

УДК 591

НЕГОРМОНАЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ *IN VITRO* СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

© 2014 г. Б. Ф. Гончаров, М. Н. Скоблина

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: skoblina38@mail.ru

Поступила в редакцию 25.09.13 г.

Окончательный вариант получен 05.11.13 г.

Увеличение концентрации бикарбоната натрия в растворе Рингера для холоднокровных приводит к тому, что при инкубации овариальных фолликулов осетровых рыб происходит “спонтанное” созревание ооцитов. Созревание ооцитов наблюдается также при добавлении бикарбоната натрия в определенной концентрации к разбавленной среде Лейбовитца. Эффективная пороговая концентрация бикарбоната натрия зависит как от состава среды культивирования, так и, главным образом, от физиологического состояния фолликулов. Как свидетельствуют опыты с актиномицином Д, вызванное ионами бикарбоната созревание ооцитов не зависит от синтеза РНК. При попытке выяснить участие стероидогенеза в запуске “спонтанного” созревания было обнаружено, что и аминоклотатимид, и дилтиозем, и эстрадиол-17 β не только не подавляют, а и способствуют созреванию ооцитов, индуцируемому ионами бикарбоната. Механическое удаление оболочек фолликула показало, что “голые” ооциты сохраняют способность созреть в среде с повышенной концентрацией бикарбоната натрия, однако в более узком диапазоне концентраций, чем при сохранении оболочек фолликула. Для объяснения парадоксального эффекта веществ, влияющих на стероидогенез, предложена гипотеза конкуренции за энергетический ресурс различных процессов, происходящих в фолликуле.

Ключевые слова: осетровые рыбы, ооцит, созревание, *in vitro*, среда культивирования, бикарбонат натрия, стероидогенез.

DOI: 10.7868/S0475145014020050

ВВЕДЕНИЕ

Воспроизведение *in vitro* того или иного биологического процесса является широко используемым подходом при его изучении. Применять этот прием для исследования механизма гормональной регуляции созревания ооцитов осетровых рыб стало возможным после того, как была разработана среда культивирования, в которой удавалось стабильно индуцировать этот процесс гонадотропными препаратами. Было выяснено, что для этого достаточно увеличить до определенного значения концентрацию бикарбоната натрия в классическом растворе Рингера для холоднокровных (Гончаров, 1978). При этом пороговое значение концентрации бикарбоната натрия, обеспечивающее реакцию, может отличаться при работе с овариальными фолликулами разных самок. Обычно оно находится в пределах от 1 до 2 г/л. Было также показано, что по мере увеличения

концентрации бикарбоната натрия растет чувствительность фолликулов к гонадотропным гормонам гипофиза, а, начиная с определенного значения, сама среда приобретает индукционные свойства, то есть, ооциты начинают созревать в ней и в отсутствие гормонов.

Созревание ооцитов при культивировании их в среде, не содержащей гормональные препараты, обычно в литературе называют “спонтанным” созреванием. Существуют три возможных объяснения этого явления: 1) процесс индукции созревания запущен гормонами *in vivo*, а при извлечении фолликулов и их культивировании, происходит лишь завершение этого процесса, не требующее присутствия гормонов, 2) при извлечении фолликулов из тела самки и/или культивировании их в определенной среде происходит высвобождение ооцитов из-под влияния факторов, сдерживающих созревание и 3) какие-то элемен-

ты или свойства культуральной среды способны имитировать действие гормонов, то есть запустить процесс созревания ооцитов.

Хорошо известно, что созревание ооцитов рыб в норме индуцируется гонадотропными гормонами гипофиза, которые действуют на клетки стенки овариального фолликула. В результате этого воздействия вырабатывается стероид, действующий непосредственно на ооцит (см. Masui, Clark, 1979).

Были определенные основания полагать, что наблюдаемое при работе с фолликулами осетровых рыб спонтанное созревание является результатом индукционного воздействия среды, и, в частности, ионов бикарбоната.

Задачей нашего исследования было получить дополнительные данные о природе фактора спонтанного созревания ооцитов осетровых рыб, а также выяснить, что является точкой приложения его действия, и каков его возможный механизм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работы проводились на Краснодарском (Адыгейском) осетровом рыбноводном заводе на фолликулах стерляди (*Acipenser ruthenus*) и севрюги (*Acipenser stellatus*) в течение ряда лет. Овариальные фолликулы извлекали из полости тела самки при помощи металлического щупа и помещали либо в раствор Рингера, модифицированный для осетровых рыб (РМО), содержащий выбранную в зависимости от задачи опыта концентрацию бикарбоната натрия (указана при описании результатов опыта), либо в 75% среду Лейбовитца (75% L-15). После этого их многократно промывали той же средой и раскладывали для инкубации в чашки Петри (диаметром 60 мм) обычно по 30–35 фолликулов на 7.5 мл среды. В тех случаях, когда условия инкубации фолликулов отличались, они приведены в разделе “Результаты”. Инкубацию проводили либо в термостате при температуре $16 \pm 0.5^\circ\text{C}$, либо при комнатной температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

