

Gnutchenko L. G.

SUMMARY

Responses of oocytes of grey mullet to the same dose of the pituitary of carp in vitro were investigated in the migration period of females through the Strait of Kerch from the Azov Sea to the Black Sea. It is shown that the sensitivity of sexual cells to gonadotropins is not the same within the spawning season. Specimens with distinctly displayed responses migrate at the beginning and end of the spawning run which seems to be associated with the heterogeneous composition of the population. Responses of cells to gonadotropins in vitro are also investigated with regard to their mean size. A positive relation between the magnitude of a response of oocytes and their mean diameter is ascertained in the first half of the migration run. The relation is less distinctly seen in the second part of the run because all females become highly sensitive to gonadotropins regardless the size of cells.

УДК 597.593.4:597—114.7

**О ЗООЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
ГИПОФИЗАРНЫХ ГОНАДОТРОПИНОВ
ЧЕРНОМОРСКОЙ КЕФАЛИ-ЛОБАНА (*Mugil cephalus* L.)**

Н. А. Белая (ВНИРО)

В связи с разработкой методов устойчивого получения зрелых половых продуктов рыб путем гипофизарных инъекций необходимо знать не только состояние половых желез, но и гипофиза, регулирующего их деятельность. Лобан в этом отношении представляет особый интерес, так как для стимуляции его созревания и нереста используются гипофизы рыб этого же вида (Апекин, 1976).

Для определения гонадотропной активности гипофизов рыб наиболее широко используются методы тестирования in vivo: реакция спермиации амфибий (Алпатов и др., 1950), овуляции у вьюна (Казанский, Нусенбаум, 1947) и др. В последние годы для этой цели предложено применять также систему созревания ооцитов in vitro (Гончаров, 1971). Этот метод более чувствителен, чем выполненные на уровне организма.

При сравнении гонадотропинов представляет также интерес исследование степени их антигенного родства для суждения о биохимической специфичности гормонов разных видов (Breton et al., 1973).

В настоящей работе выясняется возможность оценки гонадотропной активности гипофиза лобана принятыми методами тестирования, а также проводится сравнение антигенных свойств гипофизарных гонадотропинов лобана и рыб других видов.

Работа выполнена на гипофизах самок лобана *Mugil cephalus* L. с гонадами в IV стадии зрелости. Рыб отлавливали в Керченском проливе во время хода на нерест в июне — августе 1974—1976 гг. Гипофизы консервировали в ацетоне (Фалеева, 1968). В работе использовали очищенные в лаборатории физиологии Музея естественной истории (Париж, Франция) гонадотропины карпов (Bg 2.276 1) и севриги (Bg 4—195 асг GTH и B 4.38A), ацетонированные гипофизы самок с гонадами в IV стадии зрелости следующих видов рыб: сазана, карпа, осетра, севриги, ската, камбалы-калкана, окуня, бычка-кругляка, сай-

ды, вьюна, белого амура, леща, белого толстолобика, а также хорионический гонадотропин (серия 8—76, активность 2200 ед/мг)¹.

Из гипофиза сазана в 1973 г. была приготовлена пудра, которую расфасовали и сохраняли в герметически закрытых пробирках на холоде. Этот препарат используется для стимуляции созревания и нереста кефалей, и исследование его активности представляет самостоятельный интерес.

Гонадотропную активность гипофиза лобана оценивали по следующим реакциям:

овуляция у вьюна *Misgurnus fossilis* (Казанский, Нусенбаум, 1947). Самки вьюна, использованные в опыте, были получены одной партией, до опытов их содержали при низких температурах. Средняя масса вьюнов 26,5 г. Проверку на овуляцию проводили через 24, 30 и 50 ч и дополнительно через 72 ч. Тестировали в январе — марте при температуре воды 19—20°C;

спермиация у травяной лягушки *Rana temporaria* (Алпатов, Строганов, 1950). Животных для эксперимента получили тремя партиями от одного заготовителя. Самцы были крупные, средней массой 40,1 г, до опыта содержались в аквариальной при низкой температуре. Накануне опыта их, так же как и вьюнов, переносили в лабораторию. Проверку на реакцию спермиации проводили через 2 ч. Тестировали в феврале — марте;

созревание *in vitro* ооцитов *Misgurnus fossilis* (Скоблина, 1973) и *Xenopus laevis* (Thornton, 1971). На каждую дозу использовали 100 ооцитов вьюна и 50 ооцитов лягушки. Ооциты вьюна культивировали при температуре 17—19°C, ооциты лягушки — при комнатной температуре. Через 24—30 ч учитывали число овулировавших клеток. Самки вьюнов были взяты из той же партии, что и для опытов *in vivo*. Тестирование проводили в марте — апреле.

