

УДК 591.3:597.5

ГОРМОНАЛЬНАЯ ИНДУКЦИЯ СОЗРЕВАНИЯ И ОВУЛЯЦИИ *in vitro* ООЦИТОВ ДАНИО РЕРИО (*Danio rerio*) И ПОЛУЧЕНИЕ ЯЙЦЕКЛЕТОК, СПОСОБНЫХ К ОПЛОДОТВОРЕНИЮ И РАЗВИТИЮ

© 2016 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 21.01.2016 г.

Окончательный вариант получен 12.04.2016 г.

Известно, что окруженные фолликулярными оболочками ооциты данио рерио (*Danio rerio*), достигшие дефинитивного размера, созревают *in vitro* в 90% среде Лейбовитца с рН 9.0 под влиянием 17 α , 20 β -дигидроксипрогестерона и приобретают компетенцию к развитию, но не овулируют (Seki et al., 2008). Нами показано, что созревшие в этих условиях ооциты данио рерио под влиянием простагландина F_{2 α} (5 мкг/мл) или 20% полостной жидкости карпа овулируют и после оплодотворения способны развиваться до стадии личинки, переходящей на активное питание (максимальный срок наблюдения).

Ключевые слова: ооцит, созревание, овуляция, *in vitro*, прогестерон, простагландины E₂ и F_{2 α} оплодотворение, развитие, данио рерио (*Danio rerio*)

DOI: 10.7868/S0475145016050098

ВВЕДЕНИЕ

Созревание ооцитов костистых рыб хорошо изучено и разработаны методы его воспроизведения *in vitro* у многих видов (Nagahama, Yamashita, 2008), однако овуляцию ооцитов *in vitro* удается получать значительно реже (см. Скоблина, 2009). Удобными объектами для изучения овуляции ооцитов костистых рыб *in vitro* могли бы быть аквариумные рыбки, с которыми можно работать практически на протяжении всего года. Оказалось, однако, что у данио рерио (*Danio rerio*) овуляцию ооцитов *in vitro* воспроизвести не удается (Li et al., 1993; Selman et al., 1994; Seki et al., 2008), а у медаки (*Oryzias latipes*) ооциты овулируют при добавлении в среду рекомбинантного лютеинизирующего гормона, но после оплодотворения развиваются только до стадии бластулы (Ogiwara et al., 2013), что свидетельствует о неполноценности созревания и овуляции ооцитов *in vitro*.

Остановимся подробнее на работах, выполненных на ооцитах данио рерио. В опытах Ли с соавторами (Li et al., 1993) ооциты данио рерио в среде 199 под влиянием 17 α -гидроксипрогестерона созревали (59%), но не овулировали. После искусственного освобождения от фолликулярных оболочек и осеменения яйца дробились и нормально развивались. Однако, позднее повторить полученные Ли с соавторами результаты ни им самим, ни другим исследователям не удалось (см.

Seki et al., 2008). В этой работе авторы высказали предположение, что используемый метод индукции созревания ооцитов данио рерио *in vitro* не стимулирует в достаточной степени созревание цитоплазмы ооцитов. Им удалось показать, что для полноценного созревания цитоплазмы ооцитов данио рерио необходимо использовать 90% среду Лейбовитца с рН, доведенным до 9.0. Ооциты, созревшие в этих условиях практически не овулировали (около 10% овуляции), но после удаления фолликулярных оболочек и осеменения дробились приблизительно 40% яиц и до стадии вылупления дошли около 30% личинок.