В опытах по изучению механизма спонтанного созревания использовали следующие вещества: аминоклотамид (АМГ) – ингибитор превращения холестерина в прегненолон, актиномицин Д (АД) – ингибитор синтеза РНК, а также дилтиозем – ингибитор кальциевых каналов. Эстрадиол-17 β был использован в качестве естественного ингибитора образования прогестерона (Spiegel et al., 1978). Все указанные вещества и L-15 получены из Сигмы. Фолликулы обрабатывали АД (5 мкг/мл), приготовленном на РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия (в этом РМО ооциты не созревают спонтанно), в темноте в течение 2 ч,

затем отмывали в трех сменах по 25 мл того же РМО. В контроле фолликулы выдерживали 2 ч в РМО с той же концентрацией бикарбоната натрия. По окончании инкубации (обычно через 36–48 часов) фолликулы фиксировали кипячением, а после разрезания ооцитов под биноклем лезвием безопасной бритвы регистрировали присутствие или отсутствие ядра ооцита – зародышевого пузырька (ЗП).

Оболочки фолликула удаляли остро заточенными пинцетами без специальной предварительной обработки, или после предобработки фолликулов бескальциевой средой. В ряде опытов полноту удаления оболочек контролировали под микроскопом после обработки “голых” ооцитов витальными красителями. В одном опыте для гарантированного удаления всех фолликулярных клеток удаляли наружный слой *zona radiata*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние разных концентраций бикарбоната натрия на созревание in vitro ооцитов осетровых рыб

Опыты по изучению влияния разных концентраций бикарбоната натрия на созревание *in vitro* ооцитов были поставлены на фолликулах двух видов осетровых рыб – стерляди и севрюги. В опыте использовали две среды – РМО и среду 75% L-15, в которые были добавлены разные концентрации бикарбоната натрия. Извлеченные из самки фолликулы отмывали, соответственно, РМО, содержащим 0.25 г/л бикарбоната натрия, или 75% L-15, а затем инкубировали в этих средах с разными концентрациями бикарбоната натрия. Результаты опытов, поставленных на трех самках стерляди и трех самках севрюги, представлены на рис. 1 и 2.

Из представленных результатов видно, что процент созревших ооцитов увеличивается с ростом концентрации бикарбоната натрия как в РМО, так и в L-15. У большинства самок не обнаруживаются существенных различий в чувствительности фолликулов к бикарбонату натрия в сравниваемых средах. Тем не менее, у двух самок (рис. 1, самка 1 и рис. 2, самка 1) процент ооцитов, созревших при одинаковых концентрациях бикарбоната натрия, был явно выше в 75% L-15.

Влияние различных ингибиторов стероидогенеза на индуцированное бикарбонатом натрия созревание in vitro ооцитов севрюги

Актиномицин Д. Результаты опытов по влиянию АД на созревание ооцитов севрюги в РМО, содержащем увеличенную концентрацию бикарбоната натрия, представлены в табл. 1. У четырех

