ОНТОГЕНЕЗ, 2015, том 46, № 3, с. 198–206

ГАМЕТОГЕНЕЗ

УДК 591.3:597.5

ГОРМОНАЛЬНАЯ ИНДУКЦИЯ СОЗРЕВАНИЯ И ОВУЛЯЦИИ *IN VITRO* ООЦИТОВ ВЬЮНА И ПОЛУЧЕНИЕ ЯЙЦЕКЛЕТОК, СПОСОБНЫХ К ОПЛОДОТВОРЕНИЮ И РАЗВИТИЮ

© 2015 г. М. Н. Скоблина, А. А. Минин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: skoblina38@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.2014 г.

Окончательный вариант получен 30.12.2014 г.

Достигшие дефинитивного размера ооциты вьюна, окруженные фолликулярными оболочками, под влиянием 1 мкг/мл прогестерона способны созревать и овулировать в 75% среде Лейбовитца с 1 г/л бикарбоната натрия или с pH, доведенным до 9.0 1 N едким натром. При добавлении в среду инкубации 20% сыворотки крупного рогатого скота осемененные яйца развиваются до стадии сформированной предличинки. Замена сыворотки крупного рогатого скота 10–20% полостной жидкостью вьюна или 20% полостной жидкостью карпа обеспечивает более полноценное развитие осемененных яиц до стадии предличинок, переходящих на активное питание.

Ключевые слова: фолликулы, ооциты, прогестерон, полостная жидкость, созревание, овуляция, переход предличинок на активное питание, вьюн *Misgurnus fossilis*.

DOI: 10.7868/S0475145015030076

ВВЕДЕНИЕ

Если ооциты костистых рыб, созревшие и овулировавшие в результате гормональной обработки *in vitro*, после оплодотворения развиваются до стадии вылупления предличинок, способных перейти на активное питание, значит условия, в которых они созревали и овулировали близки к таковым *in vivo*. Создается возможность для воспроизведения и изучения механизмов процессов, происходящих в ооцитах в теле самки. Понятно, поэтому, как важно знать эти условия.

Созревание ооцитов костистых рыб *in vitro* хорошо исследовано и было воспроизведено у многих видов (Nagahama, Yamashita, 2008). Овуляцию их ооцитов *in vitro* удается получить значительно реже (Скоблина, 2009), а способность ооцитов, овулировавших вне тела самки, к развитию после оплодотворения до более или менее продвинутых стадий до сих пор удалось получить только у четырех видов рыб: вьюна (*Misgurnus fossilis*) (Саат, 1980, 1982, 1985), карпа (*Cyprinus carpio*) (Epler, 1981; Саат, 1988), медаки (*Oryzias latipes*) (Ogiwara et al., 2013) и японского угря (*Anguilla japonica*) (Abe et al., 2010). Во всех этих работах фолликулы были взяты на стадии, когда в отсутствие гормональной обработки ооциты не созревают и не овулируют *in vitro*.

Достигшие дефинитивного размера ооциты вьюна в среде 199 с 20% сывороткой крупного рогатого скота (СКРС) под влиянием прогестерона и хориогонина созревали и овулировали в высоком проценте случаев, а после осеменения начинали дробиться (Саат, 1980). Они оказались способны к развитию до стадии образования сомитов (Саат, 1982). Упоминается, что единичные зародыши достигали стадии вылупления (Саат, 1985). Невысокий процент вылупившихся предличинок получен и после осеменения овулировавших *in vitro* ооцитов карпа, но у этого вида овуляцию ооцитов удавалось получить, только добавляя в среду простагландин $F_{2\alpha}$ (Саат, 1988). В работе Фужимори с соавторами (Fujimori et al., 2011) показано, что самые крупные ооциты медаки в 90% среде 199 (pH 7.4) овулировали под влиянием рекомбинантного ЛГ медаки и после осеменения развивались только до стадии бластулы (Ogiwara et al., 2013). Завершившие вителлогенез ооциты японского угря в среде Кортланда с 0.5–1% BCA созревали под влиянием 17α, 20β-ДГП, овулировали под влиянием простагландина $F_{2\alpha}$ и после осеменения зародыши в небольшом проценте случаев достигали стадии вылупления, но предличинки погибали, не переходя на активное питание (Abe et al., 2010).

Кроме того, что для овуляции *in vitro* ооцитов костистых рыб в некоторых случаях приходится создавать специальные условия, отличные от условий созревания, успешному развитию их за-

родышей препятствует спонтанная активация, происходящая при попадании овулировавших ооцитов в среду инкубации и делающая невозможным их оплодотворение (Минин, Озерова, 2008). Необходимо отметить, однако, что хотя спонтанная активация характерна для яиц большинства костистых рыб, у разных видов она происходит через разное время после овуляции (Гинзбург, 1968). Поэтому в некоторых случаях овулировавшие ооциты могут быть оплодотворены без создания для этого специальных условий, препятствующих активации (Abe et al., 2010; Ogiwara et al., 2013). Активация овулировавших *in vivo* ооцитов вьюна происходит приблизительно в течение 10 мин после их перенесения в водные растворы различного солевого состава (Минин, Озерова, 2008), что, учитывая асинхронность овуляции ооцитов, не позволяет получить оплодотворение сколько-нибудь значительного количества яиц, не подавляя их спонтанную активацию.

