

УДК 591.465.12

СТИМУЛЯЦИЯ *in vitro* ОВУЛЯЦИИ ООЦИТОВ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРОГЕСТЕРОНОМ И ГОМОЛОГИЧНЫМ ГОНАДОТРОПНЫМ ГОРМОНОМ ГИПОФИЗА

© 2012 г. М. Н. Скоблина, Б. Ф. Гончаров

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: skoblina38@mail.ru

Поступила в редакцию 04.03.11 г.

Окончательный вариант получен 20.05.11 г.

Показано, что процент ооцитов осетровых рыб, овулирующих *in vitro* в модифицированном для осетровых рыб растворе Рингера (РМО), существенно зависит от концентрации бикарбоната натрия и концентрации прогестерона. В оптимальных условиях (0.5 г/л бикарбоната натрия и 30 нг/мл прогестерона) он может быть выше 80. Созревшие и овулировавшие в таких условиях ооциты способны к нормальному развитию. В наилучшем случае около 70% развивающихся зародышей (от числа овулировавших ооцитов) достигают стадии вылупления (предельный срок наблюдения). Этот метод получения потомства, основанный на осеменении созревших и овулировавших *in vitro* ооцитов, может быть использован при работе с единичными самками редких и исчезающих видов осетровых рыб.

Ключевые слова: осетровые рыбы, созревание ооцитов, овуляция *in vitro*, среда культивирования, бикарбонат натрия, прогестерон, гонадотропный гормон гипофиза.

Созревание ооцитов амфибий и рыб под влиянием гормонов хорошо воспроизводится *in vitro* (Masui, Clarke, 1979; Goetz, 1983; Гончаров и др., 1997). Изучению механизмов процесса созревания посвящено немало работ (Nagahama, Yamashita, 2008; D’Inca et al., 2010; Pang, Thomas, 2010; Sadler et al., 2010). Гораздо труднее оказалось индуцировать *in vitro* овуляцию ооцитов (Wallace, Selman, 1978; Goetz, 1983; Pinter, Thomas, 1999; Patino et al., 2003), ее механизмы изучены значительно хуже, хотя и в этом отношении в последнее время достигнуты определенные успехи (Patino et al., 2003; Lister, Van Der Kraak, 2008; Sena, Liu, 2008; Bobe et al., 2009; Dhillon, Liu, 2010).

Изучение овуляции у осетровых рыб до недавнего времени было практически невозможно, так как исследователям либо вовсе не удавалось стимулировать этот процесс *in vitro* (Lutes, 1985), либо процент овулирующих ооцитов был очень низким, либо результат существенно варьировал от опыта к опыту. Изучение влияния состава среды культивирования овариальных фолликулов на овуляцию ооцитов себрюги показало, что одним из факторов, влияющих на результат гормональной стимуляции *in vitro*, является осмоляльность среды. Процент ооцитов себрюги, овулирующих *in vitro* под влиянием экстракта гипофизов осетровых рыб или прогестерона, увеличивался при

разведении среды культивирования (Goncharov et al., 2009). В качестве исходных сред в этой работе были использованы модифицированный для осетровых рыб раствор Рингера для холоднокровных (РМО) (Гончаров, 1978) и среда Лейбовитца (L-15) с добавлением бикарбоната натрия. Разбавление этих сред позволяло получать довольно высокий и сопоставимый в двух средах процент овулирующих ооцитов. Проверка способности к развитию показала, что наилучшей является разведенная до 69% среда L-15, содержащая 1.84 г/л бикарбоната натрия. Тем не менее, и в этой среде овуляцию ооцитов *in vitro* удалось получить далеко не у всех самок, поэтому представлялось целесообразным продолжить поиск оптимальной среды.

Ранее Гончаровым с соавторами (1997) было показано, что процент ооцитов, созревающих *in vitro* под влиянием экстракта гипофизов осетровых рыб, возрастает при увеличении осмоляльности среды культивирования. При этом оказалось, что для стимуляции созревания среды с увеличенной концентрацией бикарбоната натрия более эффективны, чем среды с большей осмоляльностью, но меньшим содержанием бикарбоната. В отношении влияния концентрации бикарбоната натрия на гормональную индукцию овуляции были лишь отдельные наблюдения, ко-

торые и подтолкнули нас к изучению этого вопроса.