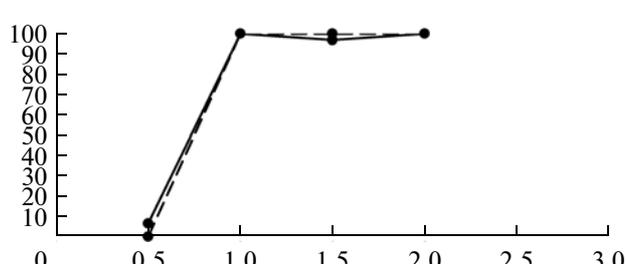
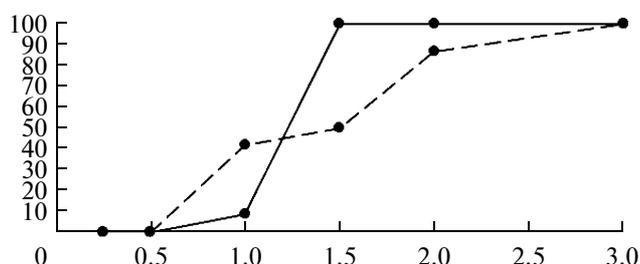
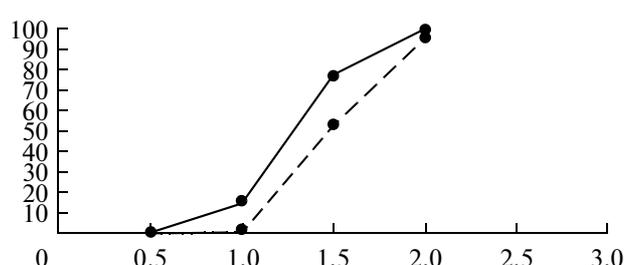
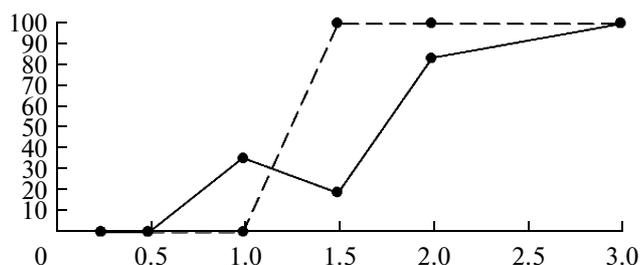
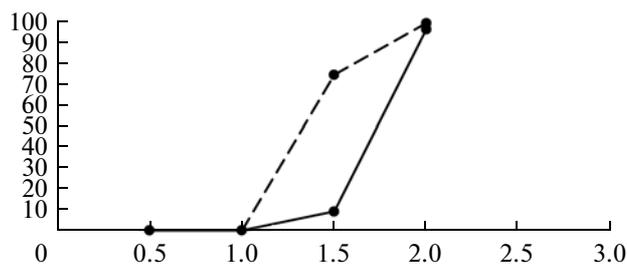
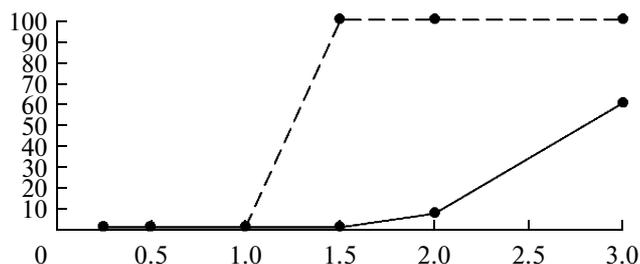


Рис. 1. Влияние разных концентраций бикарбоната натрия на созревание *in vitro* ооцитов стерляди. По оси абсцисс — концентрация бикарбоната натрия (г/л) в модифицированном растворе Рингера (сплошная линия) и в среде Лейбовича (пунктирная линия); по оси ординат — процент созревших ооцитов. Представлены результаты, полученные при культивировании овариальных фолликулов трех самок.

Рис. 2. Влияние разных концентраций бикарбоната натрия на созревание *in vitro* ооцитов севрюги. Обозначения те же, что для рисунка 1.

самок (2–5), ооциты которых созревали в разном проценте случаев в растворе Рингера, содержащем 3 г/л бикарбоната натрия, АД не оказывал

Таблица 1. Влияние актиномицина Д (АД) на созревание *in vitro* ооцитов севрюги

Среда культивирования	Процент созревших ооцитов	
	р-р Рингера, содержащий 3 г/л NaHCO ₃	
АД, 5 мкг/мл	–	+
Самка 1	0.00	0.00
Самка 2	13.33	3.33
Самка 3	46.70	60.00
Самка 4	50.00	46.67
Самка 5	63.33	63.33

статистически достоверного воздействия. В отсутствие “спонтанного” созревания действие АД также никак не проявлялось.

Аминоглутатемид. Результаты, приведенные в табл. 2, показывают, что независимо от того, при какой концентрации бикарбоната натрия происходило “спонтанное” созревание ооцитов, аминоклутатемид (АМГ) в концентрации 100 мкг/мл во всех случаях увеличивал процент созревших ооцитов. Более того, даже если созревания в среде инкубации не было вовсе (самки 3 и 6), обработка фолликулов АМГ приводила к созреванию практически всех ооцитов.

Дилтиозем. У всех исследованных самок при добавлении в среду культивирования ингибитора кальциевых каналов дилтиозема (100 мкМ) происходило увеличение процента созревших ооцитов (табл. 3). Высокий процент созревания ооцитов в присутствии дилтиозема наблюдался даже в тех случаях, когда сама среда не оказывала никакого индуцирующего действия (самки 3 и 4).

Таблица 2. Влияние аминоклутатемида (АМГ) на созревание *in vitro* ооцитов севрюги

Среда культивирования	Процент созревших ооцитов					
	р-р Рингера, содержащий увеличенную концентрацию NaHCO ₃					
	3 г/л		2 г/л		1.5 г/л	
АМГ, 100 мкг/мл	–	+	–	+	–	+
Самка 1	30.0 ± 5.0	100.0 ± 0.0***				
Самка 2	55.0 ± 11.0	90.5 ± 2.5***				
Самка 3			0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0***		
Самка 4			51.5	100.0***		
Самка 5			100.0	100.0		
Самка 6					0.0 ± 0.0	95.5 ± 4.5***
Самка 7					12.0 ± 2.0	100.0 ± 0.0***
Самка 8					12.5 ± 1.5	100.0 ± 0.0***

Здесь и далее звездочки в графе результаты показывают уровень достоверности различий (* – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$).