Известно, что спонтанную активацию яиц вьюна могут подавлять ингибиторы протеаз (Минин и Озерова, 2008). Показано также, что различные ингибиторы протеаз присутствуют в сыворотке крови (Knoll-Gellida et al., 2006) и в полостной жидкости рыб (Coffman, Goetz, 1998; Минин, Озерова, 2008). Добавление сыворотки крови или полостной жидкости в среду культивирования препятствует активации ооцитов и делает возможным их оплодотворение (Corley-Smith et al., 2006; Минин, Озерова, 2008).

Задачей настоящей работы было попытаться найти условия инкубации и гормональной обработки фолликулов вьюна, которые обеспечивают эффективность созревания и овуляции ооцитов *in vitro* на фоне предотвращения спонтанной активации ооцитов. Оценивалось количество созревших и овулировавших ооцитов, которые могут нормально развиваться после оплодотворения до стадии вылупления и далее до конечной стадии, на которой мы проводили оценку результатов, – перехода предличинок на активное питание.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проведены в мае 2012 г., в январе–мае 2013 г. и в марте–апреле 2014 г. на фолликулах (окруженных фолликулярными оболочками ооцитах) 16 самок вьюна. Отловленных поздней осенью и в начале зимы самок и самцов содержали отдельно в аквариумах с отстоянной водой в холодильнике при 4°С. Размеры самок составляли от 17 до 22 см. Яичники извлекали из самок, анестезированных 0.2% MS-222 (“Sigma”) и переносили в охлажденную до 4°С 75% среду Лейбовитца (Л75).

Каждый яичник разделяли отточенными пинцетами на 8–12 частей в зависимости от его размера и помещали в холодильник. Одну часть переносили в чашку Петри с 10 мл Л75 без бикарбоната натрия и разделяли на фрагменты, содержащие 5–15 фолликулов. Так постепенно разделяли оба яичника, и все фолликулы собирали в чашке Петри с 9 мл среды. Из этой чашки часть фрагментов переносили в другую такую же с охлажденной средой, под бинокуляром отсчитывали обычно по 100–150 фолликулов и переносили их в чашки Петри с 5 мл среды. Чашки опять ставили в холодильник. Среду в чашке, где считали фолликулы, меняли на охлажденную каждые 10 мин. После того, как в холодильнике накапливалось число чашек, необходимое для конкретного опыта, их одновременно переносили в термостат с 16–17°С. В это время фолликулы переносили в среды, влияние которых исследовали в опыте.

Мы использовали несколько сред инкубации: среду 199, среду Л75 (pH 7.7), (исходную среду Лейбовитца разводили водой 3 : 1), среду Л75 с 1 г/л NaHCO3 (pH 7.8) (Л75б), среду Л75 с pH, доведеным до 9 добавлением 1 N раствора NaOH (Л75, pH 9), 90% среду Лейбовитца (Л90, pH 7.7) (Л90), среду Л90 с 1 г/л NaHCO3 (pH 7.8) (Л90б), среду Л90 с pH, доведеным 1 N раствором NaOH до 9.0 (Л90, pH 9). Кроме того, в среды добавляли либо 20% сыворотки крупного рогатого скота (СКРС), либо 10 или 20% полостной жидкости (ПЖ) вьюна или 20% ПЖ карпа, а к среде Л75 с бикарбонатом натрия еще и фетальную сыворотку. pH сред измеряли после добавления в них СКРС или ПЖ. Во все среды добавляли гентамицин (100 мкг/мл).

Для стимуляции созревания и овуляции использовали прогестерон (П) (Sigma) и в некоторых опытах хорионический гонадотропин человека (ХГ) (Московский эндокринный завод). Прогестерон использовали в концентрации 1 мкг/мл. ХГ использовали в концентрации 25 МЕ/мл. Гормональные препараты добавляли непосредственно перед помещением чашек с фолликулами в термостат. СКРС (ПанЭко), ПЖ вьюна (10–20%) или карпа (20%) обычно добавляли через 30 мин после гормональных препаратов. Изменение времени их внесения отмечено в результатах. Приготовление полостной жидкости вьюна описано ранее (Минин, Озерова, 2008).