Для получения высокого процента созревших, овулировавших и способных к оплодотворению и развитию яйцеклеток важны не только условия инкубирования, но и использование оптимальной гормональной обработки. Известно, что овуляцию ооцитов осетровых рыб индуцируют гонадотропный гормон гипофиза и прогестерон. Есть все основания предполагать, что в индукции их овуляции принимают участие простагландины, как это показано для бесхвостых амфибий (Schuetz, 1986; Chang et al., 1995; Sena, Liu, 2008), костистых рыб (Goetz et al., 1989; Goetz, Garczynski, 1997; Lister, Van Der Kraak, 2008) и млекопитающих (Hedin et al., 1987; Bridges et al., 2006; Kurusu et al., 2009),

Ключевым ферментом, превращающим арахидоновую кислоту в простагландины, является простагландин синтаза или индуцибельная изоформа циклоксигеназы (ЦОГ-2) (Vane et al., 1998). Показано, что в процессе индукции *in vitro* созревания и овуляции ооцитов шпорцевой лягушки прогестероном и хорионическим гонадотропином человека происходит увеличение экспрессии мРНК ЦОГ-2 (Sena, Liu, 2008). Полученные на млекопитающих данные свидетельствуют о том, что активность этого фермента зависит от концентрации прогестерона. При этом прогестерон может, как увеличивать образование простагландинов (Hermenegildo et al., 2005; Bridges et al., 2006), так и снижать его (Thorburn et al., 1973; Gleeson et al., 1974; Hellberg et al., 1996; Hedin, Eriksson, 1997; Diaz et al., 2002).

В опытах по индукции созревания ооцитов осетровых рыб обычно используют прогестерон в концентрации 1 мкг/мл. Наши предварительные опыты показали, что она, по крайней мере, на порядок превышает максимально эффективную, а приведенные выше литературные данные свидетельствовали о том, что такая высокая концентрация может через подавление образования простагландинов отрицательно сказываться на индукции овуляции. Таким образом, в этой работе мы исследовали влияние двух факторов, которые могут влиять на гормональную индукцию овуляции ооцитов осетровых рыб *in vitro* – концентрации бикарбоната натрия и концентрации прогестерона. Для того чтобы судить о том, насколько стимулированные *in vitro* процессы созревания и овуляции проходят нормально, мы в большинстве опытов осеменяли зрелые яйцеклетки и следили за ходом их развития. Из-за отсутствия спермы осеменение не проводили только в опытах, сведенных в табл. 2.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проводилась в апреле–мае. Основным объектом служили фолликулы стерляди (*Acipenser ruthenus* L.). Один опыт был поставлен также на фолликулах гибрида русского (*Acipenser gueldens-taedtii* Brandt) и сибирского (*Acipenser baerii* Brandt) осетра. Самки стерляди и гибрида были выращены на Краснодарском (Адыгейском) осетровом рыбноводном заводе. Фолликулы получали от самок стерляди и гибрида, находившихся в этот момент в бассейнах с температурой воды 10°C.

Овариальные фолликулы извлекали из тела самки с помощью специального металлического щупа и помещали в 75% среду L-15 (~15°). Их многократно отмывали этой же средой и хранили в ней при 4°C до опыта от 3–4 ч до суток. Перед распределением по чашкам Петри фолликулы промывали средами, соответствующими тем, в которых их в дальнейшем инкубировали. В среды добавляли пенициллин (500 ед./л) и стрептомицин (0.25 г/л).

В качестве индукторов созревания и овуляции ооцитов использовали прогестерон или препарат гонадотропного гормона гипофиза севрюги (сГТГ), очищенный по модифицированной описанной ранее методике (Burzawa-Gerard et al., 1975). Прогестерон вносили в чашки Петри в виде концентрированного спиртового раствора. Конечная концентрация гормона в среде культивирования была от 16 до 1000 нг/мл, а концентрация спирта 0.05%. сГТГ вносили в виде концентрированного раствора, приготовленного на РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия. Конечная концентрация сГТГ составляла 2 мкг/мл.

Фолликулы инкубировали в 5 мл или 7.5 мл среды в вентилируемых пластиковых чашках Петри диаметром, соответственно, 35 и 55 мм. В чашки помещали, соответственно, по 20–22 или 30–33 фолликула. Инкубацию фолликулов проводили в термостате при температуре $16 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Овуляцию учитывали путем подсчета отделившихся от ооцита оболочек фолликула.