Таблица 3. Влияние дилтиозема на созревание *in vitro* ооцитов севрюги

Среда культивирования	Процент созревших ооцитов					
	р-р Рингера, содержащий увеличенную концентрацию NaHCO ₃					
	3 г/л		2 г/л		1.5 г/л	
Дилтиозем, 100 мкМ	–	+	–	+	–	+
Самка 1	30.0 ± 5.0	96.5 ± 3.5***				
Самка 2	55.0 ± 11.0	81.0 ± 9.0***				
Самка 3			0.0 ± 0.0	100***		
Самка 4					0.0 ± 0.0	98.5 ± 1.5***
Самка 5					12.0 ± 2.0	100.0 ± 0.0***
Самка 6					12.5 ± 1.5	100.0 ± 0.0***

Эстрадиол-17β. Добавление в среду культивирования фолликулов 10 мкг/мл эстрадиола-17β во всех случаях вызывало достоверное увеличение процента созревших ооцитов (табл. 4). Максимальный или близкий к максимуму процент созревших ооцитов наблюдался даже в тех случаях, когда в среде “спонтанного” созревания не было (самки 3 и 4).

*Влияние удаления оболочек фолликула на способность ооцитов осетровых рыб созреть *in vitro* под влиянием сред, содержащих бикарбонат натрия*

Опыты по механическому удалению оболочек фолликула показали, что инкубация “голых” ооцитов в растворе Рингера, содержащем 3 г/л бикарбоната натрия, либо вовсе не приводит к со-

Таблица 4. Влияние эстрадиола-17 β на созревание *in vitro* ооцитов севрьюги

Среда культивирования	Процент созревших ооцитов					
	р-р Рингера, содержащий увеличенную концентрацию NaHCO ₃					
	3 г/л		2 г/л		1.5 г/л	
Эстрадиол 17- β , 10 мкг/мл	–	+	–	+	–	+
Самка 1	30.0 \pm 5.0	85.0 \pm 15.0***				
Самка 2	55.0 \pm 11.0	100.0***				
Самка 3			0.0 \pm 0.0	93.0***		
Самка 4					0.0 \pm 0.0	100.0***
Самка 5					12.0 \pm 2.0	100.0***
Самка 6					12.5 \pm 1.5	100.0 \pm 0.0***

Таблица 5. Влияние удаления оболочек фолликула на способность ооцитов севрьюги созреть *in vitro* под влиянием сред, содержащих бикарбонат натрия

Среда культивирования	Процент созревших ооцитов			
	р-р Рингера, содержащий 3 г/л NaHCO ₃		среда Лейбовитца 75%, + 2 г/л NaHCO ₃	
	+	–	+	–
Наличие оболочек				
Самка 1	86.7	0.0		
Самка 1*	87.5	0.0		
Самка 2	90.0	0.0		
Самка 3	100.00	9.09	100.00	100.00
Самка 4	0.00	0.00	100.00	100.00

* Удаление оболочек после предобработки фолликулов бескальциевой средой.

зреванию ооцитов, либо созревание наблюдается в небольшом проценте случаев (табл. 5 и 6). В то же время культивирование интактных фолликулов тех же самок в большинстве случаев заканчивается созреванием ооцитов в очень высоком, или даже максимальном проценте случаев. Картина кардинально меняется, если “голые” ооциты инкубируются в 75% L-15, содержащем 2 г/л бикарбоната натрия. Для всех самок процент созревших ооцитов оказывается статистически неотличимым от такового в контроле. Следует отметить, что 75% L-15, содержащая 2 г/л бикарбоната натрия, при инкубации интактных фолликулов оказывала не меньший, а иногда (табл. 5, самка 4)

и существенно больший эффект на созревание ооцитов, чем РМО, содержащий 3 г/л бикарбоната натрия. Более того, в одном из опытов мы добавили в 75% L-15 всего 1 г/л бикарбоната натрия и получили созревание ооцитов и в контроле, и в опыте, хотя и в не очень высоком проценте случаев (табл. 6, самка 5). Еще один результат, важный для интерпретации опытов по удалению оболочек фолликула был получен при инкубации фолликулов и “голых” ооцитов в РМО, содержащем 2 г/л бикарбоната. И в контроле, и в опыте ооциты созрели в высоком проценте случаев (табл. 6, самка 8).

