

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.

Для черноморской кефали-сингиля характерен высокий темп развития яичников в преднерестовый период. Трофоплазматический рост начинается в конце июня — начале июля и завершается к началу — середине сентября; в это время рыба мигрирует на нерест из Азовского моря в Черное.

У сингиля развивается две генерации желтковых ооцитов, и в яичниках рыб IV стадии зрелости присутствуют яйцеклетки средним диаметром 200—250 и 475—575 мкм. Созревают и выметываются старшие.

Для понимания характера взаимосвязи между завершением вителлогенеза и переходом ооцитов к созреванию, а также для обоснования критериев, позволяющих оценить степень зрелости самок и их готовности к нересту, большой интерес представляет исследование трофоплазматического роста половых клеток, и особенно его конечных этапов.

В предлагаемой работе на основе анализа живых ооцитов, изменения их размерного состава, а также данных о накоплении белка судили о сопряженности развития обеих генераций, об особенностях роста старшей и о достижении ооцитами дефинитивного состояния.

Материал собирали с июля по октябрь в 1974 и 1975 г. Рыб отлавливали малым подъемным кефалевым заводом, установленным в Керченском проливе. Полный биологический анализ проводили по схеме, описанной ранее (Апекин, Куликова, Вальтер, 1976). От самок длиной 30—34 см и массой тушки 300—500 г с гонадами на III и IV стадиях зрелости брали кусочек яичника в 5—7 см от генипоры и помещали в чашку с физиологическим раствором (0,8% NaCl). С помощью препаративных игл желтковые ооциты отделяли от стромы и при увеличении ок. $\times 8$, об. $\times 4$ измеряли диаметры 100 клеток; в тех случаях, когда были выражены две генерации, — отдельно 50 крупных и 50 мелких. Из размерного вариационного ряда находили средний диаметр для каждой группы.

Ооциты старшей генерации дополнительно характеризовали по степени дисперсности жировых включений, выделяя фазы: «желтковые» — Ж, «начало укрупнения жировых капель» — НЖК (Апекин, Вальтер, Гнатченко, 1976).

Чтобы получить представление о характере изменения размеров ооцитов в ходе развития половых желез, группировали рыб по среднему диаметру яйцеклеток. Было получено 12 групп, отличающихся одна от другой по среднему диаметру на 25 мкм (от 276 до 575 мкм). Каждую из групп характеризовали по суммарному размерному вариационному ряду желтковых ооцитов, по средним показателям степени развития воспроизводительной системы: гонадо-соматическому индексу (ГСИ) и индексу печени (ПСИ).

Для определения общего белка брали пробу из 50 желтковых ооцитов, которые отделяли под бинокляром от стромы и по возможности от клеток периода протоплазматического роста. Их помещали в 0,2 мл 0,1 н. раствора NaOH. После гидролиза в течение 16 ч при температуре 37° щелочной гидролизат центрифугировали и в 0,1 мл насадочной жидкости определяли содержание белка по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Содержание белка рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по кристаллическому сывороточному альбумину человека. Вычисляли также плотность белка в клетке — количество белка в единице объема.

Все материалы обработаны методами вариационной статистики (Плохинский, 1961), часть из них — на ЭВМ «Минск-32». Для выявления связи между изменением содержания белка y в ооците с увеличе-

нием его диаметра x эмпирический ряд был выровнен по нескольким уравнениям. Наименьшее отклонение теоретической линии регрессии от эмпирической кривой получено при использовании уравнения логистической кривой из семейства кривых насыщения вида

$$y = \frac{A}{1 + e^{\alpha - \beta x}} + C,$$

где A и C — предельное и начальное содержание белка в клетке;

α и β — безразмерные коэффициенты, определяющие точку симметрии кривой.

Коэффициенты определяли методом наименьших квадратов. Дифференцированием полученного уравнения регрессии выявляли зависимость прироста белка и его изменения от диаметра ооцита, а также определяли критические точки описываемых процессов.

Работа выполнена на 329 самках, в ооцитах 84 из них определено содержание общего белка.

