

УДК 591.3:597.5

## РОЛЬ ОВОДНЕНИЯ В ОВУЛЯЦИИ ООЦИТОВ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ *IN VITRO*

© 2013 г. М. Н. Скоблина

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: skoblina38@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.12 г.

Окончательный вариант получен 21.11.12 г.

В процессе стимуляции овуляции ооцитов травяной лягушки *Rana temporaria* экстрактом гомологичных гипофизов происходит увеличение их объема. Воздействия, подавляющие оводнение ооцитов костистых рыб (раствор Рингера без ионов калия и ингибитор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы — оубаин), а также ингибиторы аквапоринов (хлористая ртуть и метилметанетиосульфат) приводят к тому, что объем окруженных фолликулярными оболочками ооцитов травяной лягушки под влиянием экстракта гомологичных гипофизов не увеличивается, а процент овулировавших ооцитов снижается. Объем ооцитов, лишенных фолликулярных оболочек, не меняется при созревании под действием прогестерона, на него не влияет ни одна из использованных обработок. Полученные данные позволяют предполагать, что в процессе стимуляции овуляции ооцитов травяной лягушки происходит их оводнение, необходимое для овуляции, оно не происходит в отсутствие клеток фолликулярной оболочки.

**Ключевые слова:** ооцит, фолликул, созревание, овуляция, оводнение, аквапорины, оубаин, хлористая ртуть, метилметанетиосульфат, амфибии.

DOI: 10.7868/S0475145013030075

Для превращения овариального ооцита в способное к оплодотворению яйцо необходимо, чтобы он созрел (произошла дезинтеграция оболочки ядра — “зародышевого пузырька” (ЗП), прошли деления созревания, “созрела” цитоплазма) и овулировал, т.е. освободился от оболочек, окружавших его в яичнике.

У ряда видов амфибий и костистых рыб механизм гормональной регуляции процессов созревания довольно хорошо изучен. Показано, что под влиянием гонадотропных гормонов гипофиза в фолликулярных клетках, окружающих ооцит, синтезируется стероид, который, действуя на ооцит, запускает процессы созревания (Masui, Clarke, 1979; Nagahama, 1990). Для видов, используемых в лаборатории, известны условия, в которых ооцит созревает *in vitro* под влиянием гонадотропинов или стероидов. Однако воспроизведение *in vitro* процесса овуляции сталкивается с большими трудностями. Созревшие *in vitro* ооциты зачастую не овулируют.

Созревание ооцитов костистых рыб сопровождается увеличением объема ооцита, вызванным оводнением. Оводнение рассматривается как процесс, обеспечивающий достаточную плавучесть выметанной икре, особенно пелагической (Wal-

lace, Selman, 1978; Cerda et al., 2007). Однако есть данные и об оводнении ооцитов морских рыб, откладывающих донную икру (Craik, Harvey, 1987), и пресноводных рыб (Hirose, 1976). С одной стороны, считается, что оводнение ооцитов костистых рыб в процессе созревания является уникальным явлением среди позвоночных (Wallace, Selman, 1978; Cerda et al., 2007), с другой — высказывается предположение о том, что оводнение ооцитов может играть роль в механизме овуляции (Hirose, 1976; Milla et al., 2006). Если предположение о роли оводнения в овуляции ооцитов справедливо, возникает вопрос, не является ли процесс оводнения ооцитов более универсальным, чем это принято считать, не может ли он участвовать в механизме овуляции ооцитов не только у костистых рыб, но и у других низших позвоночных? В литературе есть данные об увеличении объема (Mild, Lovtrup, 1985) и веса овулировавших ооцитов травяной лягушки (Руднева, 1968, цитировано по Детлаф, 1977), но предположений о связи этого процесса с овуляцией не высказывается. Если для овуляции ооцитов низших позвоночных действительно необходимо оводнение, то не может ли отсутствие овуляции при ее стимуляции *in vitro* быть связано с нарушением этого процесса?

Хироэ (Hirose, 1976) предположил, что в механизме оводнения ооцитов костистых рыб существенную роль играет поступление в ооцит неорганических ионов. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что оводнение ооцитов подавляется воздействиями, препятствующими их накоплению: средой, не содержащей ионы калия (Wallace et al., 1992), и подавлением  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы и натриевых каналов (LaFleur, Thomas, 1991). Установлено также, что оводнение ооцитов фундулуса обыкновенного (*Fundulus heteroclitus*) (McPherson et al., 1989) и японского речного угря (*Anguilla japonica*) (Kagawa et al., 2009) не происходит в отсутствие фолликулярных клеток. В последнее время показано, что в оводнении ооцитов костистых рыб участвуют аквапориновые водные каналы (АП), обеспечивающие пассивное поступление воды в клетку по осмотическому градиенту (Arge et al., 2002). Их участие в оводнении ооцитов обнаружено у дорады (*Sparus auratus*) (Fabra et al., 2005, 2006), японского речного угря (Kagawa et al., 2009) и пресноводного обыкновенного мешкожаберного сома (*Heteropneustes fossilis*) (Chaube et al., 2011). Их проницаемость, как и проницаемость большинства водных каналов, подавляется соединениями ртути и частично восстанавливается  $\beta$ -меркаптоэтанолом (Fabra et al., 2005; Kagawa et al., 2009; Chaube et al., 2011).