Осеменение проводили по общепринятой в осетроводстве методике полусухим способом (см. Dettlaff et al., 1993). Перед осеменением РМО сливали и добавляли воду и сперму одновременно из расчета 1 : 25. Сперму предварительно проверяли на подвижность.

Для определения достоверности различий в проценте овулировавших ооцитов использовали критерий χ^2 для качественных показателей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние состава среды культивирования на индуцированную гормонами in vitro овуляцию ооцитов стерляди

В табл. 1 представлены результаты опытов по инкубации фолликулов восьми самок стерляди в двух разных средах (РМО, содержащем 0.5 и 2 г/л бикарбоната натрия) в присутствии двух гормональных препаратов (прогестерона и сГТГ). В этом опыте эффективность гормонов в использованных концентрациях в обеих средах была приблизительно одинакова. Видно, что и прогестерон, и сГТГ в среде с уменьшенной концентрацией бикарбоната натрия вызывают овуляцию в большем проценте случаев у всех самок. Влияние концентрации бикарбоната натрия несколько больше сказывалось при использовании прогестерона. Кроме того, было отмечено, что при снижении концентрации бикарбоната натрия не только увеличивается процент овулировавших ооцитов, но и процесс овуляция начинается раньше. Звездочками отмечен уровень значимости различий.

Влияние концентрации прогестерона на овуляцию in vitro ооцитов стерляди

В опытах были использованы три концентрации. Наименьшая (16 нг/мл) составляла примерно половину от той, которую мы использовали в описанных выше опытах, средняя (128 нг/мл) была больше ее примерно в четыре раза, а наибольшая (1 мкг/мл) равнялась той, которая ранее использовалась нами для индукции созревания и овуляции ооцитов. В качестве среды инкубации в этом опыте мы использовали РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия.

Опыты были проведены на фолликулах четырех самок стерляди. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Можно видеть, что процент овулировавших ооцитов снижается при увеличении концентрации прогестерона. Исключением является только самка 3, у которой процент ооцитов, овулировавших под влиянием первых двух концентраций, примерно одинаков. Овулировавшие ооциты имели хороший вид и при перенесении в воду активировались и дробились партеногенетически.

Способность к развитию ооцитов стерляди, созревших и овулировавших в разных средах под влиянием прогестерона или гонадотропина себрюги

Все овулировавшие ооциты самок стерляди 1–5 (см. табл. 1) были осеменены. Процент нормально развивающихся зародышей определяли

Таблица 1. Влияние концентрации бикарбоната натрия в РМО на овуляцию ооцитов стерляди, стимулированную прогестероном или сГТГ

| | Процент овулировавших ооцитов | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| | 0.5 | 2.0 | 0.5 | 2.0 |
| Концентрация бикарбоната натрия (г/л) | | | | |
| Стимулятор: | прогестерон 30 нг/мл | | сГТГ 2 мкг/мл | |
| Самка 1 | 85 (51) | 18** (11) | 73 (44) | 22** (13) |
| Самка 2 | 42 (25) | 14** (3) | 32 (7) | 18 (4) |
| Самка 3 | 82 (18) | 50* (11) | 73 (16) | 64 (14) |
| Самка 4 | 64 (21) | – | 18 (6) | 15 (5) |
| Самка 5 | 70 (23) | – | 64 (21) | 21** (7) |
| Самка 6 | 85 (28) | – | 76 (25) | 30** (10) |
| Самка 7 | 42 (14) | 0** (0) | 73 (24) | 9** (3) |
| Самка 8 | 88 (29) | 9** (3) | 73 (24) | 18** (6) |
| Самки 1–8 | 70 | 18 | 60 | 25 |

В скобках приведено число овулировавших ооцитов. Различия между числом ооцитов, овулировавших в РМО с 0.5 и 2 г/л бикарбоната натрия, достоверны на уровне: * <0.05, ** <0.005. Отсутствие звездочки – различия недостоверны. Пропуски в таблице связаны с отсутствием достаточного числа фолликулов для постановки данного варианта опыта.