Анализ изменения кривых суммарных вариационных рядов желтков ооцитов позволил выявить особенности роста и развития яйцеклеток обеих генераций (рис. 1). В яичниках рыб со средним диаметром ооцитов 276—300 мкм присутствуют яйцеклетки разных фаз желткообразования диаметром от 125 до 425 мкм. Модальная группа не выражена. По мере роста обособляются ооциты, диаметр которых последовательно увеличивается, и при среднем диаметре старших 426—450 мкм четко выделяются две группы яйцеклеток. Вначале между ними есть промежуточное звено, а при диаметре 451—475 мкм происходит отрыв старшей генерации. В процессе роста ооцитов разрыв между двумя группами клеток увеличивается; изменяется характер кривых размерных вариационных рядов. Сходство этих изменений, прослеженное при сравнении материалов 1974 и 1975 г.*, свидетельствует о том, что изменение кривых отражает закономерности роста популяции клеток в яичнике сингиля. С увеличением размера ооцитов количество их в модальном классе нарастает и при диаметре 501—525 мкм достигает максимума — $60 \pm 1,4\%$ (табл. 1). При этом процент клеток в классовых промежутках влево от моды снижается до $20,4 \pm 1,4\%$. Характерно, что у рыб со средним диаметром выше 525 мкм количество ооцитов в модальном классе несколько ниже, чем в группе 501—525 мкм.

По мере роста яйцеклеток первой генерации последовательно развивается следующая. При увеличении среднего диаметра старших от 300 до 425 мкм модальная группа второй порции ооцитов вначале формируется в классовом промежутке 175—200 мкм и при обособлении генераций процент клеток в указанном модальном классе достигает максимума. При этом средний диаметр мелких желтковых ооцитов составляет 211,9 мкм. При последующем росте обособившейся группы крупных ооцитов возрастает и средний диаметр мелких, при этом модальная группа мелких ооцитов смещается вправо, в классовый промежуток 250—275 мкм.

В яичниках сингиля, где встречаются самые крупные клетки старшей генерации (средний диаметр 551—575 мкм), отмечены и самые крупные ооциты следующей порции (средний диаметр 264,75 мкм). Однако предельные размеры мелких желтковых ооцитов остаются 325—350 мкм.

Эти данные свидетельствуют о том, что развитие обеих генераций в яичниках сингиля взаимосвязано, хотя и специфично для каждой из них.

* В 1974 г. измеряли только ооциты старшей генерации.

Установлено, что изменение содержания белка (рис. 2) с увеличением среднего диаметра ооцитов от 230 до 575 мкм с высокой степенью точности (корреляционное отношение 0,892) аппроксимируется уравнением регрессии:

$$y = \frac{19,008}{1 + 2,718^{6,694 - 0,013x}} + 3,24. \quad (1)$$

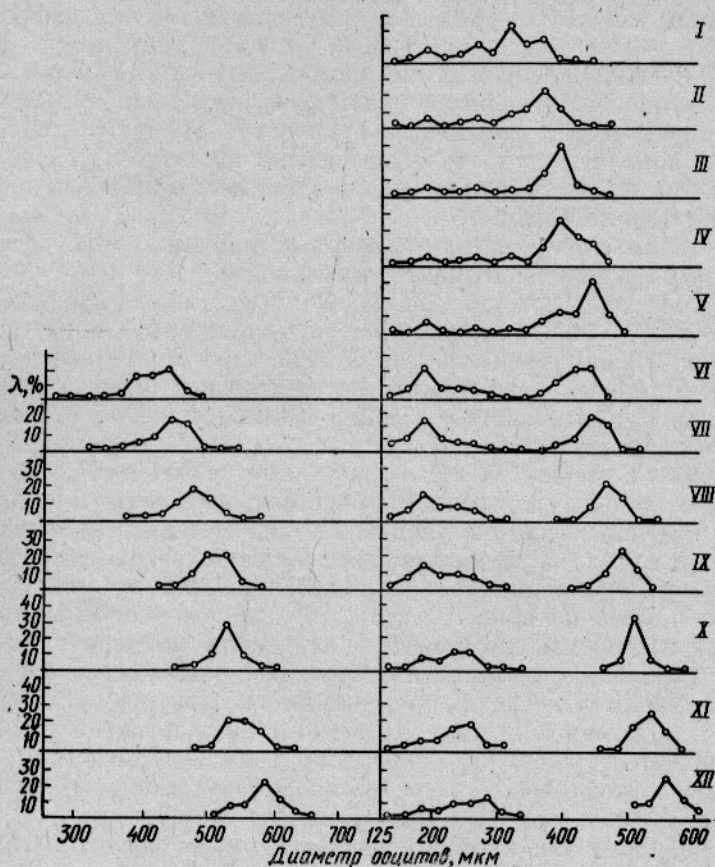


Рис. 1. Развитие двух генераций ооцитов сингиля по материалам 1974 г. (слева) и 1975 г. (справа). Вариационные ряды сгруппированы по среднему диаметру через 25 мкм:

I — 276—300; II — 301—325; . . . XII — 551—575 мкм.