У костистых рыб, как и у других позвоночных животных для стимуляции овуляции ооцитов необходимы эйкозаноиды, обычно простагландин F_{2 α} (ПГФ_{2 α}) или простагландин E₂ (ПГЕ₂) (см. Скоблина, 2009). В тех случаях, когда овуляцию созревших *in vitro* ооцитов костистых рыб под влиянием мейозиндуцирующего стероида или гонадотропина воспроизвести не удается, в среду добавляют простагландины. Так, используя ПГФ_{2 α} , удалось стимулировать овуляцию созревших *in vitro* ооцитов радужной форели (*Salmo gairdneri*) и обыкновенной щуки (*Exos luxius*) (Jalabert, 1976), золотой рыбки (*Carassius auratus*) (Jalabert, Szollosi, 1975; Stacey, Pandey, 1975), карпа (*Cyprinus carpio*) (Epler, 1981; Саат, 1988), гольца (*Salvelinus fontinalis*) (Goetz et al., 1982) и японско-

го угря (*Anguilla japonica*) (Abe et al., 2010), а с помощью ПГЕ₂ – овуляцию ооцитов желтого окуня (*Perca flavescens*) (Goetz, Theofan, 1979) и медаки (*Oryzias latipes*) (Ogiwara et al., 2005).

Почему простагландины не были использованы для стимуляции овуляции ооцитов данио рерио неясно. На основании данных, полученных Листером и Ван Дер Крааком (Lister, Van Der Kraak, 2008, 2009), можно было предположить, что овуляцию созревших *in vitro* ооцитов данио рерио может стимулировать ПГФ_{2α}.

Задачей нашей работы было попытаться индуцировать простагландином F_{2α} овуляцию *in vitro* ооцитов данио рерио, созревших под влиянием прогестерона, используя хорошо зарекомендовавшую себя среду, разработанную Секи с соавторами (Seki et al., 2008). Полноценность созревания и овуляции ооцитов оценивали по способности яиц к оплодотворению и дальнейшему развитию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали беспородных взрослых рыб данио рерио окраски дикого типа размером 35–40 мм. При содержании рыб и получении половых продуктов руководствовались методическими указаниями из книги Westerfield (2000), электронный вариант http://zfinfo.org/zf_info/zfbook/zfbk.html. Брали яичники у самок, подготовленных для естественного нереста по методике, предназначенной для получения большого количества зародышей. Для этого самок после естественного нереста содержали отдельно от самцов в течение десяти дней при оптимальных условиях содержания.

Самок данио рерио декапитировали, вырезали яичники и переносили их в 90% среду Лейбовитца со 100 мкг/мл гентомицина, нагретую до температуры 25–26°C. рН среды непосредственно перед использованием доводили 1 N раствором NaOH до 9.0 (Seki et al., 2008). Под бинокляром яичники разделяли отточенными иглами на фрагменты, состоящие из 2–10 крупных (диаметром приблизительно 0.65 мм) фолликулов. Кроме них фрагменты содержали по несколько более мелких фолликулов и экстрафолликулярную ткань. В чашку Петри с 90% средой Лейбовитца (5 мл) или со средой Лейбовитца с 20% полостной жидкостью карпа (4 мл 90% среды Лейбовитца и 1 мл полостной жидкости карпа) (рН 8.9) помещали от 30 до 80 крупных фолликулов (в зависимости от размера яичника и количества вариантов опыта). Использовали приблизительно одинаковое число фолликулов в разных вариантах опыта. Все чашки Петри одновременно помещали в термостат и инкубировали при температуре 28°C. Созревание ооцитов стимулировали прогестероном в концентрации 1 мкг/мл (концентрация спирта 0.1%). В