Просмотр чашек для определения начала овуляции обычно начинали через 12–15 ч после начала опыта. Овулировавшие *in vitro* ооциты переносили в чашки Петри с 7.5 мл той же среды, в которой они овулировали, пипеткой отсасывали среду инкубации и осеменяли (Костомарова, Нейфах, 1964). Осеменение проводили в несколько приемов. Первое осеменение – через 1–2 ч после появления первых овулировавших ооцитов, а затем обычно с интервалом в 2 ч. Последнее осеменение в первых опытах проводили через 48 ч после начала гормональной обработки, но в дальнейшем не позже, чем через сутки. Через 2.5–3 ч осемененные ооциты просматривали и удаляли неоплодотворенные (побелевшие) яйца, осталь-

Плавающие инкубаторы в аквариуме с продувкой.

ные переносили в чашку Петри с 9 мл воды и ставили в термостат ($t = 16–17°C$). Воду в чашках меняли 2–3 раза в сутки, одновременно удаляя погибших зародышей. В первых опытах все развитие проходило в условиях стационарной культуры – в чашках Петри в термостате. В дальнейшем яйца, обычно на стадии гаструляции, переносили в плавающие инкубаторы и помещали их в аквариум с продувкой (рисунок). Это позволяло не менять воду в процессе инкубации яиц. Результаты опытов учитывали на стадии дробления (чаще всего на стадии 4 бластомеров, но иногда и на более поздних стадиях дробления), стадии завершения обрастания, стадии сформировавшейся предличинки и стадии вылупления. В таблицы включено только число вылупившихся нормально развитых предличинок, вылупившихся уродливых – не учитывали. Вылупившихся предличинок четырех самок через 5–7 дней после вылупления переносили в разные камеры с продувкой и кормили декапсулированными яйцами артемии. О начале активного питания судили по появлению в кишечнике хорошо видных оранжевых яиц. Использование в качестве корма предличинок артемии, развивающихся из недекапсулированных яиц нецелесообразно, поскольку попадание в кишечник предличинок вьюна отдельных недекапсулированных яиц артемии приводит к их гибели.

Получение овулировавших *in vivo* ооцитов вьюна описано ранее (Костомарова, Нейфах, 1964).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты опытов, проведенных на фолликулах восьми самок вьюна, сведены в табл. 1. В первых трех опытах мы осеменяли все собранные овулировавшие ооциты. Оказалось, что из ооцитов, овулировавших в интервале 24–48 ч только единичные начинали дробиться, но вскоре погибали. Поэтому в таблицы включены только данные, полученные в результате оплодотворения ооцитов, овулировавших до 24 от начала гормональной обработки.

Влияние разных сред культивирования на созревание и овуляцию ооцитов вьюна *in vitro*, проведенные в таблице 1, показывает, что наилучше результаты в присутствии СКРС получаются при использовании 75% среды Лейбовитца с pH 9.0 или при добавлении 1 г/л бикарбоната натрия. Однако следует отметить, что достоверность различий невелика из-за высокой вариабильности результатов, полученных на разных самках. Доведение pH среды Лейбовитца до 9 (самки 6 и 7) приводит к резкому увеличению всех показателей – от процента овуляции ооцитов до процента вылупившихся предличинок.

Добавление к среде наряду с прогестероном хориогонина в большинстве случаев увеличивало процент овулировавших ооцитов, но иногда приводило к снижению процента вылупившихся предличинок (особенно самки 2, 3 и 4).

Как уже упоминалось, в опытах Т. Саата (Саат, 1982) было обнаружено, что при инкубации фолликулов вьюна в среде 199, содержащей 20% СКРС, после осеменения созревших и овулировавших ооцитов стадии образования сомитов в лучших случаях достигали $55 \pm 9\%$ оплодотворенных ооцитов, но только у трех из пяти самок. Поэтому возникло предположение о том, что гораздо более низкий процент развивающихся зародышей в той же среде в наших опытах, связан с

Таблица 1. Влияние среды и гормональной обработки на дробление, развитие зародышей и вылупление предличинок вьюна. Во все среды добавлена 20% СКРГ через 30 мин после гормонов

Номер самки	Общее число фолликулов	Среда	Гормональная обработка	Процент овулировавших ооцитов	Процент дробящихся зародышей*	Процент зародышей на стадии гаструляции*	Процент сформированных предличинок*	Процент вылупившихся предличинок*
1	142	Л90	П	14 ± 3	95	20	0	0
	128	Л90	П + ХГ	31 ± 13	55	22	2	0
	154	Л90б	П	12 ± 2	100	11	0	0
	137	Л90б	П + ХГ	39 ± 1.5	96	23	0	0
	138	Л75	П	21 ± 7	96	65	24	14
	143	Л75	П + ХГ	30.5 ± 1.5	100	73	43	34
	146	Л75б	П	45.5 ± 4.5	62	23	20	11
	120	Л75б	П + ХГ	65 ± 5	77	38	20	10
	147	199	П	62 ± 2.5	67	17	11	1
	118	199	П + ХГ	64 ± 8	100	49	12	0
2	127	Л75б	П	32	19	7	7	5
	138	Л75б	П + ХГ	60	8	2	2	0
3	105	Л75б	П	72	35.5	34	33	24
	115	Л75б	П + ХГ	80	51	41	25	0
4	100	Л75	П	40	60	37.5	35	10
	119	Л75	П + Х	33	36	20.5	2.6	0
	120	199	П	75	37	1	1	0
	115	199	П + ХГ	61	40	0	0	0
	116	Л90, pH 9	П	48	50	18.5	18.5	2 3
	106	Л90, pH 9	П + ХГ	43	24	3.6	3.6	0
5	177	Л75	П	28	**	**	52	18
	175	Л75б	П	55	**	**	67	41
	190	Л90	П	11	**	**	0	0
	180	Л90, pH 9	П	41	**	**	73	42
6	177	Л75	П	38	**	**	26	18
	175	Л75б	П	53	**	**	64	41
	180	Л90	П	11	**	**	0	0
	201	Л90, pH 9	П	35	**	**	61	42
7	204	Л75	П	38	**	**	44	12
	192	Л75б	П	55	**	**	80	39
	180	Л90	П	9	**	**	0	0
	189	Л90, pH 9	П	35	**	**	56	45