Дифференцированием уравнения (1) описывается зависимость прироста содержания белка (в мкг/мкм) от диаметра ооцитов:

$$y' = \frac{19,008 \cdot 0,013 \cdot 2,718^{6,694 - 0,013x}}{(1 + 2,718^{6,694 - 0,013x})^2}. \quad (2)$$

Дифференцированием уравнения (2) описывается зависимость изменения прироста содержания белка (в мкг/мкм²) от диаметра ооцитов, иными словами, изменение темпа прироста белка при увеличении диаметра клетки на 1 мкм:

$$y'' = \frac{19,008 \cdot 0,013^2 \cdot 2,718^{6,694 - 0,013x} (2,718^{6,694 - 0,013x} - 1)}{(1 + 2,718^{6,694 - 0,013x})^3}. \quad (3)$$

Распределение ооцитов в размерных вариационных рядах для групп рыб с разным средним диаметром яйцеклеток (по суммарным данным 1974—1975 гг.)

Группа рыб	Средний диаметр, мкм	Число рыб	Количество яйцеклеток в классах вариационных рядов, %		
			модальный	влево от моды	вправо от моды
I	426—450	28	43,7±1,9	42,5±4,0	13,8±3,9
II	451—475	39	45,6±1,8	33,3±2,8	21,1±2,9
III	476—500	49	51,1±1,5	29,7±2,9	19,2±3,0
IV	501—525	102	60,0±1,4	20,4±1,4	19,6±1,3
V	526—550	31	46,0±2,0	26,7±4,1	27,3±4,7
VI	551—575	11	46,6±4,5	29,5±6,3	23,9±6,4

Анализ величин прироста (в мкг/мкм) и темпа прироста (в мкг/мкм²) позволяет выделить на кривой (рис. 2, а) узловые точки. С увеличением размера ооцитов прирост белка изменяется неравномерно (рис. 2, б), что определяется неравномерностью его темпа. Как видно из рис. 2, в, при диаметре от 230 до 418 мкм темп постоянно нарастает, при этом в диапазоне 230—350 мкм относительно замедленно, а в дальнейшем интенсивней; достигнув максимума при диаметре 417,9 мкм, он начинает снижаться, при 508—521 мкм равен нулю, а при 521 мкм и более выражается уже отрицательными величинами. Белковый прирост, увеличивающийся до тех пор, пока его темп положителен, достигает максимума 0,061 мкг/мкм при диаметре ооцитов 520,6 мкм, а затем также начинает снижаться (см. рис. 2б). Соответственно белковый рост ооцитов диаметром выше 520 мкм постепенно замедляется. Плотность белка в ооцитах диаметром от 300 до 400 мкм составляет в среднем 190 мкг/мм³, от 400 до 500 мкм—175 мкг/мм³ и свыше 520 мкм—155 мкг/мм³. Падение плотности белка в ооцитах на завершающих этапах роста связано, по-видимому, с накоплением в них в этот период веществ небелковой природы.

Наряду с яйцеклетками исследовали также уровень функциональной активности печени, о чем судили по величине индексов. В печени, как известно (Wallace, Bergink, 1974), синтезируются белки—предшественники белков желтка. Как видно из данных табл. 2, в период интенсивного накопления белка в ооцитах при их диаметре 376—475 мкм индексы печени достигают максимальных величин—по средним данным 240—242 у. ед. С дальнейшим развитием половых желез при увеличении ГСИ до 16,9% и диаметра клеток до 575 мкм индекс печени снижается до 205 у. ед., что, по-видимому, указывает на изменение функциональной активности печени в завершающий период накопления трофического материала в ооцитах.

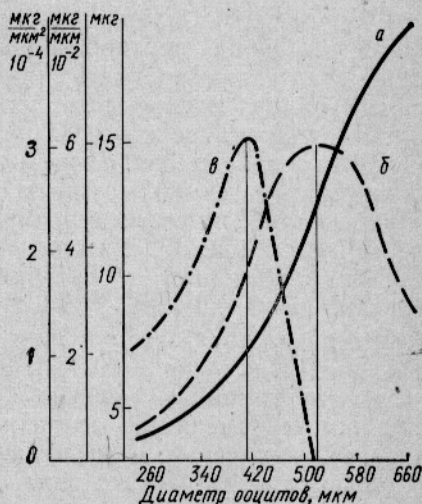


Рис. 2. Белковый рост ооцитов сингиля:

а — изменение белка (мкг) в зависимости от диаметра (мкм); б — прирост белка (мкг/мкм); в — изменение прироста белка (мкг/мкм²).