Таблица 2. Влияние концентрации прогестерона на овуляцию *in vitro* ооцитов стерляди в РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия

| | Процент овулировавших ооцитов | | |
|----------------------------------|-------------------------------|---------|--------|
| | 16 | 128 | 1000 |
| Концентрация прогестерона, нг/мл | | | |
| Самка 1 | 59 (13) | 36 (8) | 27 (6) |
| Самка 2 | 82 (18) | 32 (7) | 18 (4) |
| Самка 3 | 75 (15) | 85 (17) | 20 (4) |
| Самка 4 | 64 (14) | 32 (7) | 14 (3) |
| Самка 1–4 | 70 | 46 | 20 |

Число фолликулов на чашку 20–22. В скобках приведено число овулировавших ооцитов.

Таблица 3. Развитие зародышей стерляди, полученных после осеменения ооцитов, созревших и овулировавших *in vitro* под влиянием разных стимуляторов и в разных средах

| № самки | Стимулятор | Концентрация бикарбоната натрия, г/л | Общее число фолликулов | Число овулировавших ооцитов | Процент* нормальных зародышей на стадии: | | |
|---------|------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|---------|---------|
| | | | | | 4 | 17 | 36 |
| 1 | Прог. | 0.5 | 60 | 51 | 88 (75) | 86 (73) | 69 (58) |
| | Прог. | 2 | 60 | 11 | 82 (15) | 54 (10) | 36 (7) |
| | сГТГ | 0.5 | 60 | 44 | 98 (72) | 95 (70) | 68 (50) |
| | сГТГ | 2 | 60 | 13 | 77 (17) | 69 (15) | 38 (8) |
| 2 | Прог. | 0.5 | 60 | 25 | 72 (30) | 64 (27) | 36 (15) |
| | Прог. | 2 | 33 | 3 | 67 (6) | 0 (0) | 0 (0) |
| | сГТГ | 0.5 | 30 | 7 | 57 (13) | 0 (0) | 0 (0) |
| | сГТГ | 2 | 33 | 4 | 50 (6) | 50 (6) | 0 (0) |
| 3 | Прог. | 0.5 | 22 | 18 | 100 (82) | 89 (73) | 56 (45) |
| | Прог. | 2 | 22 | 11 | 82 (41) | 73 (36) | 55 (27) |
| | сГТГ | 0.5 | 22 | 16 | 100 (73) | 63 (45) | 0 (0) |
| | сГТГ | 2 | 22 | 14 | 50 (32) | 43 (28) | 0 (0) |
| 4 | Прог. | 0.5 | 30 | 21 | 90 (63) | н/опр | н/опр |
| | сГТГ | 0.5 | 30 | 6 | 67 (13) | н/опр | н/опр |
| | сГТГ | 2 | 33 | 5 | 100 (15) | н/опр | н/опр |
| 5 | Прог. | 0.5 | 30 | 23 | 78 (60) | н/опр | н/опр |
| | сГТГ | 0.5 | 33 | 21 | 100 (64) | н/опр | н/опр |
| | сГТГ | 2 | 30 | 7 | 86 (20) | н/опр | н/опр |

* По отношению к числу овулировавших ооцитов, в скобках — по отношению к общему числу ооцитов в данном варианте опыта.

на стадиях 5 (4 бластомера), 17 (конец гастрюляции) и 36 (вылупление) (Dettlaff et al., 1993). Процент развивающихся зародышей рассчитывали от общего числа взятых в опыт фолликулов и от числа овулировавших ооцитов. К сожалению, полностью проследить развитие зародышей удалось не у всех самок. Полученные результаты представлены в табл. 3. Они оказались не вполне одинаковыми для разных самок. Так у самки 1 существенно более высокий процент нормальных зародышей был получен после осеменения ооцитов, созревших и овулировавших в РМО с 0.5 г/л по сравнению с 2 г/л бикарбоната натрия независимо от использованного гормонального препарата. У самки 2 на фоне низкого процента овуляции во всех вариантах опыта наблюдался большой отход на всех стадиях развития. Только в одном варианте (индукция овуляции прогестероном в РМО, содержащем 0.5 г/л бикарбоната натрия) до стадии вылупления выжило небольшое число зародышей. У самки 3 на фоне достаточно высокого про-

цента ооцитов, овулировавших под влиянием и прогестерона, и сГТГ (особенно в РМО с 0.5 г/л бикарбоната натрия) стадии вылупления достигли только зародыши, развившиеся из ооцитов, созревших и овулировавших под влиянием прогестерона. На фолликулах последних двух самок опыт был несколько сокращен по числу вариантов (три вместо четырех). Кроме того, по техническим причинам качество полученных яйцеклеток было оценено только в самом начале развития. К этой стадии снова наилучший результат был получен в варианте опыта с использованием РМО, содержащем 0.5 г/л бикарбоната натрия, и прогестерона в качестве стимулятора (самка 4). У самки 5 в этой среде эффективность обоих стимуляторов оказалась одинаковой.

