

УДК 547

СПОНТАННАЯ АКТИВАЦИЯ ЯИЦ РЫБ ПРЕДОТВРАЩАЕТСЯ ИНГИБИТОРАМИ ПРОТЕАЗ¹

© 2008 г. А. А. Минин, С. Г. Озерова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: mininand2002@yahoo.com

Поступила в редакцию 19.06.07 г.

Окончательный вариант получен 17.01.08 г.

Известно, что при нересте попадающая во внешнюю водную среду икра большинства рыб сохраняет способность к оплодотворению лишь на протяжении короткого времени. Это связано с так называемой спонтанной активацией яиц, сопровождающейся образованием оболочки оплодотворения, которая при нормальном оплодотворении препятствует проникновению сверхчисленных и чужеродных спермиев в яйцо. В настоящей работе показано, что формирование оболочки яйца и утрата способности к оплодотворению, происходящие в водных растворах разного состава, подавляются ингибиторами протеаз, в частности лейпептином и апротинином. Высказывается предположение о наличии природных ингибиторов протеаз в овариальной жидкости, которые предотвращают спонтанную активацию яйца. Возможным объяснением активации яйца без участия спермия является снижение концентрации этих ингибиторов при разведении овариальной жидкости в водной среде в условиях нереста.

Ключевые слова: экзоцитоз, *Misgurnus fossilis*, 12-*O*-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата, форбол-12,13-дибутирата.

При взаимодействии яйца со спермием в процессе оплодотворения происходит активация яйца – включение программы развития. Одним из первых результатов активации является образование так называемой оболочки оплодотворения, предотвращающей проникновение в яйцо сверхчисленных спермиев. У низших позвоночных, развитие зародышей которых происходит в воде (рыбы, амфибии), оболочка оплодотворения является к тому же защитной, состоящей из внешнего слоя, который до активации прилегал к поверхности неактивированного яйца, и студенистого, сильно обводненного внутреннего слоя, образующегося из экзоцитирующегося содержимого кортикальных гранул яйца. Экзоцитоз кортикальных гранул инициируется у большинства групп животных проникновением в яйцо спермия.

Активация и оплодотворение яиц рыб были подробно рассмотрены и описаны ранее (Гинзбург, 1968). Для рыб характерно внешнее оплодотворение, при этом процесс активации чаще всего может идти в отсутствие спермия и запускаться при попадании яйца в водную среду, что минимизирует время возможного оплодотворения, предотвращая возможность проникновения в яйцо сверх-

численных и чужеродных спермиев. Происходящая при этом так называемая спонтанная активация яйца сопровождается образованием оболочки оплодотворения, аномальной ооплазматической сегрегацией и неправильным дроблением, а в дальнейшем – гибелью. Отделение оболочки оплодотворения от поверхности яйца, которая становится видимой в нормальных условиях через несколько минут после начала активации, является простым и легко наблюдаемым признаком произошедшей активации яйца.

Внутриклеточные сигнальные процессы, связанные с активацией яйца и запускающие процесс развития, широко исследуются у разных животных, в том числе и у рыб (Gilkey et al., 1999; Lee et al., 1999). Центральным среди этих процессов является, в частности, повышение концентрации свободных ионов кальция. Экзоцитоз кортикальных гранул в яйце рыб, приводящий к образованию оболочки оплодотворения, вероятно, активируется ионами кальция и включает в себя целый каскад событий, в том числе реорганизацию кортикального слоя актина в яйце (Ivanenkov et al., 1990; Becker, Hart, 1999). Было показано, что у рыб при спонтанной активации яйца, как и при нормальном оплодотворении, происходит волнообразное повышение концентрации ионов кальция (Lee et al., 1999). Механизм само-го раннего, локального, повышения концентрации

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48975).

ионов кальция в анимальной части яйца при активации в отсутствие спермия остается при этом неизвестен (Lee et al., 1999), что указывает на существование каких-то неизвестных сигнальных процессов, которые при этом происходят.

В ряде работ исследовался процесс активации яйца без спермия в солевых средах разного состава (Hart, Yu, 1980; Lee et al., 1999; Gilkey et al., 1999). Обычно при экспериментах на неактивированной икре для предотвращения активации используют овариальную или, по-другому, полостную жидкость, при этом не обязательно взятую от рыб того же вида; в частности, при работе с яйцами данио используют овариальную жидкость лосося (Corley-Smith et al., 1995). Остаются открытыми вопросы, какие именно компоненты овариальной жидкости предотвращают активацию яйца рыб и каков механизм активирующего действия воды.

Цель нашей работы – выяснение особенностей активации яйца рыб в воде и водных растворах разного состава, а также исследование природы ингибирующего действия овариальной жидкости на этот процесс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали неоплодотворенные яйца вьюна *Misgurnus fossilis*, полученные после стимуляции рыб внутрибрюшинной инъекцией гонадотропного гормона (Костомарова, Нейфах, 1964).