Степень развития воспроизводительной системы у самок сингиля с желтковыми

Группа рыб	Средний диаметр, мкм	Число самок	Средний диаметр желтковых ооцитов, мкм	
			крупных	мелких
I	276—325	18	305,88±3,29	—
II	326—375	37	344,82±2,26	—
III	376—425	22	406,71±3,16	210,22±10,03
IV	426—475	65	452,58±1,79	206,16±2,73
V	476—525	114	504,80±1,02	222,81±2,40
VI	526—575	30	542,63±2,14	245,86±5,41

Приведенные цитоморфологические и биохимические данные позволили охарактеризовать этапы развития желтковых ооцитов сингиля и определить границу завершения их белкового роста. Уже в яичниках на ранней III стадии зрелости отчетливо видна асинхронность роста и намечается две генерации ооцитов.

При развитии младшей генерации, с одной стороны, постоянно пополняется фонд желтковых ооцитов за счет клеток периода протоплазматического роста: в яичниках постоянно присутствуют ооциты самых ранних этапов вителлогенеза диаметром 125—150 мкм; с увеличением диаметра крупных процент мелких от общего количества яйцеклеток периода большого роста нарастает (см. табл. 2). С другой стороны, рост самых крупных ооцитов младшей генерации на определенном этапе, по-видимому, блокируется. Мелких желтковых ооцитов диаметром выше 350 мкм не обнаружено. В яичниках отнерестившихся рыб, пойманных в сентябре—начале октября, размер желтковых ооцитов был таким же — от 210 до 340 мкм.

Особенности формирования двух генераций определяют величину плодовитости у сингиля. Как видно из табл. 2, абсолютная плодовитость по крупным клеткам при увеличении диаметра от 425 до 575 мкм не изменяется, тогда как по сумме обеих генераций нарастает за счет увеличения доли мелких. Таким образом, оценивать рабочую плодовитость для этого вида нужно по группе крупных желтковых ооцитов лишь тогда, когда ее формирование завершено.

Начальный момент обособления старшей генерации от младшей приходится на период наиболее высокого темпа белкового прироста в крупных клетках (417,9 мкм). Продолжающееся вслед за этим увеличение прироста приводит к более активному их развитию. При диаметре 451—475 мкм старшие яйцеклетки полностью отделяются от младших. Вначале разрыв между ними невелик и составляет около 75 мкм, затем все более увеличивается. В процессе роста популяции крупных ооцитов характер размерного вариационного ряда их изменяется и при среднем диаметре 501—525 мкм характеризуется максимумом клеток в модальном классе, а также практически полной симметричностью соответствующей кривой (см. табл. 1). Для ооцитов этого диаметра (среднее 520, 6 мкм) характерно также состояние максимального белкового прироста, вслед за которым белковый рост начинает затухать. Таким образом, можно выделить два периода белкового роста ооцитов: ускоряющийся (до 520 мкм) и замедляющийся (выше 520 мкм). При этом период ускоряющегося роста подразделяется на два этапа: с нарастающим (до 418 мкм) и затухающим (от 418 до 520 мкм) темпом.

ооцитами разного диаметра (по данным 1974—1975 гг.)

Индексы		Абсолютная плодовитость		Количество мелких клеток, % от общего числа желтковых ооцитов
гонадо-соматический, %	печени, у. ед.	по сумме клеток	по крупным клеткам	
4,21±0,31	203±13	0,59±0,11	—	—
6,26±0,38	213±7	0,79±0,07	—	—
7,38±0,32	240±11	0,89±0,20	—	—
9,90±0,33	242±9	0,92±0,10	0,80±0,07	13,5±2,0
14,28±0,35	219±6	1,34±0,06	0,79±0,04	29,8±1,5
16,97±0,75	205±11	1,23±0,13	0,82±0,07	33,8±3,5

Опытами по гормональной стимуляции созревания самок кефалей установлено, что первыми видимыми в живых ооцитах признаками созревания является начало укрупнения жировых капель, т. е. переход ооцитов из фазы «желтковые» в фазу «начало укрупнения жировых капель» (Апекин, Вальтер, Гнатченко, 1976). У самок, выловленных в проливе, также встречаются ооциты в фазе НЖК, причем с увеличением среднего диаметра ооцитов процент таких самок увеличивается.

Максимальное количество рыб с ооцитами указанного состояния отмечается при достижении половыми клетками диаметра 501—525 мкм (табл. 3).