В единственном опыте, поставленном на фолликулах гибрида русского и сибирского осетра (табл. 4), наилучшим по уровню овуляции и по потенциалу развития оказался вариант, в котором в качестве среды культивирования был использо-

Таблица 4. Развитие зародышей гибрида русского и сибирского осетра, полученных после осеменения ооцитов, созревших и овулировавших *in vitro* под влиянием разных стимуляторов и в разных средах

| Стимулятор | Концентрация бикарбоната натрия, г/л | Общее число фолликулов | Число овулировавших ооцитов | Процент нормальных зародышей на стадии: | | |
|------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|---------|---------|
| | | | | 4 | 17 | 36 |
| Прог. | 0.5 | 31 | 8 | 75 (19) | 38 (10) | 38 (10) |
| сГТГ | 0.5 | 31 | 28 | 100 (90) | 96 (87) | 79 (71) |
| сГТГ | 2 | 31 | 4 | 75 (10) | 50 (6) | 50 (6) |

ван РМО, содержащий 0.5 г/л бикарбоната натрия, а в качестве стимулятора – сГТГ.

ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущей работе (Goncharov et al., 2009), посвященной разработке метода гормональной индукции овуляции *in vitro*, мы обнаружили, что при снижении осмоляльности среды культивирования фолликулов путем разбавления РМО можно получать высокий процент овулировавших ооцитов севрюги, однако в этих условиях нарушается процесс их созревания. Такие ооциты не способны к оплодотворению и/или развитию.

Мы предположили, что часто получаемый в неразведенном РМО *in vitro* низкий процент овулировавших ооцитов может быть связан не с осмоляльностью, а с высоким содержанием бикарбоната натрия в РМО. Это предположение полностью подтвердилось. Снижение концентрации бикарбоната натрия с 2 до 0.5 г/л привело к существенному увеличению процента овулировавших ооцитов независимо от использованного стимулятора (табл. 1).

Пока трудно судить о механизме влияния бикарбоната натрия на овуляцию. Уже довольно давно было установлено, что его концентрация является важным фактором, влияющим на созревание ооцитов осетровых рыб *in vitro*. Увеличение концентрации бикарбоната до определенных пределов повышает чувствительность фолликулов к гонадотропным гормонам гипофиза (Гончаров, 1978), но не влияет на созревание ооцитов, вызываемое прогестероном (Гончаров и др., 1997). Кроме того, при определенном физиологическом состоянии фолликулов их инкубация в РМО, содержащем увеличенную концентрацию бикарбоната натрия (2–3 г/л), приводит к созреванию ооцитов в отсутствие гормонов. Есть все основания полагать, что наблюдаемые эффекты повышенной концентрации этой соли определяются скорее не ее вкладом в осмоляльность среды, и не влиянием на кислотность среды а специ-

фическим вмешательством в сигнальные пути, обеспечивающие некоторые функции клеток. Известно, например, что ион бикарбоната активирует растворимую аденилатциклазу в спермиях (Garbers et al., 1982; Hess et al., 2005) и ранних зародышах млекопитающих (Chen et al., 2010) и эта активация необходима для капацитации спермиев и развития зародышей.

В этой работе для индукции созревания и овуляции ооцитов *in vitro* мы использовали существенно меньшую концентрацию прогестерона – 30 нг/мл вместо 1000 нг/л. Переход на меньшую концентрацию основывался на предположении о том, что у осетровых рыб, так же как у костистых рыб (Goetz et al., 1989; Goetz, Garczynski, 1997; Lister, Van Der Kraak, 2008), и амфибий (Schuetz, 1986; Chang et al., 1995; Sena, Liu, 2008) в индукции овуляции участвуют простагландины, а высокие дозы прогестерона, согласно приведенным ранее литературным данным, полученным, правда, на млекопитающих, могут подавлять их образование. Использование низкой концентрации прогестерона действительно дало хороший результат (у шести из восьми самок процент овулировавших ооцитов был выше 50) (табл. 1), что свидетельствует в пользу высказанного предположения. В настоящее время предположение об участии простагландинов в стимуляции овуляции ооцитов осетровых рыб проверяется.