Таблица 6. Влияние удаления оболочек фолликула на способность ооцитов севрюги созреть *in vitro* под влиянием сред, содержащих бикарбонат натрия

Среда культивирования	Процент созревших ооцитов			
	р-р Рингера, содержащий 3 г/л NaHCO ₃		среда Лейбовитца 75%, +2 г/л NaHCO ₃	
	+	–	+	–
Наличие оболочек				
Самка 1			75.0	100.0
Самка 2			100.0	100.0
Самка 3 (1-й срок)	14.3	4.8	95.5	100.0
Самка 3 (2-й срок)			100.0	100.0
Самка 3 (3-й срок)	95.2	0	100.0	86.7
Самка 4	100	19		
Самка 5*			26.1	27.3
Самка 6			100.0	100.0
Самка 7			100.0	100.0
Самка 8**	92.3	95.0		

* Ооциты и фолликулы этой самки инкубировали в среде Лейбовитца 75%, содержащей 1 г/л NaHCO₃.

** Ооциты и фолликулы этой самки инкубировали в растворе Рингера, содержащем 2 г/л NaHCO₃.

В опыте на десяти фолликулах севрюги, в котором клеточные оболочки фолликула были удалены вместе с наружным слоем *zona radiata*, после инкубации в 75% L-15 с 2 г/л бикарбоната натрия созрели все ооциты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из трех возможных, приведенных во введении объяснений явления спонтанного созревания ооцитов *in vitro* для осетровых рыб проще всего отклонить первое, так как известно, что при содержании в неволе без создания специальных условий, имитирующих условия, в которых в природе происходит нерест, в самке практически никогда не происходит запуск созревания яйцеклеток. Хирургическое вмешательство и манипуляции, связанные с извлечением фолликулов, также не являются факторами, стимулирующими созревание ооцитов в самке, так как к моменту, когда ооциты данной самки спонтанно созревают *in vitro*, ооциты, остающиеся в теле, по-прежнему сохраняют ЗП. Выбор между двумя другими возможностями более сложен, так как среда, в которой происходит спонтанное созревание, теоретически может, как стимулировать цепь событий, приводящих к созреванию, так и снимать подавляющее действие, если таковое имеется в преде-

лах фолликула. Таким образом, для понимания сути явления необходимо выяснение механизма влияния среды на фолликул.

В качестве первого шага на этом пути нами была поставлена задача уточнить, какой компонент или какая характеристика культуральной среды является определяющей в проявлении ею индукционных свойств и на каком уровне происходит его действие – на уровне клеток стенки фолликула, как в случае действия гонадотропного гормона (ГТГ) гипофиза, или на уровне самого ооцита, как в случае действия мейоз-индуцирующего стероида (МИС) – посредника действия ГТГ.

Ранее (Гончаров и др., 1997) было показано, что из всех изученных сред, по сути являющихся различными модификациями раствора Рингера для холоднокровных, наиболее выраженными индукционными свойствами обладают среды с увеличенной концентрацией бикарбоната натрия. В этой работе мы попытались выяснить, приобретет ли после добавления бикарбоната натрия индукционные свойства 75% L-15, в которой ранее никогда не наблюдали спонтанного созревания. Ответ оказался положительным и дозозависимым (рис. 1 и 2). Было показано также, что пороговая концентрация, при которой происходит созревание ооцитов, различна для разных са-

мок и, либо не отличается при сравнении культуральных сред, приготовленных на основе раствора Рингера или 75% L-15, либо в 75% L-15 активны меньшие концентрации бикарбоната натрия. Следует отметить также, что ооциты, созревающие в РМО, содержащем высокую концентрацию бикарбоната натрия, к концу срока инкубации повреждаются гораздо чаще, чем ооциты той же самки, созревшие в 75% L-15 в присутствии той же концентрации бикарбоната натрия.

В наших опытах критерием созревания являлось разрушение оболочки ЗП, что, очевидно, является недостаточным для суждения о том, насколько нормальным является созревание, индуцированное средой. Окончательный ответ можно было бы получить, если бы удалось осеменить созревшие в не содержащей гормоны среде яйцеклетки и проверить их способность к развитию. Предварительные опыты по осеменению ооцитов, созревших под влиянием бикарбоната натрия, у которых были удалены оболочки фолликула, не позволили получить дробящиеся яйцеклетки. Причиной этого, однако, может быть не качество яйцеклеток, а невозможность проникновения сперматозоидов из-за того, что при механическом удалении оболочек фолликула микропиле могут быть закрыты остающимися в них отростками фолликулярных клеток. Основанием для такого суждения является то, что такие яйцеклетки не повреждались при помещении их в воду и даже начинали партеногенетическое развитие.

Для того чтобы ответить на вопрос о точке приложения действия ионов бикарбоната, в работе были использованы два подхода. Во-первых, мы проверили влияние ингибиторов, которые подавляют действие ГТГ на созревание ооцитов, но не оказывают влияния на созревание, вызываемое МИС. Во-вторых, были поставлены опыты по удалению оболочек фолликула.