* Здесь и далее процент рассчитан от числа овулировавших ооцитов.

** По техническим причинам учет на этих стадиях не проводили.

худшим качеством партии самок. Это предположение, однако, не подтвердилось, так как из ооцитов этой же партии самок, созревших *in vivo*, после осеменения получены нормально развивающиеся зародыши.

Исследование влияния сыворотки на качество яиц, созревших и овулировавших *in vivo*, показало, что инкубация в среде, содержащей 20% СКРС, примерно в два раза снижает процент вылупившихся зародышей.

Мы сравнили результаты использования двух способов инкубации зародышей, полученных после осеменения ооцитов, овулировавших *in vivo*: в стационарной культуре (в чашках Петри с еже-

Таблица 2. Влияние продолжительности инкубации фолликулов в присутствии 20% СКРС в среде Л75 с бикарбонатом натрия на овуляцию ооцитов, развитие и вылупление предличинок вьюна (самка 8)

Продолжительность обработки СКРС	Общее число фолликулов	Процент овулировавших ооцитов	Процент сформированных предличинок	Процент вылупившихся предличинок
14 ч	136	73	22	6
3 ч	145	61	44	6
1 ч	127	62	37	11
0 ч	137	69	47	7

Таблица 3. Влияние обработки фолликулов и овулировавших ооцитов вьюна СКРС фетальной сывороткой и полостной жидкостью вьюна в среде Л75 с бикарбонатом натрия на овуляцию ооцитов, развитие и вылупление предличинок вьюна и их переход на активное питание

Номер самки	В среду добавлена	Общее число фолликулов	Процент овулировавших ооцитов	Процент сформированных предличинок	Процент вылупившихся предличинок	Процент предличинок, перешедших на активное питание
9	СКРС, 20%	113	91	1	1	0
	СКРС*, 20%	151	81	1	0	0
	ФС, 20%	140	92	10	5	3
	ПЖ, цел	110	86	8	0	0
	ПЖ, 20%	109	94	14.5	11	7
10	СКРС, 20%	123	74	19	3	0
	ФС, 20%	128	80	30	4	4
	ПЖ, 10%	125	86	20	15	15
	ПЖ, 20%	146	95	18	5	5

* СРКС добавлена в среду за 2.5 ч до осеменения в момент появление первых овулировавших ооцитов.

дневной 2–3-разовой сменой воды) и в инкубаторах, плавающих в аквариуме с продувкой. В контроле (без выдерживания в СКРС) вылупилось, соответственно 47 из 50 зародышей (94%) и 49 из 50 (98%) предличинок (от общего количества оплодотворенных яиц). В опыте в стационарной культуре после часовой обработки СКРС вылупилось 24 из 50 зародышей (48%), а после 37 минутной 27 из 50 (54%). В условиях плавающих инкубаторов: в опыте с часовой обработкой 59 из 130 (45%), с 37 минутной 35 из 61 (57%). Итак, после часовой и даже 37 минутной обработки СКРС наблюдается практически двукратное снижение процента зародышей, вылупившихся из яиц, созревших и овулировавших *in vivo*, что позволяет предположить, что 20% СКРС может оказывать повреждающее действие на развитие зародышей.

Поскольку инкубация в СКРС оказывала повреждающее влияние на яйца по критерию развития до вылупления зародышей, мы попытались снизить повреждающее действие, сократив время обработки фолликулов (ооцитов) СКРС. Для этого наряду с обычной постановкой, когда сыворотку добавляли через 30 мин после гормональной обработки, ее добавляли также за 3 ч до первого осеменения, за 1 ч до первого осеменения (когда появились первые овулировавшие ооциты) и непосредственно перед первым осеменением. Далее ооциты осеменяли по мере их овуляции, поэтому дальнейшая обработка одинакова во всех случаях.