Следует отметить, что в работах по стимуляции *in vitro* овуляции у ряда видов костистых рыб были эффективны относительно небольшие концентрации мейозиндуцирующего стероида. Так, для японского морского угря (*Anguilla japonica*) это 10–100 нг/мл (Kagawa et al., 2003), а для обыкновенного крокера (*Micropogonias undulatus*) – 290 нг/мл (Yoshizaki et al., 2001; Patino et al., 2003).

Чтобы проверить возможное подавляющее действие больших концентраций прогестерона на овуляцию был поставлен опыт на фолликулах четырех самок стерляди, и при использовании 1 мкг/мл, действительно, был получен суще-

ственно худший результат по сравнению с 128 и 16 нг/мл (табл. 2).

Пока сложно говорить о диапазоне оптимальных для индукции овуляции концентраций прогестерона. Очень вероятно, что он будет различаться у самок, чьи фолликулы находятся в разном физиологическом состоянии. Возможно, что, увеличив или уменьшив концентрацию прогестерона, для самок 2 и 7 (табл. 1) можно было бы получить более высокий процент овулировавших ооцитов. Более того, мы практически уверены, что 30 нг/мл прогестерона оказались недостаточной дозой для индукции овуляции у гибрида русского и сибирского осетров, так как в том же опыте при обработке фолликулов сГТГ был получен очень высокий процент овулировавших ооцитов (табл. 4).

Возможность стабильного воспроизведения овуляции ооцитов осетровых рыб *in vitro* представляет интерес не только для изучения механизмов регуляции этого процесса, но может иметь значение и для решения важных прикладных задач. В первую очередь речь идет о возможности получения потомства редких и исчезающих видов без риска потери сразу всех яйцеклеток. Это может произойти, если инъектировать самке гормональный препарат по схеме, не адекватной ее состоянию. Надежного метода определения физиологического состояния фолликулов, который позволял бы гарантировать результат гормонального воздействия, не существует (Гончаров и др., 1999). Альтернативой гормональной обработки самки является получение зрелых и овулировавших яйцеклеток *in vitro*. Разумеется, важно, чтобы созревшие и овулировавшие яйцеклетки были способны к нормальному развитию.

После нашего исследования на севрюге (Goncharov et al., 2009) сложилось впечатление, что такая простая солевая среда, как РМО не способна содействовать формированию или обеспечивать сохранение способности яйцеклеток к развитию, несмотря на то, что в ней можно индуцировать и созревание, и овуляцию ооцитов. Напомним, что в цитируемой работе существенно лучший результат был получен при использовании разбавленной среды Лейбовитца.

Наше исследование показало, что, уменьшив концентрацию бикарбоната натрия в РМО и используя низкие дозы прогестерона или сГТГ, можно получать зрелые, овулировавшие и способные к нормальному развитию яйцеклетки. Отметим, что этот метод уже был успешно применен нами для получения зрелых яйцеклеток сибирского осетра, которые в дальнейшем были использованы для получения гиногенетического потомства. При этом результаты оказались сопоставимыми с результатами по получению гиногенетического потомства из яйцеклеток, созревших

под влиянием гормонального воздействия *in vivo* (Грунина и др., 2010).