контроле добавляли 0.1% 96° спирта. Через 4.5 ч, после добавления прогестерона, когда крупные ооциты становились полностью прозрачными, в соответствующие чашки добавляли простагландин F_{2α} (“Sigma”) (5 мкг/мл) и чашки вновь помещали в термостат. Пробы просматривали с полу часовым интервалом и отбирали овулировавшие ооциты. Из каждого варианта опыта овулировавшие ооциты помещали в отдельную чашку, пипеткой отсасывали среду и добавляли сперму и отстоянную воду (в отношении приблизительно 1 : 50). Для приготовления суспензии спермы вырезанные семенники помещали в небольшой объем охлажденного (4°C) раствора Кортланда и мацерировали с помощью препаровальных игл. В таком виде во влажной камере в холодильнике сперма сохраняла способность к оплодотворению, по крайней мере, в течение дня. Перед оплодотворением проверяли подвижность спермиев под микроскопом. Осеменение проводили по мере овуляции ооцитов, обычно с интервалом 1 ч. Через несколько минут после осеменения воду в чашках заменяли свежей и все чашки помещали в термостат (28°C). Через 1–1.5 ч чашки просматривали и удаляли неоплодотворенные (побелевшие) яйца, остальные переносили в чашку Петри с 9 мл воды и вновь ставили в термостат. Воду в чашках меняли 2–3 раза в сутки, одновременно удаляя погибших зародышей. Зародышей на стадии гастрюляции (или на несколько более поздней стадии) переносили в плавающие инкубаторы, которые помещали в аквариум с продувкой (см. Скоблина, Минин, 2015).

Все операции с рыбами проводили в соответствии с требованиями комиссии по биоэтике ИБР РАН.

Доверительные интервалы для долей ооцитов были оценены с помощью on-line калькулятора GraphPad, а различия в долях между группами были протестированы точным тестом Фишера или обобщенной линейной моделью, которая предполагает биномиальное распределение ошибок, используя статистическое программное обеспечение SAS. Для всех данных использовался двухсторонний тест, за исключением того, когда наблюдаемые доли были равны нулю или единице (в этом случае, истинные доли могут отклоняться только в одном направлении от возможных) (Agresti, Coull, 1998).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Во всех опытах в отсутствие прогестерона в среде созревали (становились прозрачными) лишь единичные ооциты.

Развитие оценивали, подсчитывая число нормальных зародышей и их процент от числа овулировавших ооцитов на стадии дробления (чаще

всего на стадии 4 бластомеров, но иногда и на более поздних стадиях дробления), на стадии сформировавшейся предличинки, на стадии вылупления и на стадии перехода личинки на активное питание. В качестве стартового корма использовали TetraMin Baby (Германия). О начале активного питания судили по появлению корма в кишечнике личинок.

Опыты по влиянию прогестерона и простагландина $F_{2\alpha}$ на овуляцию ооцитов данио рерио и на развитие зародышей, полученных после осеменения зрелых овулировавших ооцитов проведены на восьми самках, их результаты сведены в таблице. Видно, что у всех самок небольшой процент ооцитов овулировал под влиянием прогестерона, а добавление в среду 5 мкг/мл простагландина $F_{2\alpha}$ достоверно его увеличивало. Процент дробящихся зародышей у самок 1, 3, 6, 7 и 8 не зависел от гормональной обработки, использованной при стимуляции их созревания и овуляции. У самок 2, 4 и 5 процент дробящихся зародышей, полученных из ооцитов, созревших и овулировавших в отсутствие простагландина, был достоверно ниже, а все зародыши, развившиеся после их оплодотворения, погибли на стадии бластулы. У всех самок, ооциты которых созрели и овулировали в присутствии простагландина, зародыши достигли стадии активно питающихся личинок (от 13 до 39%). После созревания и овуляции ооцитов в прогестероне стадии перехода на активное питание достигли только 6% зародышей самки 1, 12% зародышей самки 3 в этих условиях достигли стадии вылупившейся личинки, и 10–14% зародышей самок 6–8 – стадии сформированной предличинки. Во всех случаях процент зародышей, достигших соответствующей стадии развития после созревания и овуляции ооцитов при добавлении простагландина был выше, но отличия были достоверными только у половины самок (таблица).