Из таблицы видно, что снижение продолжительности обработки СКРС в среде практически не снижает ее повреждающее влияние. В следующей серии экспериментов СКРС заменили на фетальную сыворотку (ФС) и ПЖ вьюна. В качестве среды использовали Л75 с бикарбонатом натрия. До стадии гаструляции зародыши находились в стационарной культуре, затем были перенесены в плавающие инкубаторы. Кроме того, в этих опытах попробовали проверить способность вылупившихся предличинок переходить на активное питание. Результаты опытов сведены в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что процент овулировавших ооцитов у каждой из двух самок сходен при всех использованных добавках. В неразведенной полостной жидкости ооциты овулируют в высоком проценте случаев, но дальнейшее развитие идет плохо (самка 1). У обеих самок предличинки

Таблица 4. Влияние 10% СКРС и 10% полостной жидкости вьюна при обработке фолликулов (ооцитов) в среде Л75 с бикарбонатом натрия на овуляцию ооцитов, развитие и вылупление предличинок вьюна

Номер самки	В среду добавлена	Общее число фолликулов	Процент овулировавших ооцитов	Процент сформированных предличинок	Процент вылупившихся предличинок
11	СКРС, 10%	77	56	39	14
	ПЖ, 10%	102	85	38	19
	ПЖ, 10%*	117	80	45	18
	ПЖ, 10%**	100	59	59	22
12	СКРС, 10%	63	38	12	0
	ПЖ, 10%	95	86	38	11
	ПЖ, 10%*	75	81	44	19
	ПЖ, 10%**	85	0	–	–

СКРС и ПЖ присутствовали в среде все время.

* ПЖ добавлена в момент начала овуляции.

** В качестве среды использована Л75 без бикарбоната натрия.

вылупились только после инкубации с 20% ФС и 10 и 20% ПЖ вьюна, большинство из них перешли на активное питание (от 62.5 до 100% от числа вылупившихся). При использовании ооцитов, с созревших *in vivo,* практически 100% предличинок перешли на активное питание.

Далее мы попробовали снизить подавляющее влияние СКРС, снизив ее концентрацию до 10%. ПЖ вьюна использовали тоже в концентрации 10%, поскольку в ней она действует не хуже, чем 20% (табл. 3, самка 10), а получение ПЖ вьюна чрезвычайно трудоемко. Результаты опытов на самках 11 и 12 сведены в таблице 4.

Из таблицы видно, что фолликулы двух самок по-разному реагируют на Л75 без бикарбоната натрия. У первой самки при несколько сниженном проценте овулировавших ооцитов в этих условиях (59% по сравнению с 80–85% в среде с бикарбонатом наирия), остальные показатели (процент сформированных предличинок и процент вылупившихся предличинок), во всяком случае, не хуже соответствующих показателей для Л75 с бикарбонатом натрия, у второй самки в среде без бикарбоната натрия ооциты плохо зреют и не овулируют. Процент овулировавших ооцитов у обеих самок ниже всего в среде с 10% СКРС. В ней же у второй самки не происходило вылупление предличинок. Сокращение времени пребывания фолликулов в 10% ПЖ практически не влияет на процент вылупившихся предличинок.

В этом опыте выращивания предличинок до перехода на активное питание по техническим причинам не удалось.

В наших опытах доведение pH среды Л75 до 9 обычно резко увеличивало процент вылупившихся предличинок (табл. 1, самки 6 и 7). Мы попытались выяснить во всех ли средах, увеличивая pH до 9, можно увеличить процент вылупившихся зародышей. Для этого мы сравнили процент вылупившихся зародышей и зародышей, перешедших на активное питание, в Л75 с бикарбонатом и среде 199 при их исходных значениях pH и при pH, доведенном до 9. Сравнивали также влияние ПЖ вьюна и карпа на фолликулах одной самки в среде Л75 с pH, доведенным до 9 (таблица 5).

Доведение pH до 9 в среде 199 не привело к увеличению процента вылупившихся и перешедших на активное питание предличинок у обеих самок. Интересно, однако, что при использовании ПЖ карпа удалось получить вылупившихся и даже перешедших на активное питание предличинок вьюна в среде 199. Замена ПЖ вьюна на ПЖ карпа в среде Л75 с pH 9 привела к некоторому увеличению процента зародышей, перешедших на активное питание (26% против 11% в ПЖ вьюна).