Антигенное сходство препаратов исследовали методом иммунодиффузии в агаровом геле по Ухтерлони (Ouchterlony, 1958). Иммунные сыворотки были приготовлены к гонадотропинам осетра (Апекин, 1975), севрюги (Bg 4—195 асг GTN и B 4.38A), карпа (Bg 2.2761), к гипофизам осетра, сазана, бычка-кругляка, лобана. Иммунные сыворотки получали от шестимесячных самцов кроликов породы шиншилла. Животных иммунизировали в течение трех недель препаратами гонадотропинов или вытяжкой гипофизов в смеси со стимулятором Фрейнда (Людоговская, 1968). Спустя месяц кроликов реиммунизировали и через десять дней после этого собирали сыворотку. Готовые сыворотки были лиофилизированы и затем, как и все другие препараты, хранились на холоде. В качестве антигенов использовали растворы гонадотропинов в 0,85% NaCl в концентрации 0,1 мг/мл, а также надосадочную фракцию гомогенатов гипофизов. Техника постановки реакций описана В. С. Апекиным (1975).

Из данных табл. 1 видно, что гипофизы сазана и осетра в дозе 0,2 и 0,4 мг вызывают овуляцию у вьюна, при этом применение гипофиза осетра в дозе 0,2 мг давало уже 100% положительных ответов. Отрицательная реакция получена при инъекции вьюна гипофизом лобана, несмотря на использование большой дозы, превышающей дозы гипофиза сазана и осетра в 10 раз.

В табл. 2 приведены результаты тестирования препаратов на самцах лягушки. Реакцию спермиации индуцировали хорионическим гонадотропином, гипофизами сазана, осетра и лобана. Гипофизы сазана и осетра,

¹ Выражаем благодарность И. А. Баранниковой, Г. М. Персову, А. Б. Бурлакову и А. Я. Сторожику за предоставленные нам гипофизы ряда видов рыб, а также Б. Ф. Гончарову — за гонадотропины.

Таблица 1
Реакция овуляции у вьюна под действием
гипофизов сазана, осетра и лобана

Тестируемый препарат—гипофиз	Доза на особь, мг	n	Положительный ответ, %
Сазана	0,2	10	70
	0,4	5	100
Осетра	0,2	10	100
	0,4	10	100
Лобана	2,0	10	0

Таблица 2
Реакция спермиации у *Rana temporaria* под действием хорионического
гонадотропина и гипофизов рыб

Тестируемый препарат	Доза на особь, мг	n	Положительный ответ, %
Хорионический гонадотропин, м. е.	250	10	40
	500	10	90
Гипофиз сазана, мг	0,1	10	0
	0,3	10	30
	0,5	13	70
	1,0	2	100
Гипофиз осетра, мг	0,5	3	33
	1,0	2	100
Гипофиз лобана, мг	0,5	2	0
	1,0	2	0
	2,0	25	0
	4,0	12	0
	8,0	2	0
	16,0	2	0

хорионический гонадотропин вызвали положительную реакцию, гипофиз лобана в дозах от 0,5 до 16 мг — отрицательную.

Опыты по созреванию ооцитов *in vitro* выполнены под руководством сотрудника ИБР АН СССР М. Н. Скоблиной, за что выражаем ей свою признательность. Обе модели: ооциты вьюна и южно-африканской лягушки хорошо реагировали на хориогонин, но несмотря на значительное увеличение доз, ни в одном случае не созрели под действием гипофиза лобана (табл. 3).

Таким образом, использованные нами методы тестирования не позволили определить гонадотропную активность гипофизов лобана.

Результаты опытов иммунохимического сравнения антигенных характеристик гипофиза лобана и других видов рыб приведены ниже. Из приведенных данных видно, что иммунная сыворотка к гипофизу лобана не преципитирует ни с одним из исследованных нами гипофизов, кроме своего собственного.

В свою очередь при испытании ряда иммунных сывороток положительный ответ получен только при реакции сыворотки к гипофизу лобана со своим антигеном.

В связи с тем что нам не удалось обнаружить гонадотропную активность ацетонированных гипофизов лобана методами, описанными выше, возникает вопрос, сохраняется ли она после консервации гипофизов в ацетоне. В. С. Апекин и Т. М. Тронина (1972) испытывали действие

Реакция созревания ооцитов *in vitro* *Misgurnus fossilis* и *Xenopus laevis* под действием хорионического гонадотропина и гипофизов лобана

Тестируемый препарат	Дозы, мг	Положительный ответ, %	Тестируемый препарат	Дозы, мг	Положительный ответ, %
<i>Misgurnus fossilis</i>			<i>Xenopus laevis</i>		
Хорионический гонадотропин	0,005	100	Хорионический гонадотропин	0,05	100
	0,02	100		0,1	100
	0,08	100	Гипофиз лобана	0,02	0
Гипофиз лобана	0,008	0		0,05	0
	0,03	0		0,1	0
	0,12	0		0,2	0