Влияние полостной жидкости карпа (ПЖК) на овуляцию ооцитов данио рерио и на развитие зародышей, полученных после осеменения зрелых овулировавших ооцитов, проведены на ооцитах самок 1–4 (таблица). Видно, что у всех самок добавление в среду инкубации ПЖК увеличивало процент ооцитов овулировавших под влиянием прогестерона (у самок 2, 3 и 4 – достоверно). Сравнение процента овулировавших ооцитов, стимулированных прогестероном в среде, содержащей ПЖК, с процентом овулировавших ооцитов, стимулированных прогестероном и простагландином, свидетельствует о том, что у тех же трех самок достоверной разницы нет. Добавление в среду ПЖК привело к тому, что у самок 2, 3 и 4 от 8 до 14% зародышей достигли стадии личинки, перешедшей на активное питание, напомним, что после оплодотворения ооцитов, созревших и

овулировавших в среде с прогестероном, на активное питание перешло только 6% зародышей одной самки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, нами впервые показано, что достигшие дефинитивного размера окруженные фолликулярными оболочками ооциты данио рерио, созревшие *in vitro* под влиянием прогестерона, овулируют в результате обработки ПГФ_{2α}, как и ооциты ряда других костистых рыб, о которых шла речь во введении. Овулировавшие ооциты после оплодотворения дробятся и развиваются в личинок, переходящих на активное питание. Их способность к полноценному развитию определяется, по-видимому, как и в опытах Секи с соавторами (Seki et al., 2008) моляльностью и рН среды инкубации, поскольку в предварительных опытах нами было показано, что снижение этих параметров приводило к резкому снижению способности овулировавших ооцитов к развитию. В опытах Секи с соавторами (Seki et al., 2008) после оплодотворения созревших *in vitro* ооцитов данио рерио, у которых фолликулярная оболочка была удалена хирургически, наилучшим был результат – 45% дробящихся зародышей и 33% вылупившихся личинок. В наших опытах при обработке фолликулов данио рерио прогестероном и ПГФ_{2α} после оплодотворения дробилось от 57 до 92% овулировавших ооцитов и от 17 до 61% из них достигало стадии вылупившейся личинки (таблица). Это неплохой результат, если учесть, что процент овулировавших ооцитов в наших опытах колебался от 27 до 85%, а в опытах Секи с соавторами (Seki et al., 2008) “овулировавшими” были 100% ооцитов. Разброс результатов в наших опытах, возможно, связан с различным качеством ооцитов у использованных нами беспородных рыб.

Помимо коммерческого препарата ПГФ₂, мы использовали в опытах еще один источник ПГФ₂ – полостную жидкость карпа, овуляцию ооцитов которого стимулирует именно этот простагландин (Epler, 1981; Саат, 1988). Известно, что полостная жидкость рыб содержит высокую концентрацию простагландинов. В ПЖ золотой рыбки на разных стадиях овуляции содержится в среднем более 9 нг/мл ПГФ₂ (Bouffard, 1979), в ПЖ гольца – 2–3 нг/мл (Cetta, Goetz, 1982). Проценты овулировавших ооцитов данио рерио, стимулированных прогестероном и ПЖК и прогестероном и простагландином у трех из четырех самок не отличаются достоверно. Следует напомнить, что мы использовали концентрацию ПГФ_{2α} равную 5 мкг/мл и 20% ПЖК. Если бы действующее начало в обоих случаях было одинаковым, то ПЖК должна была бы содержать ПГФ₂ в концентрации заметно превыша-

Влияние прогестерона (1 мкг/мл), простагландина F_{2α} (5 мкг/мл) и полостной жидкости карпа (ПЖК, 20%) в 90% среде Лейбовитца с рН 9 на овуляцию *in vitro* ооцитов данио рерио и развитие зародышей после осеменения до перехода на активное питание