Опыты, проведенные с АД, однозначно показали, что на созревание ооцитов в среде, содержащей повышенную концентрацию бикарбоната натрия, в отличие от созревания, вызываемого ГТГ, этот ингибитор не оказывает никакого действия. АД не подавлял также спонтанное созревание окруженных фолликулярными оболочками ооцитов данио (*Danio rerio*) (Pang, Ge, 1999).

Для того чтобы ответить на вопрос, не является ли МИС посредником действия среды, как и в случае ГТГ, был использован АМГ. Это ингибитор подавляет образование прегненолона, а, следовательно, и прогестагенов, которые являются наиболее вероятными кандидатами на роль природного МИС у осетровых рыб, (Lutes, 1985; Amiri et al., 1999; Webb et al., 2002). Можно было ожидать либо отсутствия эффекта АМГ, либо подав-

ления спонтанного созревания окруженных фолликулярными оболочками ооцитов (как это наблюдается у травяной лягушки) (Скоблина, не опубликовано), однако, в наших опытах этот ингибитор увеличивал процент созревших ооцитов. Следует отметить, что созревание ооцитов тех же самок, стимулированное экстрактом гипофиза осетровых рыб, подавлялось той же концентрацией АМГ (данные не приведены). Из этого следует, что механизм действия бикарбоната натрия не идентичен действию ГТГ. С этим выводом согласуется и отсутствие в наших опытах подавляющего действия эстрадиола-17-β на стимулированное бикарбонатом созревание ооцитов. С чем связано стимулирующее действие АГТ и эстрадиола-17-β на вызываемое ионом бикарбоната созревание ооцитов остается не вполне понятным. К возможному объяснению этих эффектов мы вернемся после обсуждения всех полученных результатов.

Мы использовали также ингибитор кальциевых каналов — дилтизем. Ранее (Kleis-San Francisco, Schuetz, 1986) было показано, что другой ингибитор кальциевых каналов — верапамил подавляет стероидогенез в фолликулах леопардовой лягушки (*Rana pipiens*). При этом происходит подавление созревания ооцитов, индуцируемое гомогенатом гипофиза, но не прогестероном (Kleis-San Francisco, Schuetz, 1986). В другой работе (Молотковская, Скоблина, 1999) было показано, что дилтизем способен подавлять спонтанное созревание ооцитов травяной лягушки (*Rana temporaria*). В наших же опытах на фолликулах осетровых рыб вместо ожидаемого подавления или отсутствия действия, мы вновь получили стимулирующий эффект.

Из опытов с ингибиторами следует, что действие ионов бикарбоната не идентично действию гонадотропинов на созревание и, следовательно, либо точкой приложения их действия являются не клетки стенки фолликула, либо в основе их действия лежит другой механизм, не связанный с образованием МИС в качестве посредника.

Второй подход к выяснению точки приложения действия среды культивирования, содержащей бикарбонат натрия, на созревание ооцитов, а именно, удаление оболочек фолликула, должен был дать однозначный ответ, однако, и здесь все оказалось не так просто. Результаты первых опытов, в которых лишённые фолликулярных оболочек ооциты помещали в РМО с увеличенным содержанием бикарбоната натрия, на первый взгляд, свидетельствовали о том, что среда действует не прямо на ооцит, а опосредовано через клетки стенки фолликула. Однако смушали два момента. Во-первых, в некоторых опытах все-таки, хотя и в небольшом проценте случаев, мы наблюдали созревание “голых” ооцитов, а, во-вто-

рых, при использовании витальных красителей и дальнейшей проверке полноты удаления оболочек под микроскопом, мы убедились, что при механическом удалении на поверхности ооцита могут оставаться фолликулярные клетки.

Интересно, что при инкубации “голых” ооцитов в 75% L-15 с бикарбонатом натрия результат оказался противоположным — процент созревших ооцитов не отличался от процента созревших контрольных ооцитов, окруженных оболочками фолликула.

Окончательный ответ о точке приложения действия бикарбонатных ионов был получен после того, как мы провели трудоемкую микрохирургическую операцию, удаляя стенку фолликула вместе с наружным слоем *zona radiata*, и, таким образом, полностью исключили присутствие на поверхности ооцита даже единичных фолликулярных клеток. И такие гарантировано “голые” ооциты созрели. Таким образом, было получено окончательное доказательство возможности индукции созревания ооцитов осетровых рыб средой, содержащей бикарбонат натрия, без участия клеток оболочки фолликула.

Отсутствие же “спонтанного” созревания при помещении “голых” ооцитов в РМО было связано, скорее всего, с тем, что лишённые оболочек ооциты не выдерживают повреждающего действия высокой концентрации бикарбоната натрия, тогда как в интактных фолликулах ооциты не повреждаются и способны созреть под действием бикарбонатных ионов.