Мы попытались проверить, нельзя ли накапливать овулировавшие ооциты в целой или разведенной (1 : 5) ПЖ карпа в холодильнике, чтобы все осемененные ооциты находились на одной стадии развития, что облегчает постановку и учет опыта при исследовании влияния различных воздействий на созревание и овуляцию ооцитов. В чашки Петри с 7.5 мл среды помещали приблизительно по 200 ооцитов. Использовали две среды: Л75 с 1 г/л бикарбоната натрия и Л75 с pH, доведенным до 9. 20% ПЖ карпа добавлена через 30 мин после прогестерона. Первые овулировавшие ооциты в обеих средах появились через 17 ч после обработки гормоном. Ооциты, овулировавшие через 18 ч 20 мин, 19 ч 20 мин, 20 ч 20 мин и 21 ч 20 мин были собраны из каждой из двух сред, разделены приблизительно пополам и помещены в холодильник в целую ПЖ карпа и в ПЖ, разведенную 1 : 5 средой Л 75. Через 3 ч они были одновременно осеменены. Оставшиеся фолликулы в обеих средах находились в термостате, еще 2 ч и потом овулировавшие ооциты были отобраны, сразу же осеменены и также помещены в термостат. В среде с бикарбонатом натрия осталось

Таблица 5. Влияние сред Л75 с 1 г/л бикарбоната натрия и 199 с их обычным pH и pH, доведенным 1 N NaOH до 9.0, на овуляцию ооцитов вьюна, вылупление предличинок и их переход на активное питание. В среду добавлена 20% ПЖ карпа (ПЖК) или вьюна (ПЖВ)

Номер самки	Среда	В среду добавлена ПЖ	Общее число фолликулов	Процент овулировавших ооцитов	Процент сформированных предличинок	Процент вылупившихся предличинок	Процент предличинок, перешедших на активное питание
13	199	ПЖК	171	62.5	4	4	3
	199, pH 9	ПЖК	210	68	4	0.7	0.6
	Л75б	ПЖК	84	75	30	25	24
	Л75, pH 9	ПЖК	74	59	45	36	36
14	Л75б	ПЖВ	109	83	20	19	19
	Л75, pH 9	ПЖВ	132	89	14.5	14	11
	Л75, pH 9	ПЖК	168	85	27	26	26
	199	ПЖК	74	46	2	12	9
	199, pH 9	ПЖК	88	94	7.5	6	6

Таблица 6. Влияние выдерживания овулировавших *in vitro* ооцитов вьюна в холодильнике в течение 3 ч в полостной жидкости карпа, разведенной 1 : 5, и в целой полостной жидкости на развитие зародышей вьюна. В контроле овулировавшие ооциты оплодотворены без выдерживания

Среда инкубации и обработка	Число овулировавших ооцитов	Процент сформированных предличинок	Процент вылупившихся предличинок	Процент предличинок, перешедших на активное питание
Л75б ПЖ 1 : 5, холод	86	35	10	9
ПЖ, холод	102	30	5	3
Б/выдерж.	37	70	43	35
Л75 pH 9 ПЖ 1 : 5, холод	63	54	9.5	8
ПЖ, холод	57	58	10.5	5
Б/выдерж.	44	86	43	38

29 неовулировавших ооцитов, в среде с pH 9–25 (процент овуляции в первом случае 92, во втором – 87%). Результаты опыта сведены в таблице 6. Из таблицы 6 видно, что в обеих средах на активное питание перешло больше всего предличинок, полученных при осеменении ооцитов непосредственно после овуляции. Выдерживание овулировавших *in vitro* ооцитов в ПЖ карпа (как в целой, так и в разведенной) в холодильнике в течение 3 ч приводит к значительному снижению процента предличинок, перешедших на активное питание.

Следует отметить, что выдерживание в холодильнике ооцитов вьюна, овулировавших *in vivo*, в целой и разведенной ПЖ карпа, практически не влияет на процент предличинок, перешедших на активное питание. Овулировавшие *in vivo* ооциты вьюна были оплодотворены: сразу после овуляции (вариант 1), а также через 12 ч нахождения в холодильнике во влажной камере (вариант 2), в целой ПЖ карпа (вариант 3), в разведенной 1 : 5 ПЖ карпа (вариант 4). Во всех случаях взято по 30 ооцитов. В варианте 1 на активное питание перешло 85% предличинок, в варианте 2–79%, в варианте 3–80%, в варианте 4–95%. Сравнение этих данных с данными, приведенными в таблице 6 свидетельствуют о том, что свойства ооцитов, овулировавших *in vivo*, заметно отличаются от свойств ооцитов, овулировавших *in vitro*. В последнем случае ооциты лучше не накапливать, а оплодотворять вскоре после овуляции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего, обращает на себя внимание тот факт, что одним из самых существенных условий, обеспечивающих высокий процент зародышей, достигших поздних стадий развития, полученных в опытах по созреванию *in vitro*, является качество фолликулов, поскольку в одних и тех же условиях на разных самках получаются очень разные результаты. Вследствие того, что у многих самок процент развития зародышей очень невысок, не удается получить статистически достоверные отличия разных вариантов постановки экспериментов. Тем не менее, нам представляется важным опубликовать эти результаты как предварительные, намечающие дальнейшие направления исследования и указывающие на некоторые очевидно неэффективные походы.