Преципитация иммунной сывороткой к гипофизу лобана гипофизов других видов рыб

Иммунная сыворотка	Гипофизы													
	лобана	скапа	севрюги	осетра	камбалы-калкана	речного окуни	бычка-кругляка	сайды	карпа	сазана	леща	белого амура	белого толстолобика	вьюна
К гипофизу лобана	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Преципитация иммунными сыворотками к очищенным гонадотропинам и гипофизам рыб гипофиза лобана

Иммунные сыворотки	Гипофиз лобана	Иммунные сыворотки	Гипофиз лобана
к гонадотропину осетра	—	гипофизу сазана	—
гипофизу осетра	—	гипофизу бычка-кругляка	—
гонадотропину севрюги	—	гипофизу лобана	+
гонадотропину карпа	—		

свежих и ацетонированных гипофизов лобана на преднерестовых самок своего вида. Ими доказано, что ацетонированные железы, хотя и заметно слабее, чем свежие, индуцировали начальные этапы созревания. По данным Л. Г. Гнатченко, ацетонированные гипофизы кефалей в концентрациях от 0,8 до 0,003 мг/мл вызывают созревание ооцитов кефалей в системе *in vitro*.

Таким образом, ацетонированные гипофизы лобана сохраняют гонадотропную активность, хотя, возможно, более низкую, чем в свежих.

В наших опытах вьюн, травяная лягушка и *Xenopus laevis* дали отрицательные результаты при воздействии на них гипофизарных гонадотропинов лобана. Подобные же результаты были получены и на других объектах. В. С. Алекин (1975) исследовал действие на ооциты *Bufo vividas* гипофизов рыб ряда видов. Гонадотропины лобана вызвали растворение зародышевых пузырьков только в единичных ооцитах некоторых проб. При культивировании ооцитов без гормонов этого не происходило. Автор отнес гонадотропины лобана к низкоактивным по отношению к исследованному тест-объекту. В опытах А. П. Золотницкого ацетонированные гипофизы лобана в дозах от 1,0 до 4,0 мг не вызывали спермиацию у озерной лягушки.

Зоологическая специфичность является понятием качественным, она может быть преодолена в какой-то степени введением более высоких, экстрафизиологических доз, позволяющих получить тот же эффект, что и от гомопластических гонадотропинов (Breton et al., 1973).

Н. Бланк и М. Абрахаму (Blans, Abraham, 1968) удалось обнаружить гонадотропную активность гипофизов лобана. Для тестирования ими были выбраны молодые озерные лягушки средней массой 14,7 г, т. е. в 2—3 раза мельче использованных нами. Консервацию желез проводили в абсолютном спирту. Среднеэффективная доза гипофиза преднерестовых рыб из пресной воды составила 25 мг, а отнерестившихся — 2 мг. Активность гипофиза карпа, оцененная по этому же тесту, была несравненно выше — эффективная доза 0,13 мг.

Подобное же проявление зоологической специфичности было получено при сравнении активности гипофизов карпа и лосося (Fontaine, Chauvel, 1961). Даже если бы нам удалось уловить гонадотропную активность гипофизов лобана, то использованные методы вряд ли позволили бы провести ее сравнительную оценку.

Результаты иммунохимического анализа также приводят нас к выводу о высокой специфичности гипофизарных гонадотропинов лобана по сравнению с представителями других отрядов рыб. Возможно, вопрос о тестировании активности его гипофиза можно решить путем использования в качестве тест-объекта вида, близкого к кефалям филогенетически, или тестирования активности желез в системе *in vitro* на ооцитах самих кефалей.

Выводы

1. Гонадотропную активность гипофизов лобана не удается оттестировать по реакции овуляции выюна, спермиации травяной лягушки, а также по овуляции ооцитов выюна и *Xenopus laevis* в системе *in vitro*.

2. Наряду с физиологической специфичностью гонадотропинов лобана обнаружены их существенные иммунохимические отличия от гипофизарных гонадотропинов рыб других отрядов.

3. Проведена оценка гонадотропной активности гипофиза сазана во выюновых и лягушачьих единицах, что позволяет стандартизировать использование этого препарата при индуцировании созревания кефалей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Алпатов В. В., Строганов Н. С. Новая единица измерения активности гипофиза у рыб. — ДАН СССР, 1950, т. 74, № 2, с. 405—407.

Апекин В. С., Тронина Т. М. Опыты по стимулированию созревания и нереста кефали. — Гидробиологический журнал, 1972, т. VIII, № 1, с. 82—89.