№ самки	Гормональная обработка	ПЖК добавлена (+)	Общее число фолликулов	Число (%) овулировавших ооцитов	Число (%) дробящихся зародышей	Число (%) сформированных предличинок	Число (%) вылупившихся личинок	Число (%) личинок, перешедших на активное питание
1	прог	–	54	17 (31)	10 (59)	4 (23)	2 (12)	1 (6)
	прог + ПГФ _{2α}	–	41	35 (85)*	20 (57)	19 (54)*	13 (37)*	11 (31)*
	прог	+	50	20 (40)	14 (70)	8 (40)	2 (10)	0
2	прог	–	61	9 (15)	2 (22)	0	0	0
	прог + ПГФ _{2α}	–	62	30 (48)*	26 (87)*	9 (30)*	9 (30)*	8 (27)*
	прог	+	80	28 (35)	23 (82)	11 (39)	5 (18)	3 (11)
3	прог	–	61	8 (13)	4 (50)	1 (12)	1 (12)	0
	прог + ПГФ _{2α}	–	51	18 (35)*	8 (44)	5 (28)	5 (28)	4 (22)
	прог	+	33	12 (36)	7 (58)	3 (25)	3 (25)	1 (8)
4	прог	–	30	15 (50)	6 (40)	0	0	0
	прог + ПГФ _{2α}	–	35	25 (71)*	23 (92)	12 (48)	9 (36)	5 (20)
	прог	+	28	22 (78)	19 (86)	6 (27)	3 (14)	3 (14)
5	прог	–	32	7 (22)	3 (43)	0	0	0
	прог + ПГФ _{2α}	–	31	18 (58)*	15 (83)	13 (72)	2 (17)	2 (17)
6	прог	–	72	7 (10)	4 (57)	1 (14)	0	0
	прог + ПГФ _{2α}	–	70	33 (47)*	19 (57)	9 (27)	9 (27)	9 (27)
7	прог	–	65	10 (15)	7 (70)	1 (10)	0	0
	прог + ПГФ _{2α}	–	77	52 (67)*	37 (71)	14 (27)	14 (27)*	7 (13)
8	прог	–	72	10 (14)	6 (60)	1 (10)	0	0
	прог + ПГФ _{2α}	–	66	18 (27)*	13 (72)	11 (61)*	11 (61)*	7 (39)*

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем в прогестероне.

юшей 5 мкг/мл. В работе на золотой рыбке (Bouffard, 1979) показано, что концентрация ПГФ_{2α} в ее полостной жидкости превышает 9 нг/мл, а концентрация в среде инкубации, в которой Желабер и Сцоллози (Jalabert, Szollosi, 1975) получали 100% овуляцию ооцитов форели была в 1000 раз выше (1 мкг/мл). При этом дозы 0.15 и 0.30 мкг/мл ПГФ₂ вызывали только частичную овуляцию, хотя были в 100 раз выше, чем концентрация ПГФ_{2α} в полостной жидкости золотой рыбки. С чем связана такая разница в эффекте ПГФ₂, внешнего извне и “стимулятора” овуляции, содержащегося в полостной жидкости рыб, не ясно.

Напомним, что у всех 8-и самок, ооциты которых созревали и овулировали в присутствии простагландина, зародыши достигли стадии активно питающихся личинок (от 13 до 39%), добавление

в среду культивирования ооцитов ПЖК привело к тому, что у трех самок стадии личинки, перешедшей на активное питание, достигли от 8 до 14% зародышей, а в среде с одним прогестероном только 6% зародышей одной самки (таблица). Возможно, что ооциты данио рерио являются удобным объектом не только для исследования роли простагландинов в овуляции ооцитов, но и их возможного участия в созревании ооцитов и приобретении ими компетенции к развитию.

Обработывая ПГФ_{2α} созревшие *in vitro* окруженные фолликулярными оболочками ооциты данио рерио, нам удалось стимулировать их овуляцию у всех использованных в опыте самок. Однако процент овулировавших ооцитов в большинстве случаев оказался очень невысоким. Пытаясь найти причины этого, мы обратили внимание на