Впервые созревание и овуляцию *in vitro* ооцитов вьюна, способных после оплодотворения к далеко идущему развитию (образование сомитов и вылупление единичных предличинок) получил Саат (1982). В наших опытах из достигших дефинитивного размера окруженных фолликулярными оболочками ооцитов вьюна получены *in vitro* зрелые, овулировавшие яйца, которые после осеменения развивались до стадии вылупившихся предличинок, перешедших на активное питание. Вьюн оказался первой рыбой из изученных до сих пор (карпа (Epler, 1981; Саат, 1988), медаки (Ogiwara et al., 2013) и японского угря (Abe et al., 2010)) у которой удалось получить предличинок, перешедших на активное питание, из ооцитов, не созревающих *in vitro* без гормональной обработки.

В отличие от опытов Саата (1980), в которых наилучшей результат был достигнут в среде 199, в наших опытах процент вылупившихся предличинок был наиболее высок в 75% среде Лейбовитца с 1 г/л бикарбоната натрия и в 75% и среде Лейбовитца с pH, доведенным NaOH до 9. Увеличение pH среды до 9 увеличивало процент вылупившихся зародышей во всех использованных нами средах, кроме среды 199. У данио (*Brachydanio rerio*) зародышевое развитие созревших *in vitro* ооцитов после осеменения обеспечивает только сочетание высокой моляльности среды и ее высокого pH (Seki et al., 2008). Авторы высказывают предположение о том, что такие условия культивирования обеспечивают созревание цитоплазмы ооцитов.

Интересно, что добавление бикарбоната натрия к среде Л75 существенно увеличивает главным образом созревание и овуляцию ооцитов вьюна. Если эти процессы осуществляются в Л75 без бикарбоната натрия, то дальнейшее развитие зародышей происходит не хуже, чем развитие зародышей, полученных из ооцитов, созревших и овулировавших в Л75 с бикарбонатом. Создается впечатление, что отношение к бикарбонату определяется физиологическим состоянием различных фолликулов одной и той же самки.

Для стимуляции созревания и овуляции ооцитов мы, как и Т. Саат, использовали прогестерон (1 мкг/мл) или прогестерон в той же концентрации с хорионическим гонадоторопином человека (25 МЕ/мл) (Саат, 1980, 1982). В наших опытах, как и ранее в опытах Саата (Саат, 1980, 1982), было показано стимулирующее действие хорионического гонадотропина на овуляцию ооцитов вьюна. Однако на процент вылупления предличинок гонадотропин оказывал скорее подавляющее влияние (исключение: табл. 1, Л75). В опытах Саата влияние гонадотропина, добавленного в среду инкубации, на развитие столь поздних стадий не исследовалось.

Для предотвращения спонтанной активации овулировавших ооцитов Саат (Саат, 1980, 1982) использовал 20% СКРС. В наших опытах обнаружилось повреждающее влияние 20% СКРС, выражающееся в снижении процента вылупившихся зародышей. Поскольку продолжительность обработки ооцитов СКРС до овуляции не оказывала такого влияния, можно предполагать, что оно не проявляется в присутствии фолликулярных оболочек.

Кроме 20% СКРС мы использовали фетальную сыворотку, а также полостную жидкость вьюна и карпа. В целой ПЖ, как и в целой сыворотке (Саат, 1980) ооциты вьюна овулируют, но после осеменения зародыши развиваются плохо, развитие нормализуется при разведении полостной жидкости до 20 и 10%.

Максимальный процент овуляции ооцитов достигается обычно через двое суток после начала гормональной обработки, однако высокий процент овулировавших ооцитов не определяет их способность к дальнейшему развитию. Ооциты, овулировавшие *in vitro*, хорошо развиваются, только если оплодотворены не позднее, чем через сутки после начала опыта.

Ооциты вьюна, овулировавшие *in vivo*, сохраняют способность к оплодотворению при их выдерживании в течение ночи в холодильнике во влажной камере или в целой или разведенной 1 : 5 полостной жидкости. При выдерживании овулировавших *in vitro* ооцитов вьюна в таких же условиях даже в течение трех часов они в значительной мере теряли способность к оплодотворению. С чем связаны эти различия, пока не ясно.

Известно, что гетерологичные ПЖ используются при пересадке ядер в энуклеированные ооциты и для получения андрогенетических зародышей рыб (напр. Sakai et al., 1997). В наших экспериментах гетерологичная ПЖ карпа обеспечивает отсутствие активации ооцитов вьюна в опытах по стимуляции их созревания и овуляции. ПЖ вьюна и карпа заметно различаются по белковому составу (Минин, Озерова, 2015). Присутствие ПЖ карпа в среде инкубации при созревании ооцитов вьюна *in vitro*, возможно, влияет на дальнейшее развитие зародышей лучше, чем собственная ПЖ вьюна. Однако это лишь самые первые данные, которые необходимо проверить в дальнейших опытах.