Как это стало понятно позже, в опытах с “голыми” ооцитами в случае РМО и 75% L-15 мы не вполне оправданно использовали разные концентрации бикарбоната натрия. Это было связано с тем, что мы начинали опыты, используя РМО, содержащий 3 г/л бикарбоната натрия, и сохраняли эти условия для того, чтобы в дальнейшем получить сопоставимые данные для разных самок. Напротив, убедившись в том, что добавление в 75% L-15 уже 2 г/л бикарбоната натрия делает ее индукционной для фолликулов большинства самок, мы использовали именно эту концентрацию в опытах с “голыми” ооцитами. В последнем опыте, проведенном на фолликулах стерляди (табл. 6, самка 8), мы снизили концентрацию бикарбоната натрия и в РМО до 2 г/л и получили очень высокий, неотличимый от контроля процент созревших ооцитов с удаленными фолликулярными оболочками.

Ранее (Robinson, 1979) возможность индукции *in vitro* созревания “голых” ооцитов увеличенной концентрацией бикарбонатных ионов, добавленных к раствору Штейнберга, была показана для спорцевой лягушки (*Xenopus laevis*).

Итак, выяснив, что бикарбонат натрия при определенной концентрации способен вызывать созревание ооцитов осетровых рыб, действуя на сам ооцит, мы можем вернуться к обсуждению неожиданных результатов, полученных в опытах с ингибиторами стероидогенеза. Напомним, что вместо ожидаемого подавления созревания или отсутствия влияния во всех случаях мы получили стимулирующий эффект.

Созревание ооцитов является энергозатратным процессом. Если мы ограничим поступление кислорода к инкубируемым фолликулам, то даже созревание, вызываемое прогестероном (как и в этой работе определяемое по разрушению оболочки ЗП), может быть замедлено или подавлено. Созревание же, вызываемое гонадотропными гормонами, еще более чувствительно к дефициту кислорода (см. Гончаров, 2003). Эта разница может быть объяснена тем, что гонадотропины стимулируют процесс стероидогенеза, который, как известно также нуждается в энергетическом обеспечении (Midzak et al., 2011). Клетки стенки фолликула активно поддерживают процессы, происходящие в ооцитах, снабжая их пластическими веществами и источниками энергии.

То, что бикарбонатный ион способен действовать прямо на ооцит, вызывая его созревание у осетровых рыб, вовсе не отменяет возможности его действия и на клетки стенки фолликула. Известно стимулирующее влияние этого аниона на аденилатциклазу сперматозоидов млекопитающих (Bhattacharyya, Yanagimachi, 1988; Beltrán et al., 2007). Действие гонадотропинов на стероидогенез также связано с активацией аденилатциклазы. Если представить, что ион бикарбоната запускает сразу два энергопотребляющих процесса — стероидогенез в клетках стенки фолликула и процесс, связанный с созреванием в самом ооците, то вполне вероятно возникновение конкуренции за источники энергии. Подавляя стероидогенез либо ингибиторами, либо его конечным продуктом — эстрадиолом 17-β, мы можем способствовать перераспределению энергетического пула в пользу процесса созревания, запущенного в ооците бикарбонатным ионом.

В этой связи интересно отметить работу, в которой было показано, что обработка митохондрий, изолированных из клеток желтого тела свиньи, АМГ не только подавляет стероидогенез, а и увеличивает синтез АТФ (Dimino et al., 1980)

Наличие связи между способностью к “спонтанному” созреванию и дыхательной активностью фолликула была показана для песчаной жабы (*Bufo arenarum*) (Zelarayan et al., 1995). Правда в этом случае речь идет о другом типе “спонтанного” созревания, происходящего после удаления оболочек фолликула.

Механизм запуска созревания ооцитов осетровых рыб и шпорцевой лягушки ионами бикарбоната пока не ясен. У шпорцевой лягушки не обнаружен механизм его доставки внутрь ооцита (Burekhardt et al., 1992).