имеющиеся в литературе данные о том, что у откладывающих икру самок данио рерио, уровень ПГФ_{2α} в плазме не меняется на протяжении процессов созревания и овуляции и возрастает только после ее завершения (Melnyk, 2011; Knight, 2014). Судя по имеющимся данным, сходная динамика изменений простагландинов (ПГЕ₂ или ПГФ_{2α}) в процессе овуляции *in vivo* наблюдается у большинства исследованных видов рыб: золотой рыбки (Bouffard, 1979), амурского вьюна (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Ogata et al., 1979), гольца (Cetta, Goetz, 1982). Особенный интерес представляют данные, полученные на другой аквариумной рыбке – медаке. В последние годы механизм стимуляции овуляции у медаки исследован наиболее полно. Прежде всего, у нее, как и у данио рерио, уровень простагландина (у медаки это ПГЕ₂) тоже не увеличивается на протяжении овуляции (Fujimori et al., 2011, 2012). Тем не менее, у медаки (Fujimori et al., 2011), как и у данио рерио (Lister, Van Der Kraak, 2008), индометацин – ингибитор циклооксигеназы, фермента, участвующего в синтезе простагландинов, подавляет овуляцию ооцитов. Перед овуляцией в достигших дефинитивного размера фолликулах медаки резко увеличивается синтез одного из подтипов рецепторов к ПГЕ₂ – EP4 (Fujimori et al., 2011, 2012). Стимулировать образование EP4 *in vitro* не удается ни 17α, 20β-дигидроксипрогестероном, ни хорионическим гонадотропином человека (Fujimori et al., 2012; Hagiwara et al., 2014). Обработка фолликулов антагонистом этих рецепторов (GW627368X) приводит к подавлению овуляции (Fujimori et al., 2011, 2012), а обработка гормоном с выраженной фолликулостимулирующей активностью – гонадотропином сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК) – к увеличению количества рецепторов (Fujimori et al., 2012). Представляется довольно вероятным, что обработка преовуляторных фолликулов данио рерио ГСЖК будет, как и у медаки, увеличивать число рецепторов к простагландину (у данио рерио – ПГФ_{2α}) и, таким образом, увеличивать процент овулирующих ооцитов. Если это предположение окажется справедливым, то будет очень интересно определить динамику образования рецепторов к ПГФ_{2α} в фолликулах данио рерио и выяснить, как влияет их подавление на овуляцию ооцитов данио рерио.

Авторы выражают глубокую благодарность Я.Р. Галимову за помощь в статистической обработке материала и Б.Ф. Гончарову за ценные замечания при подготовке рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

Скоблина М.Н., Минин А.А. Гормональная индукция созревания и овуляции *in vitro* ооцитов вьюна и получение яйцеклеток, способных к оплодотворению и развиту // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 3. С. 198–206.

Саат Т.В. Созревание и овуляция ооцитов карпа в разных средах // Ученые записки Тартуского госуд. универ. 1988. Вып. 805. С. 5–34.

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.

Agresti A., Coull B.A. Approximate is better than “exact” in interval estimation of binominal proportions // Am. Stat. 1998. V. 52. P. 119–126.

Bouffard R.E. The role of prostaglandins during sexual maturation, ovulation and spermiation in the goldfish, *Carassius auratus* // M. Sc. Thesis. Vancouver: University of British Columbia, 1979. P. 153.

Cetta E., Goetz F.W. Ovarian and plasma prostaglandin E and F levels in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) during pituitary-induced ovulation // Biol. Reprod. 1982. V. 27. P. 1216–1221.

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. № 1–2. P. 67–77.

Fujimori C., Ogiwara K., Hagiwara A., Takahashi T. New evidence for the involvement of prostaglandin receptor EP4b in ovulation of the medaka, *Oryzias latipes* // Mol. Cell Endocrinol. 2012. V. 362. № 1–2. P. 76–84.

Goetz F.W., Smith D.C., Krickl S.P. The effects of prostaglandins, phosphodiesterase inhibitors, and cyclic AMP on ovulation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) oocytes // Gen. Comp. Endocrinol. 1982. V. 48. № 2. P. 154–160.