Одной из существенных задач дальнейших исследований представляется разработка методов, позволяющих быстро и эффективно оценить качество исходных ооцитов. Кроме того, даже при использовании наиболее подходящих условий культивирования фолликулов вьюна в наших опытах удалось получить не более 36% предличинок, перешедших на активное питание (от числа овулировавших ооцитов). Возможно, этот процент удастся увеличить, если для подавления спонтанной активации использовать не биологическую жидкость, неизбежно имеющую непостоянный состав и нежелательные компоненты, а именно активное начало, подавляющее спонтанную активацию в чистом виде.

Авторы выражают признательность Б.Ф. Гончарову за ценные замечания при подготовке статьи и Э.В. Орлову за создание системы плавающих инкубаторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. М.: Наука, 1968. С. 90–91.

Костомарова А.А., Нейфах А.А. Метод отделения бластодермы у зародышей вьюна и возможности его применения // Журн. Общ. Биол. 1964. Т. 26. № 5. С. 386–388.

Минин А.А., Озерова С.Г. Спонтанная активация яиц рыб предотвращается ингибиторами протеаз // Онтогенез. 2008. Т. 39. С. 362–366.

Минин А.А., Озерова С.Г. Овариальная жидкость рыб содержит ингибиторы протеаз // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 1. С. 1–5.

Саат Т.В. Созревание и овуляция ооцитов вьюна *in vitro* в разных средах и при разных гормональных воздействиях // Там же. 1980. Т. 11. Р. 545–554.

Саат Т.В. Хронология созревания ооцитов вьюна и становление у них способности к развитию // Там же. 1982. Т. 13. № 3. С. 257–265.

Саат Т.В. Созревание и овуляция ооцитов костистых рыб *in vitro* // Ученые записки тартуского государственного университета. Выпуск 718. 1985. С. 3–27.

Саат Т.В. Созревание и овуляция ооцитов карпа *in vitro* в разных средах // Ученые записки тартуского государственного университета. Выпуск 805. 1988.

Скоблина М.Н. Стимуляция *in vitro* овуляции ооцитов костистых рыб гонадотропными и стероидными гормонами // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 4. С. 245–253

Abe T., Ijiri S., Adachi S., Yamauchi K. Development of an *in vitro* culture system for producing eel larvae from immature ovarian follicles in Japanese eel *Anguilla japonica* // Fish Sci. 2010. V. 76. P. 257–265.

Coffman M.A., Goetz F.W., Trout ovulatory proteins are partially responsible for the anti-proteolytic activity found in trout coelomic fluid // Biol. Reprod. 1998. V. 59. P. 497–502.

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. 722–725.

Epler P. Effect of steroid and gonadotropic hormones on the maturation of carp ovaries. Part V. Ovulation, fertilization and embryonic development of carp oocytes *in vitro* // Pol. Arch. Hydrobiol. 1981. V. 28. № 1. P. 119–125.

Fujimori C., Ogiwara K., Hagiwara A. et al. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: possible involvement in ovulation // Mol. Cell Endocrinol. 2011. V. 332. P. 67–77.

Knoll-Gellida A., André 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 March 9. doi: 10.1186/1471-2'64-7-46)

Nagahama Y., Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish // Develop. Growth and Differ. 2008. V. 50. Suppl 1: S195-219.

Ogiwara K., Fujimori C., Rajapakse S., Takahashi T. Characterization of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor and their indispensable role in the ovulatory process of the medaka // PLoS One. 2013. V. 8. № 1. e54482. doi: 10.1371/journal.pone.0054482

Sakai N., Burgess S., Hopkins N. Delayed *in vitro* fertilization of zebrafish eggs in Hank's saline containing bovine serum albumin // Mol. Marine Biol. Biotechnol. 1997. V. 6. P. 84–87.

Seki S., Kouya T., Tsuchiya R. et al. Development of a reliable *in vitro* maturation system for zebrafish oocytes // Reproduction. 2008. V. 135. P. 285–292.

Yamamoto T. Physiology of fertilization in fish eggs // International review of cytology. 1961. V. 12. P. 361–405.

Hormonal Induction of In Vitro Maturation and Ovulation of Loach Oocytes and Obtaining Egg Cells Capable of Fertilization and Development

M. N. Skoblina and A. A. Minin

Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

e-mail: skoblina38@mail.ru

Received October 20, 2014; in final form, December 30, 2014

Loach oocytes that have reached a definitive size and are surrounded by follicular envelopes are capable of maturation and ovulating under the effect of 1 μg/mL progesterone in 75% Leibovitz medium with 1 g/L sodium bicarbonate or with pH adjustment to 9.0 by 1N sodium hydroxide. Inseminated eggs are developed until the stage of when adding 20% bovine serum to the incubation medium. Substitution of the bovine serum with 10–20% loach ovarian fluid or 20% carp ovarian fluid provides more complete development of inseminated eggs until the stage of prolarvae that pass to active nutrition.

Keywords: follicles, oocytes, progesterone, cavitary fluid, maturation, ovulation, prolarva passage to active nutrition, *Misgurnus fossilis* loach