Таблица 3

Изменение количества рыб (числитель в шт., знаменатель в %) с ооцитами в фазе НЖК с увеличением среднего диаметра яйцеклеток

Средний диаметр, мкм	Число рыб	Из них с ооцитами на фазах		Средний диаметр, мкм	Число рыб	Из них с ооцитами на фазах	
		желтковые	НЖК			желтковые	НЖК
451—475	22	21	1	501—525	58	41	17
			4,5				29,3
476—500	19	16	3	526—575	25	19	6
			15,8				24,0

Таким образом, белковый рост ооцитов сингиля в среднем в популяции завершается при достижении ими диаметра 525 мкм. В нерестовый период в природе встречаются самки с желтковыми ооцитами и большего размера — 550—575 мкм. За период наблюдений их было 11%.

Самые крупные яйцеклетки в яичниках таких рыб достигают 625 мкм. По-видимому, диапазон от 525 до 575 мкм можно оценить как вариабельность размеров ооцитов близкого дефинитивного состояния.

При изменении условий нагула полученные величины, характеризующие определенные периоды роста яйцеклеток, могут, по-видимому, несколько изменяться.

1. У сингиля одновременно развивается две генерации желтковых ооцитов. Обособление старшей завершается при среднем диаметре 451—475 мкм. По мере их дальнейшего роста процент клеток в модальном классе увеличивается и при среднем диаметре 501—525 мкм. достигает максимума. Соответствующая кривая вариационного ряда характеризуется полной симметричностью. С ростом крупных клеток количество мелких во второй генерации увеличивается за счет перехода от протоплазматического роста к трофоплазматическому. Мелкие растут, достигая в среднем 265 мкм, но не превышая 350 мкм.

2. Содержание белка в ооцитах в зависимости от их размера аппроксимируется логистической кривой, из анализа которой следует, что темп прироста белка в ооцитах последовательно возрастает до достижения ими размера 417,9 мкм, затем снижается до нуля при диаметре 508—525 мкм. В ооцитах этого размера прирост белка достигает максимума, после чего падает, и белковый рост затухает. Таким образом, можно выделить в белковом росте два периода: ускоряющийся и замедляющийся. При этом ускоряющийся подразделяется на два этапа: с нарастающим и затухающим темпом.

3. В среднем для популяции сингиля белковый рост ооцитов завершается при достижении ими размера 525—575 мкм, и они могут быть определены как дефинитивные.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Апекин В. С., Вальтер Г. А., Гнатченко Л. Г. Изменение ооцитов при созревании и получении зрелой икры с помощью гомопластических гипофизарных инъекций у лобана (*Mugil cephalus L.*). — Труды ВНИРО, 1976, т. 115, с. 13—23.

Апекин В. С., Куликова Н. И., Вальтер Г. А. Цитоморфологические изменения яичников сингиля (*Mugil auratus Risso*) в период размножения. — Труды ВНИРО, 1976, т. 115, с. 24—33.

Апекин В. С., Куликова Н. И., Вальтер Г. А. Размножение черноморской кефали-сингиля (*Mugil auratus Risso*). Состояние воспроизводительной системы у рыб в популяции в преднерестовый период. — «Гидробиологический журнал», 1977, т. XIV, № 2, с. 120—130.

Плохинский Н. А. Биометрия. — Новосибирск: изд-во Сибирского отделения АН СССР, 1961. — 364 с.

Lowry, O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.

Wallace R. A., Bergink E. W. Amphibian vitellogenin: properties, hormonal regulation of hepatic synthesis and ovarian uptake, and conversion to yolk proteins. — Amer. Zool., 1974, v. 14, N 4, p. 1159—1175.

Characteristics of the trophoplasmatic growth of oocytes of long-finned mullet (Mugil auratus Risso)

Kulikova N. I., Apekin V. S., Valter G. A., Fedorov Ju. P.

SUMMARY

On the basis of the analysis of living oocytes of long-finned mullet, changes in their size composition and accumulation of protein some characteristics of the growth of sexual cells in the period of vitellogenesis have been revealed. It is shown that two generations of yolk oocytes are developed at the same time. The isolation of the elder generation is completed when the mean diameter is 451—475 mkm. The pattern of time series changes with growth. The protein content in oocytes in relation to their diameter is approximated with a logistic curve. The analysis of the curve has indicated two periods in the protein growth: an accelerated period (up to 520 mkm) and decelerated period (over 520 mkm). The former is divided into two stages: an accelerated growth rate (up to 418 mkm) and slowing-down rate (418—520 mkm). On the average, the protein growth in long-finned mullet is over when the size of oocytes reach 525—575 mkm and they may be identified as definite oocytes.