Апекин В. С. Выделение активных фракций гонадотропина из гипофиза осетра и получение к ним специфических иммунных сывороток. — Онтогенез, 1975, т. 6, № 4, с. 331—338.

Апекин В. С. Иммунодиффузия в исследовании по физиологии и биохимии рыб. — Труды ВНИРО, 1975, т. ХСVI, с. 35—47.

Апекин В. С. О возможности оценки гонадотропной активности гипофизов рыб по созреванию ооцитов *in vitro*. — Труды ВНИРО, 1975, т. ХСVI, с. 48—56.

Апекин В. С. Методические указания по получению зрелой икры кефали с помощью гипофизарных инъекций. — М.: ОНТИ ВНИРО, 1976—11 с.

Гончаров Б. Ф. Зависимость величины гормонозависимого периода созревания фолликулов травяной лягушки от разведения суспензии гипофизов. — Онтогенез, 1971, т. 2, № 6, с. 64—70.

Казанский Б. И., Нусенбаум Л. М. Выюн (*Misgurnus fossilis*) как объект для определения гонадотропной активности препаратов гипофиза рыб. — Труды лаборатории основ рыбоводства, 1947, т. I, с. 111—120.

Людоговская Л. А. Получение и обработка иммунных сывороток. — В кн.: Иммунохимический анализ. Ред. Л. А. Зильбер, М., 1968, с. 5—20.

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

Фалеева Т. И. Методические указания по сбору и обработке гипофизов рыб как препарата для гипофизарных инъекций. — М.: Главрыбвод, 1968.—с. 16.

Blanc, N. M. Abraham. Evaluation du pouvoir gonadotrope dans l'hypophyse de *Cyprinus carpio* et *Mugil cephalus*. C. R. Acad. Sci. D 264, N 10, 1968, p. 958—961.

Breton, B., R. Billard, B. Jalabert. Specificite d'action et relations immunologiques des hormones gonadotropes de quelques teleosteens. Ann. biol. anim. biochim. biophys., 1973, 13.

Fontaine M., M. Chauvel. Evaluation du pouvoir gonadotrope de l'hypophyse des poissons teleosteens et en particulier du *Salmo salar* L. a diverses etapes de son developpement et ses migrations. C. R. Acad. Sci. 1961, 252, N 6.

Ouchterlony, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. Progr. in Allergy. 1958, 5, p. 1—78.

Thornton, V. F. A bioassay for progesterone and gonadotropins based on meiotic division of *Xenopus* oocytes in vitro. Gen. Comp. Endocrinol., 1970, v. 16, N 3, p. 599—605.

*On zoological specificity of pituitary gonadotropins of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) from the Black Sea*

Belaya N. A.

SUMMARY

The gonadotropic activity of pituitaries of grey mullet from the Black Sea was tested judging from the response of ovulation in loach, liberation of sperm in frog, ovulation of oocytes in loach and *Xenopus laevis* in vitro. The test-systems investigated responded to pituitaries of carp and sturgeon, to chorionic gonadotropin, but there was no response to pituitaries of grey mullet. The immunochemical comparison of antigenic characteristics of the pituitary of grey mullet and other species of fish indicates that the immune serum to the pituitary of grey mullet responds to none of the pituitaries investigated but their own.

Thus the physiological specificity of gonadotropins of grey mullet determined in the experiment is supported by the results of the immunochemical analysis.

УДК 597.593.4:597—146.512

**К ХАРАКТЕРИСТИКЕ ТРОФОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РОСТА
ООЦИТОВ КЕФАЛИ-СИНГИЛЯ (*Mugil auratus* Risso)**

**Н. И. Куликова, В. С. Апекин, Г. А. Вальтер, Ю. П. Федоров
(АзЧерНИРО, ВНИРО)**

На основе анализа живых ооцитов, изменения их размерного состава, а также данных о накоплении белка судили об особенностях роста половых клеток кефали-сингиля в период вителлогенеза. У этого вида одновременно развивается две генерации желтковых ооцитов. Обособление старшей завершается при их среднем диаметре 451—475 мкм. С ростом клеток изменяется характер их размерных вариационных рядов. Содержание белка в ооцитах в зависимости от их диаметра аппроксимируется логистической кривой. Анализ ее позволил выделить в белковом росте два периода: ускоряющийся (до 520 мкм) и замедляющийся (выше 520 мкм). При этом ускоряющийся период подразделяется на два этапа: с нарастающим (до 418 мкм) и затухающим (от 418 до 520 мкм) темпом. В среднем для популяции сингиля белковый рост ооцитов завершается при достижении ими размера 525—575 мкм, и они могут быть определены как дефинитивные.