Продолжение изучения механизма негормональной стимуляции созревания ооцитов представляется интересным, так как его раскрытие может в дальнейшем как пополнить наши знания относительно сигнальных путей, задействованных в этом процессе, так и привлечь внимание к возможной роли простых неорганических молекул в его регуляции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гончаров Б.Ф. Влияние состава среды культивирования на способность фолликулов осетровых рыб реагировать созреванием на действие гонадотропных гормонов // В сб. "Вопросы раннего онтогенеза у рыб". Наукова Думка, Киев, 1978. С. 77–78.
- Гончаров Б.Ф. Использование модельной системы гормональной стимуляции созревания и овуляции *in vitro* ооцитов осетровых рыб для решения некоторых фундаментальных и прикладных проблем // Онтогенез. 2003. Т. 34. С. 102–111.
- Гончаров Б.Ф., Полупан И.С., Вийо П. и др. Влияние состава среды культивирования на созревание ооцитов осетровых рыб, индуцируемое гонадотропными гормонами и прогестероном // Онтогенез. 1997. Т. 28. С. 55–64.
- Молотковская И.М., Скоблина М.Н. Влияние состава среды культивирования на концентрацию свободных ионов кальция в клетках стенки фолликулов травяной и шпорцевой лягушек // Онтогенез. 1999. Т. 30. С. 229–233.
- Amiri B.M., Maebayashi M., Adachi S. et al. *In vitro* steroidogenesis by testicular fragments and ovarian follicles in a hybrid sturgeon Bester // Fish Physiol. Biochem. 1999. V. 21. P. 1–14.
- Beltrán C., Vacquier V.D., Moy G. et al. Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 358. P. 1128–1135.
- Bhattacharyya A., Yanagimachi R. Synthetic organic pH buffers can support fertilization of guinea pig eggs, but not as efficiently as bicarbonate buffer // Gamete Res. 1988. V. 19. P. 123–129.
- Burekhardt B.C., Kroll B., Fromter E. Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes // Pflügers Arch. 1992. V. 420. P. 78–82.
- Dimino M.J., Chavis T.R., Downing J.R. A relationship between adenosine 5'-triphosphate and pregnenolone syntheses by ovarian mitochondria as demonstrated with aminoglutethimide // Endocrinology. 1980. V. 106. P. 1528–1531.
- Kleis-San Francisco S., Schuetz A.W. Calcium effects on progesterone accumulation and oocyte maturation in cultured follicles of *Rana pipiens* // J. Exp. Zool. 1986. V. 240. P. 265–273.
- Lutes P.B. Oocyte maturation in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: some mechanisms and applications // Environ. Biol. Fish. 1985. V. 14. P. 87–92.
- Masui Y., Clarke R. Oocyte maturation // Int. Rev. Cytol. 1979. V. 57. P. 185–282.
- Midzak A.S., Chen H., Aon M.A. et al. ATP synthesis, mitochondrial function, and steroid biosynthesis in rodent primary and tumor Leydig cells // Biol. Reprod. 2011. V. 84. P. 976–85.
- Pang Y., Ge W. Activin stimulation of zebrafish oocyte maturation *in vitro* and its potential role in mediating gonadotropin-induced oocyte maturation // Biol. Reprod. 1999. V. 61. P. 987–992.
- Robinson K.R. Electrical currents through full-grown and maturing *Xenopus* oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 837–41.
- Spiegel J., Jones E., Snyder B.W. Estradiol-17 β interference with meiotic maturation in *Rana pipiens* ovarian follicles: evidence for inhibition of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase // J. Exp. Zool. 1978. V. 204. P. 187–191.
- Webb M.A., Feist G.W., Trant J.M. et al. Ovarian steroidogenesis in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) during oocyte maturation and induced ovulation // Gen. Comp. Endocrinol. 2002. V. 129. P. 27–38.
- Zelarayan L., Oterino J., Buhler M.I. Spontaneous maturation in *Bufo arenarum* oocytes: follicle wall involvement, respiratory activity, and seasonal influences // J. Exp. Zool. 1995. V. 272. P. 356–362.

Nonhormonal Stimulation In Vitro of Oocyte Maturation in Sturgeons

B. F. Goncharov and M. N. Skoblina

Koltsov Institute of Developmental Biology, ul. Vavilova 26, Moscow 119334 Russia
e-mail: skoblina38@mail.ru

Received September 25, 2013; in final form, November 5, 2013

Abstract—Incubation of sturgeon full-grown ovarian follicles in amphibian Ringer solution with increased sodium bicarbonate concentration results in "spontaneous" oocyte maturation. Addition of sodium bicarbonate to diluted Leibovitz medium also induces maturation of follicle-enclosed oocytes. Effective threshold concentration of sodium bicarbonate depends on the composition of culture medium and, especially, on the

physiological state of follicle-enclosed oocytes. As evidenced by experiments with actinomycin D, oocyte maturation induced by bicarbonate ions does not depend on RNA synthesis. An attempt was made to elucidate the involvement of steroidogenesis in bicarbonate ion-induced oocyte maturation. Surprisingly, the inhibitors used, such as aminogluthetimide, diltiazem, and estradiol-17 β , not only did not inhibit but also enhanced oocyte maturation. Manual removal of follicle envelopes demonstrated that denuded oocytes retained the ability to mature in a culture medium with increased sodium bicarbonate concentration. However, the range of effective bicarbonate ion concentrations for denuded oocytes is more restricted than for the follicle-enclosed oocytes. A hypothesis of competition of different processes occurring in the ovarian follicle for energy resources is proposed to explain the revealed paradoxical effect of substances affecting steroidogenesis.

Keywords: sturgeons, oocyte, maturation, in vitro, culture medium, sodium bicarbonate, steroidogenesis