В дальнейшем представляется необходимым более точно определить условия культивирования фолликулов и гормональной обработки, обеспечивающие наилучший результат у самок с разным физиологическим состоянием. Вполне вероятно, что при определенном состоянии фолликулов лучший результат может быть получен при использовании не РМО, а среды Лейбовитца, а при другом – наоборот. В настоящее время при работе с уникальными самками представляется целесообразным для получения *in vitro* зрелых, овулировавших и способных к развитию яйцеклеток параллельно использовать и описанные ранее (Goncharov et al., 2009) и описанные в этой работе оптимальные условия культивирования фолликулов и их гормональной обработки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гончаров Б.Ф. Влияние состава среды культивирования на способность фолликулов осетровых рыб реагировать созреванием на действие гонадотропных гормонов // Вопросы раннего онтогенеза у рыб / Киев: Наукова Думка, 1978. С. 77–78.
- Гончаров Б.Ф., Полунан И.С., Вийо П., Ле Менн Ф. Влияние состава среды культивирования на созревание ооцитов осетровых рыб, индуцируемое гонадотропным гормоном и прогестероном // Онтогенез. 1997. Т. 28. С. 55–64.
- Гончаров Б.Ф., Вийо П., Ле Менн Ф. Морфологические и физиологические характеристики овариальных фолликулов сибирского осетра и их ценность для прогнозирования успеха искусственного размножения // Там же. 1999. Т. 30. С. 51–60.
- Грунина А.С., Скоблина М.Н., Гончаров Б.Ф. и др. Жизнеспособное гиногенетическое потомство сибирского осетра *Acipenser baeri* Brandt (Pisces, Acipenseridae), полученное с использованием яйцеклеток, овулировавших *in vitro* // ДАН. 2010. Т. 431. С. 269–273.
- Bobe J., Nguyen T., Fostier A. Ovarian function of the trout preovulatory ovary: New insights from recent gene expression studies // Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol. 2009. V. 153. P. 63–68.
- Bridges P.J., Komar C.M., Fortune J.E. Gonadotropin-induced expression of mRNA for cyclooxygenase-2 (COX-2) and production of prostaglandins E and F2{alpha} in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor // Endocrinology. 2006. V. 147. P. 4713–4722.
- Burzawa-Gerard E., Goncharov B.F., Fontaine Y.A. L'hormone gonadotrope hypophysaire d'un poisson chondroste' en, l'Esturgeon (*Acipenser stellatus* Pall.). 1. Purification // Gen. Comp. Endocrinol. 1975. V. 27. P. 289–295.
- Chang K.J., Kim J.W., Lee J. et al. Prostaglandin production and ovulation during exposure of amphibian ovarian follicles to gonadotropin or phorbol ester *in vitro* // Gen. Comp. Endocrinol. 1995. V. 100. P. 257–266.