Активацию яйца оценивали по двум критериям. Первый – отхождение оболочки оплодотворения, которое наблюдали визуально под бинокулярной лупой после активирующего воздействия. В случае активации оболочка оплодотворения отделяется от поверхности яйца и становится видимой в течение нескольких минут. Этот критерий использовали для качественной оценки способности разных растворов предотвращать активацию яйца. Для количественной характеристики сохранения способности к оплодотворению в средах разного состава использовали второй критерий – подсчет погибших неоплодотворенных зародышей, которые гибнут у вьюна ко времени, соответствующему стадии средней бластулы–ранней гастролы. Сохранение способности к оплодотворению определяли после двухчасовой инкубации икры вьюна в исследуемом растворе. Оплодотворяли и инкубировали икру вьюна по стандартной методике (Костомарова, Нейфах, 1964).

Активирующее действие на яйца вьюна форболовых эфиров исследовали, добавляя 12-*O*-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата (ТФА) и форбол-12,13-дибутирата (ФДБ) в концентрации 0.1–1 мкМ.

Таблица 1. Спонтанная активация яиц вьюна в водных средах разного состава

название	Среда		Источник
	состав, мМ	Отделение оболочки оплодотворения после 10 мин инкубации	
Раствор Рингера для золотой рыбки	NaCl – 100, KCl – 2.5, NaHCO ₃ – 10, MgCl ₂ – 1, CaCl ₂ – 1	+	Ivanenkov et al., 1990
Бескальциевый раствор Рингера	NaCl – 100, KCl – 2.5, NaHCO ₃ – 10, MgCl ₂ – 1, ЭГТА – 5	+	Там же
FBSS	NaCl – 137, KCl – 5.36, MgCl ₂ – 0.98, NaHPO ₄ – 0.81, декстроза – 5	+	Becker, Hart, 1999
FBSS + альбумин	То же + 0.5%-ный бычий сывороточный альбумин	+	Lee et al., 1999
Раствор Хенкса	NaCl – 137, Na ₂ HPO ₄ – 0.25, KCl – 5.4, NaHCO ₃ – 4.2, MgSO ₄ – 10, CaCl ₂ – 1.3	+	
То же с лейпептином	То же + лейпептин – 1	–	
То же с апротинином	То же + 1мг/мл апротинина	–	
Сыворотка крупного рогатого скота		–	
Овариальная жидкость		–	

Использовали следующие солевые среды: раствор Рингера для золотой рыбки (Goldfish Ringer's); FBSS (Fish Balanced Salt Solution), мМ: 137 NaCl, 5.36 KCl, 0.98 MgCl₂ · 6 H₂O, 0.81 NaHPO₄ × 7 H₂O и 5 декстрозы (Becker, Hart, 1999); FBSS и 0.5%-ный бычий сывороточный альбумин (Lee et al., 1999). В некоторых экспериментах использовали те же солевые растворы с добавлением 1–5 мМ ЭГТА.

Овариальную жидкость вьюна получали центрифугированием неоплодотворенной икры при 10000g.

Таблица 2. Выживаемость зародышей вьюна, полученных из икры разных самок (1–5), инкубированной перед оплодотворением 2 ч в растворе Хенкса с добавлением разных концентраций лейпептина

Концентрация лейпептина, мМ	Икра 1		Икра 2		Икра 3		Икра 4		Икра 5	
	$N_{\text{общ}}/N_{\text{ж}}$ (%)	о/к	$N_{\text{общ}}/N_{\text{ж}}$ (%)	о/к	$N_{\text{общ}}/N_{\text{ж}}$ (%)	о/к	$N_{\text{общ}}/N_{\text{ж}}$ (%)	о/к	$N_{\text{общ}}/N_{\text{ж}}$ (%)	о/к
Контроль, 0	42/38 (90)		32/29 (91)		49/44 (90)		25/22 (88)		157/77 (48)	
0.005			59/51	94	29/29	111			74/11	29
0.015			52/50	105	36/23	70			85/17	42
0.03	59/49	92	58/55	104	32/26	90	40/35	99	77/18	48
0.06	59/53	98	22/20	100	32/25	87	43/37	98		
0.125			23/21	100						
0.25			44/41	102						
0.5	34/25	81	35/30	94			34/25	84	84/27	66
1			54/54	110						

Примечания. $N_{\text{общ}}$, $N_{\text{ж}}$ – количество икринок в пробе и зародышей, выживших на стадии средней-поздней гаструлы соответственно; о/к – отношение процента выживших зародышей при разных концентрациях лейпептина в пробе к проценту выживших в контрольной пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали спонтанную, т.е. происходящую без участия спермия, активацию яиц вьюна в водных средах разного состава (табл. 1).

