этого препарата для индуцирования созревания лобана *in vitro* (Kuo et al., 1973). Сочетание хориогонина с гипофизами стимулировало созревание гораздо большего числа клеток, чем каждый из них в отдельности. Такой эффект, по-видимому, вызывается их синергидным действием. Реакция усиливается только при определенном соотношении гормонов и зависит от состояния ооцитов. Сравнительный анализ гонадотропных препаратов в системе созревания ооцитов кефалей *in vitro* интересно продолжить, чтобы выбрать их оптимальные соотношения и дозы и сравнить данные с результатами, получаемыми *in vivo*.

Выводы

1. Хорионический гонадотропин человека, гипофизы кефалей, осетра и сазана в разной степени индуцируют созревание ооцитов кефалей *in vitro*. Дозозависимые кривые для каждого препарата позволяют сравнивать между собой их активность.

2. Смесь хориогонина с гипофизом вызывает созревание большего числа клеток, чем каждый из препаратов в отдельности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Апекин В. С., Тронина Т. М. Опыты по стимулированию созревания и нереста кефали. — «Гидробиологический журнал», 1972, № 1, с. 82—89.
- 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. Изучение закономерностей перехода ооцитов амфибий и осетровых рыб от роста к созреванию. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. М., 1971.
- Скоблина М. Н. Экспериментальное изучение роли ядра в процессе созревания ооцитов амфибий и осетровых рыб. — Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. М., 1970.
- Barr W. A. Pattern of ovarian activity. In: Perspectives in Endocrinology, London, and New York, 1968, p. 163—232.
- Burzawa—Gerard E. Etude biologique et biochimique de l'hormone gonadotrope d'un poisson téléostéen, la carpe (*Cyprinus carpio* L.). Mem. Mus. nat. hist. natur., A84, 1974, pp. 77.
- Comparison of the activities of two purified fish gonadotropins on adenylyl cyclase activity in the goldfish ovary. Can. J. Zool., 50, N 12, 1972, p. 1673—1676.
- Fontaine Y. A., Salmon C., Fontaine B. E., Burzawa—Gerard E., Donaldson E. M.
- Kuo C. M., Shehadeh Z. H., Nash C. E. Induced spawning of captive grey mullet (*M. cephalus* L.) females by injection of human chorionic gonadotropin (HCG). Aquaculture. v. 1, 4, 1973, pp. 429—432.
- Kuo C. M., Nash C. E., Shehadeh Z. H. Procedural guide to induced spawning in grey mullet (*M. cephalus* L.). Aquaculture, v. 3, N 1, 1974, pp. 1—14.
- Pickford C. E., Atz Y. W. The physiology of the pituitary gland of fishes, New York Zool. Soc. New York, 1957, pp. 610.
- Shehadeh Z. H., Kuo C. M., Millisen K. K. Induced spawning of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) with fractionated salmon pituitary extract. J. Fish. Biol. Ser. A. 1973, pp. 471—478.
- Tang Y. A. Induced spawning of striped mullet by hormone injection. Jap. J. Ichthyol., 12 (1/2), 1964, pp. 23—28.
- Yashouv A. Preliminary report on induced spawning of *M. cephalus* (L.) reared in captivity in freshwater ponds. Bamidgah, 21, 1969, pp. 19—24.

On ripening of oocytes in vitro under the influence of hypophyses of some species of fish and chorionic human gonadotropin.

L. G. Gnatchenko

SUMMARY

The effect of fresh homoplastic hypophyses and those stored in acetone, as well as chorionic human gonadotropin and hormonal mixture on maturation of oocytes of mullet (*Mugil auratus* R. and *M. cephalus* L.) in vitro is investigated. The hypophyses of sturgeon induce a strong response of oocytes, but the range of effective doses is relatively narrow. It is much wider in their own hypophyses and those of carp. The activity of carp hypophysis is the lowest. Some oocytes ripened under influence of choriogonin. The mixture of choriogonin and hypophyses is the most effective. The effective response may be obtained, however, at a certain ratio of hormones and depends on the state of oocytes.