- Chen M.H., Chen H., Zhou Z. *et al.* Involvement of CFTR in oviductal HCO₃-secretion and its effect on soluble adenylate cyclase-dependent early embryo development // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. P. 1744–1754.
- Detlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. *Sturgeon fishes: Developmental Biology and Aquaculture.* Berlin: Springer Verlag, 1993. P. 300.
- Diaz F.J., Anderson L.E., Wu Y.L. *et al.* Regulation of progesterone and prostaglandin F₂α production in the CL // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002. V. 191. P. 65–80.
- D'Inca R., Marteil G., Bazile F. *et al.* Proteomic screen for potential regulators of M-phase entry and quality of meiotic resumption in *Xenopus laevis* oocytes // *J. Proteomics.* 2010. V. 73. P. 1542–1550.
- Garbers D.L., Tubb D.J., Hyne R.V. A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 8980–8984.
- Gleeson A.R., Thorburn G.D., Cox R.I. Prostaglandin F concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the sow during the late luteal phase of the oestrous cycle // *Prostaglandins.* 1974. V. 5. P. 521–529.
- Goetz F.W. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes // *Fish physiology.* V. IXB / Eds. Hoar W.S. *et al.* N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 117–170.
- Goetz F.W., Garczynski M. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish // *Fish Physiol. Biochem.* 1997. V. 17. P. 33–38.
- Goetz F.W., Duman P., Berndtson A., Jankowsky E.G. The role of prostaglandins in the control of ovulation in yellow perch, *Perca flavescens* // *Fish Physiol. Biochem.* 1989. V. 7. P. 163–168.
- Goncharov B.F., Skoblina M.N., Trubnikova O.B., Vassetzky S.G. Hormonal induction of ovulation *in vitro* in sturgeon fishes // *Biology, Conservation and Development of Sturgeon* / Eds. Carmona R. *et al.* Springer, 2009. P. 175–185.
- Hedin L., Eriksson A. Prostaglandin synthesis is suppressed by progesterone in rat preovulatory follicles *in vitro* // *Prostaglandins.* 1997. V. 53. P. 91–106.
- Hedin L., Gaddy-Kurten D., Kurten R. *et al.* Prostaglandin endoperoxide synthase in rat ovarian follicles: content, cellular distribution, and evidence for hormonal induction preceding ovulation // *Endocrinology.* 1987. V. 121. P. 722–731.
- Hermenegildo C., Oviedo P.J., García-Martínez M.C. *et al.* Progestogens stimulate prostacyclin production by human endothelial cells // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. P. 1554–1561.
- Hellberg P., Larson L., Olofsson J. *et al.* Regulation of the inducible form of prostaglandin endoperoxide synthase in the perfused rat ovary // *Mol. Hum. Reprod.* 1996. V. 2. P. 111–116.
- Hess K.C., Jones B.H., Marquez B. *et al.* The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization // *Dev. Cell.* 2005. V. 9. P. 249–259.
- Kagawa H., Tanaka H.I., Unuma T. *et al.* Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica* // *Fish. Sci.* 2003. V. 69. P. 234–241.
- Kurusu S., Jinno M., Ehara H. *et al.* Inhibition of ovulation by a lipoxygenase inhibitor involves reduced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in gonadotropin-primed immature rats // *Reprod.* 2009. V. 137. P. 59–66.
- 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. P. 46–57.
- Liu Z., Su X., Li T. *et al.* Molecular cloning and expression of prostaglandin F₂α receptor isoforms during ovulation in the ovarian follicles of *Xenopus laevis* // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010. V. 93. P. 93–99.
- Lutes P.B. Oocyte maturation in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: some mechanisms and applications // *North American Sturgeons: Biology and Aquaculture Potential* / Eds. Binkowski E.P. and Doroshov S.I. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, 1985. P. 87–92.
- Masui Y., Clarke H.J. Oocyte maturation // *Int. Rev. Cytol.* 1979. V. 57. P. 185–282.
- Nagahama Y., Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish // *Dev. Growth Differ.* 2008. V. 50. Suppl. 1. P. 195–219.
- Pang Y., Thomas P. Role of G protein-coupled estrogen receptor 1, GPER, in inhibition of oocyte maturation by endogenous estrogens in zebrafish // *Dev. Biol.* 2010. V. 342. P. 194–206.
- Patino R., Yoshizaki G., Bolamba D., Thomas P. Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker // *Biol. Reprod.* 2003. V. 68. P. 516–523.
- Pinter J., Thomas P. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17, 20β, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1999. V. 115. P. 200–209.
- Sadler S.E., Angleson J.K., Dsouza M. IGF-1 receptors in *Xenopus laevis* ovarian follicle cells support the oocyte maturation response // *Biol. Reprod.* 2010. V. 82. P. 591–598.
- Schuetz A.W. Hormonal dissociation of ovulation and maturation of oocytes: ovulation of immature amphibian oocyte by prostaglandin // *Gamete Res.* 1986. V. 15. P. 99–113.
- Sena J., Liu Z. Expression of cyclooxygenase genes and production of prostaglandins during ovulation in the ovarian follicles of *Xenopus laevis* // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008. V. 157. P. 165–173.
- Thorburn G.D., Cox R.I., Currie W.B. *et al.* Prostaglandin F and progesterone concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the ewe during the oestrous cycle and early pregnancy // *J. Reprod. Fert.* 1973. Suppl. 18. P. 151–158.
- Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. Cyclooxygenases 1 and 2 // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998. V. 38. P. 97–120.
- Wallace R.A., Selman K. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. I. Preliminary observations on oocyte maturation *in vivo* and *in vitro* // *Dev. Biol.* 1978. V. 62. P. 354–369.
- Yoshizaki G., Patino R., Thomas P. *et al.* Effects of maturation-inducing hormone on heterologous gap junctional coupling in ovarian follicles of Atlantic croaker // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2001. V. 124. P. 359–366.

Stimulation in vitro of Oocytes of Acipenserids with Progesterone and Homologous Gonadotropic Hormone of Hypophysis

M. N. Skoblina and B. F. Goncharov

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: skoblina38@mail.ru*

Abstract—We showed that the percentage of oocytes of acipenserids ovulating in vitro in Ringer solution modified for sturgeons (RMS) considerably depends on the concentration of sodium bicarbonate and the concentration of progesterone. Under optimal conditions (0.5 g/L of sodium bicarbonate and 30 ng/mL of progesterone), it can be higher than 80. Oocytes that matured and ovulated under such conditions are capable of normal development. In the best case, approximately 70% of developing embryos (of the number of ovulated oocytes) reach the stage of hatching (dead-line of observation). This method of producing offspring based on the insemination of oocytes that have matured and ovulated in vitro can be used in work with single females of rare and disappearing species of acipenserids.

Keywords: acipenserids, maturation of oocytes, ovulation in vitro, cultivation medium, sodium bicarbonate, progesterone, gonadotropic hormone of the hypothesis.