В недавних работах для предотвращения спонтанной активации яиц рыб были предложены бескальциевые солевые растворы с декстрозой и бычьим сывороточным альбумином (Beker, Hart, 1999; Lee et al., 1999). Во второй из указанных работ оговаривается, что был использован бычий альбумин фракции V – частично очищенный белок, получаемый из сыворотки спиртовым осаждением. Однако в наших экспериментах все эти среды, в частности с использованием высокоочищенного сывороточного альбумина (альбумин фракции V мы не использовали), вызывали активацию яиц вьюна и данио. Повторение экспериментов с добавлением в солевую среду вместо очищенного альбумина нефракционированной бычьей сыворотки показало, что яйца не активировались даже при разведении сыворотки в десять раз. Это наблюдение позволяет предположить, что в сыворотке или в препаратах неочищенного альбумина могут содержаться какие-то ингибирующие активацию компоненты.

Кроме того, объяснение результатов указанных авторов по отсутствию активации яиц в солевых водных средах может быть связано с тем, что овариальная жидкость сохраняет способность предотвращать активацию даже при разведении. Однако в указанных работах не приводятся условия разведения получаемой в овариальной жидкости икры в солевых растворах, поэтому прове-

рить это наше предположение не представляется возможным.

Описанное выше показывает необходимость получения ответа на вопрос: что же предотвращает активацию созревших яиц как внутри гонады, так и в овариальной жидкости, в которой икра находится при искусственном получении?

Как уже говорилось, оптимальной в качестве неактивирующей среды для яиц является овариальная жидкость, в которой находится икра вьюна при получении ее искусственным путем (Ivanenkov et al., 1990). Как известно, полученная искусственно икра вьюна сохраняет способность к оплодотворению при хранении в полостной жидкости в течение нескольких часов, а при пониженной температуре – до 1 сут. Мы использовали овариальную жидкость вьюна, получаемую центрифугированием икры, и все эксперименты проводили именно в этой среде. Овариальная жидкость вьюна может быть использована и в экспериментах с неактивированными яйцами данио. Другие авторы предлагают использовать в качестве неактивирующей среды инкубации для яиц данио овариальную жидкость лосося (Corley-Smith et al., 1995). Таким образом, можно предположить наличие в овариальной жидкости каких-то компонентов, предотвращающих активацию, действие которых не является видоспецифическим.

Наши эксперименты показали, что активация икры вьюна не происходит в водных солевых средах, содержащих ингибиторы протеаз апротинин и лейпептин (табл. 1, 2). Эффект лейпептина мы продемонстрировали также на икре карпа *Cypr-*

nus carpio: икра сохраняла способность к оплодотворению и нормальному развитию после двухчасовой инкубации в средах, содержащих ингибиторы протеаз. Используемые нами концентрации лейпептина – от 0.005 до 1 мМ, при этом эффективность защиты от спонтанной активации и сохранения способности к оплодотворению составила от 70 до 100%. Апротинин в концентрации 1 мг на 1 мл среды предотвращает активацию и сохраняет способность к оплодотворению у 85% яиц вьюна (табл. 1)

Возможным компонентом овариальной жидкости и сыворотки крови могут быть эндогенные ингибиторы протеаз. Известно, что сыворотка крови содержит большое количество разнообразных ингибиторов протеаз, составляющих до 2% общего белка, около 75% из них приходится на серпин. В недавней работе (Knoll-Gellida et al., 2006) было показано наличие гомолога серпина в овариальных фолликулах данио среди 50 наиболее представленных белков.

Мы исследовали вопрос, могут ли активироваться яйца рыб в овариальной жидкости, а также в условиях действия искусственных ингибиторов спонтанной активации, для чего изучили влияние активаторов протеинкиназы С – ТФА и ФДБ – на активацию яиц вьюна. Оказалось, что ТФА и ФДБ в концентрации 1 мкМ вызывают образование оболочки оплодотворения яиц рыб. При этом активация под действием форболовых эфиров происходит несколько медленнее, чем в воде. Аналогичные результаты мы получили и в присутствии лейпептина в солевой среде. Ранее было показано, что форболовые эфиры вызывают активацию яйца шпорцевой лягушки (Vement, Capco, 1989; Grandin, Charbonneau, 1991). Известно активирующее действие этих веществ и на яйца млекопитающих (Sun et al., 1997). Однако для яиц рыб этот эффект наблюдается впервые.