Goetz F.W., Theofan G. *In vitro* stimulation of germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes. Effects of 17 alpha-hydroxy-20 beta-dihydroprogesterone and prostaglandins // Gen. Comp. Endocrinol. 1979. V. 37. № 3. P. 273–285.

Hagiwara A., Ogiwara K., Katsu Y., Takahashi T. Luteinizing hormone-induced expression of Ptger4b, a prostaglandin E2 receptor indispensable for ovulation of the medaka *Oryzias latipes*, is regulated by a genomic mechanism involving nuclear progesterin receptor // Biol. Reprod. 2014. V. 90. № 6. P. 1–14.

Jalabert B. *In vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Exos luxius*), and goldfish (*Carassius auratus*) // J. Fish. Res. Bd. Canad. 1976. V. 33. P. 974–988.

Jalabert B., Szollosi D. *In vitro* ovulation of trout oocytes: Effect of prostaglandin on smooth muscle-like cells of the theca // Prostaglandins. 1975. V. 9. P. 765–778.

- Knight O.M.* Characterizing the role of eicosanoids in maturation-inducing steroid-mediated ovulation and spawning in the zebrafish (*Danio rerio*) // M. Sc. Thesis. Ontario: University of Guelph. 2014. P. 75.
- Li S., Mao Z., Han W. et al.* *In vitro* oocyte maturation in the zebra fish, *Brachydanio rerio*, and the fertilization and development of the mature egg // Chin. J. Biotechnol. 1993. V. 9. № 4. P. 247–255.
- Lister A.L., Van Der Kraak G.* An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation // Gen. Comp. Endocrinol. 2008. V. 159. № 1. P. 46–57.
- Lister A.L., Van Der Kraak G.J.* Regulation of prostaglandin synthesis in ovaries of sexually-mature zebrafish (*Danio rerio*) // Mol. Reprod. Develop. 2009. V. 76. № 11. P. 1064–1075.
- Melnyk N.C.* Regulation of Prostaglandin Synthesis in the Zebrafish Ovary // M. Sc. Thesis. Ontario: University of Guelph. 2011. P. 83.
- Nagahama Y., Yamashita M.* Regulation of oocyte maturation in fish // Develop. Growth and Differ. 2008. V. 50. Suppl 1: S195–S219.
- Ogiwara K., Takano N., Shinohara M. et al.* Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka // Proc. Nat. Acad. Sci. 2005. V. 102. № 24. P. 8442–8447.
- 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.
- 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.
- Selman K., Petrino T.R., Wallace R.A.* Experimental conditions for oocyte maturation in the zebrafish, *Brachydanio rerio* // J. Exp. Zool. 1994. V. 269. P. 538–550.
- Stacey N.E., Pandy S.* Effects of indomethacin and prostaglandins on ovulation of goldfish // Prostaglandins. 1975. V. 9. P. 597–607.
- Westerfield M.* The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press, 2000 (4th Edition available online).

Hormone-Induced In Vitro Maturation and Ovulation of *Danio rerio* Oocytes and Production of Eggs Capable of Fertilization and Further Development

M. N. Skoblina and A. A. Minin

Kol'tzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
e-mail: skoblina38@mail.ru

Received January 21, 2016; in final form, April 12, 2016

It is common knowledge that zebrafish, *Danio rerio*, oocytes in their follicular envelope that have reached definitive size undergo *in vitro* maturation in 90% Leibovitz's medium, pH 9.0, when treated with $17\alpha,20\beta$ -dihydroxyprogesterone and acquire developmental competence but do not ovulate (Seki et al., 2008). We have demonstrated that zebrafish oocytes that have undergone maturation under the indicated conditions ovulate when treated with prostaglandin $F_{2\alpha}$ (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or 20% carp internal fluid and are capable of development towards the actively feeding larvae upon fertilization (the maximum follow-up period).

Keywords: oocyte, maturation, ovulation, *in vitro*, progesterone, prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$, fertilization, development, zebrafish (*Danio rerio*)