Обнаруженная нами активация яйца рыб форболовыми эфирами может быть связана с поздними этапами сигнальных путей активации и экзоцитоза кортикальных гранул. Тот факт, что на отхождение оболочки оплодотворения при активации форболовыми эфирами затрачивается времени больше, чем при активации водой, может указывать на разнокачественность процессов, происходящих в том и другом случаях. Вопрос, как именно стимулируется процесс активации яйца форболовыми эфирами, остается открытым. Можно предположить, что это осуществляется через известные внутриклеточные сигнальные процессы, протекающие в яйце при его активации, – повышение концентрации ионов кальция и активацию протеинкиназы С.

Возможно, ингибиторы протеаз предотвращают спонтанную активацию яиц, взаимодействуя с неизвестными протеазами, которые могут гидролизовать активируемые протеазами рецепторы на поверхности яйца. Эндогенные ингибиторы овариальной жидкости, вероятно, обладают относительно низким сродством к протеазам и диссоциируют при разведении, происходящем с овариальной жидкостью при попадании икры в водную среду. Следует отметить, что лейпептин имеет высокое сродство к этим протеазам, на что указывает довольно низкая действующая концентрация этого вещества (табл. 2).

Снятие ингибирующего активацию эффекта происходит также при действии на яйцо форболовых эфиров, которое осуществляется, вероятно, минуя рецепторы, напрямую “downstream” на внутриклеточные сигнальные пути активации. Остается открытым вопрос о связи между процессами протеолиза, приводящими к активации яйца, которые могут быть ингибированы, и сигнальными процессами, повышающими внутриклеточную концентрацию ионов кальция и запускающими процессы разветвления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. М.: Наука, 1968. 358 с.
- Костомарова А.А., Нейфах А.А. Метод отделения бластодермы у зародышей вьюна и возможности его применения // Журн. общ. биологии. 1964. Т. 25. № 5. С. 386–388.
- Becker K.A., Hart N.H. Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis // J. Cell Sci. 1999. V. 112. P.97–110.
- Bement W. M., Capco D. G. Activators of protein kinase C trigger cortical granule exocytosis, cortical contraction, and cleavage furrow formation in *Xenopus laevis* oocytes and eggs // J. Cell Biol. 1989. V. 108. P. 885–892.
- Corley-Smith G.E., Lim C.J., Brandhorst B.P. Delayed *in vitro* fertilization using coho salmon ovarian fluid // The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) / Ed. Westerfield M. Eugene, OR: Univer. Oregon Press, 1995. P. 7.22–7.25.
- Gilkey J.C., Jaffe L.F., Ridgeway E.B., Reynolds G.T. A free calcium wave traverses the activating egg of medaka, *Oryzias latipes* // J. Cell Biol. 1999. V. 76. P. 467–482.
- Grandin N., Charbonneau M. Intracellular pH and intracellular free calcium responses to protein kinase C activators and inhibitors in *Xenopus* eggs // Development. 1991. V. 112. № 2. P. 461–470.
- Hart N.H., Yu S.F. Cortical granule exocytosis and cell surface reorganization in eggs of *Brachydanio* // J. Exp. Zool. 1980. V. 213. P. 137–159.

Ivanenkov V.V., Minin A.A., Ozerova S.G. Phalloidin inhibits cortical granule exocytosis and ooplasmic segregation in loach eggs // *Cell Diff. Devel.* 1990. V. 29. P. 21–26.

Knoll-Gellida A., Andre M., Gattegno T. et al. Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling, and comparison with the transcriptomes of other animals // *BMC Genomics*. 2006. V. 7. № 46. (publ. online 2006 March 9. doi: 10.1186/1471-2164-7-46)

Lee K.W., Webb S.E., Miller A.L. A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation // *Devel. Biol.* 1999. V. 214. P. 168–180.

Sun Q.Y., Wang W.H., Hosoe M. et al. Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca(2+)-independent manner, but not the resumption of cell cycle in porcine eggs // *Devel. Growth. Diff.* 1997. V. 39. № 4. P. 523–529.

Spontaneous Activation of Fish Eggs Is Abolished by Protease Inhibitors

A. A. Minin and S. G. Ozerova

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: mininand2002@yahoo.com*

Abstract—During spawning, eggs of most fish species entering the aquatic environment remain fertilizable for a relatively short period of time. This is due to the “spontaneous egg activation” giving rise to the fertilization membrane, which prevents the penetration of excessive and foreign sperm into the egg during normal fertilization. This work demonstrates that the fertilization membrane formation and the loss of fertilizability in aqueous solutions of different composition are inhibited by protease inhibitors, in particular, leupeptin and aprotinin. The presence of natural protease inhibitors in the ovarian fluid that prevent spontaneous egg activation is proposed. The decrease in the concentration of these inhibitors as the ovarian fluid is diluted in aquatic medium during spawning can explain egg activation in the absence of sperm.

Key words: exocytosis, *Misgurnus fossilis*, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, phorbol 12,13-dibutyrate.