Мы хотели выяснить, происходит ли увеличение объема в процессе созревания и овуляции ооцитов травяной лягушки *in vitro*, и, если происходит, влияют ли на него воздействия, подавляющие оводнение ооцитов костистых рыб (среда без ионов  $\text{K}^+$ , подавление  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы, подавление аквапоринов). Для решения вопроса о том, играет ли увеличение объема какую-то роль в овуляции, мы сравнивали их влияние не только на объем ооцитов, но и на процент ооцитов, овулировавших под влиянием экстракта гомологичных гипофизов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Опыты были проведены на фолликулах травяной лягушки *Rana temporaria* на протяжении трех сезонов, нумерация самок сплошная (первый сезон: самки 1–14, второй: самки 15–27, третий: самки: 28–31). Отловленных осенью самок содержали в контейнере с небольшим количеством воды в темноте при 4°C. Самок забивали декапитацией после выдерживания в 0.2% растворе MS-222. Яичники переносили в раствор Рингера для холоднокровных и разделяли отточенными пинцетами на фрагменты, содержащие 1–5 фолликулов. Фрагменты тщательно перемешивали и переносили в чашки Петри с 5 мл раствора (по 33 фолликула на чашку). Фолликулы выдерживали в растворе Рингера (контроль) или в растворе ингибитора в течение 2 ч. Затем и в опыт и контроль добавляли

экстракт гипофизов травяной лягушки (до конечной концентрации 0.005–0.0025 гип/мл). В опытах по изучению влияния ингибиторов водных каналов фолликулы после преинкубации в растворе Рингера с ингибиторами отмывали в трех сменах раствора Рингера (по 10 мл) и помещали в раствор Рингера с прогестероном (1 мкг/мл). В ряде случаев фолликулы инкубировали в растворе Рингера с прогестероном или экстрактом гипофизов в течение разного времени (см. табл. 5), затем обрабатывали хлористой ртутью, отмывали и переносили в раствор Рингера с прогестероном. Для стимуляции овуляции в опытах с хлористой ртутью через сутки добавляли простагландин  $\text{F}_{2\alpha}$  (2.5 мкг/мл).

Фолликулы инкубировали при 15–17°C, созревание и овуляцию ооцитов регистрировали через 48 ч после начала гормональной обработки. Каждый вариант опыта ставили в двух–четыре повторения. Критерием овуляции служило отсутствие на ооцитах фолликулярной оболочки, хорошо выявляемое под бинокулярным микроскопом. После учета овуляции ооциты фиксировали кипячением, разрезали лезвием безопасной бритвы и определяли процент созревших ооцитов по отсутствию ЗП.

Фолликулярные оболочки удаляли пинцетами после обработки фрагментов яичника бескальциевым раствором Рингера. Режим обработки фолликулов бескальциевым раствором Рингера и проверка полноты удаления фолликулярных клеток подробно описаны ранее (Скоблина, Кондратьева, 1983). В каждом варианте опыта в чашке Петри с 5 мл раствора культивировали по 15–20 “голых” ооцитов. Для стимуляции их созревания использовали прогестерон (1 мкг/мл).

При определении процента овуляции для различных экспериментальных групп рассчитывали среднюю и ошибку средней. Для оценки достоверности различий ( $p < 0.05$ ) использовали критерий  $\chi^2$  для качественных показателей.

Измерение ооцитов и фолликулов обычно проводили через двое суток после начала гормональной обработки. Диаметры измеряли на их изображениях, полученных с помощью сканирования. В большинстве опытов сканировали 3–4 пробы в каждом варианте опыта и контроля на сканере Epson Perfection 4490 Photo. Была использована специальная компьютерная программа, которая обеспечивает автоматическое измерение двух диаметров ооцитов (наибольшего и перпендикулярного к нему) на изображениях, полученных для каждого экспериментального варианта, расчет объема каждого ооцита и определение среднего значения. Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя непараметрическую статистику – критерий Манна–Уитни–Уилкоксона для независимых выборок в программе SigmaPlot.

**Таблица 1.** Сравнение объемов исходных и овулировавших ооцитов

Дата опыта	Номер самки	Объем, мм <sup>3</sup> ( $M \pm m$ )		Разница в объеме исходных фолликулов и овулировавших ооцитов, %
		исходных фолликулов	овулировавших ооцитов	
03/01	1	3.11 ± 0.15 (32)	3.21 ± 0.13 (34)***	3.2
14/02	2	1.81 ± 0.11 (51)	1.86 ± 0.09 (31)*	2.8
14/02	3	2.16 ± 0.18 (24)	2.36 ± 0.14 (31)***	8.5
21/02	4	2.27 ± 0.22 (68)	2.36 ± 0.09 (46)**	3.9
22/02	5	1.69 ± 0.05 (25)	1.77 ± 0.10 (99)*	4.5
04/03	6	2.00 ± 0.15 (97)	2.05 ± 0.13 (119)	2.1
14/03	7	1.89 ± 0.10 (83)	1.95 ± 0.01 (122)***	3.0
18/03	8	1.73 ± 0.09 (83)	1.76 ± 0.09 (46)	1.8
29/03	9	1.18 ± 0.06 (148)	1.23 ± 0.06 (186)***	4.3
29/03	10	1.62 ± 0.09 (154)	1.69 ± 0.07 (202)***	3.4
29/3	11	1.60 ± 0.09 (61)	1.69 ± 0.06 (38)***	3.8
05/04	12	2.05 ± 0.09 (50)	2.13 ± 0.12 (97)***	3.7
11/04	13	2.09 ± 0.11 (71)	2.21 ± 0.09 (79)***	5.5
18/04	14	2.07 ± 0.12 (95)	2.13 ± 0.096 (82)**	2.9

Здесь и далее в скобках приведено число измерений. Здесь и далее \*  $P < 0.05$ , \*\*  $< 0.01$ , \*\*\*  $< 0.001$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Изменение объема ооцитов на разных стадиях созревания*

Измерения, проведенные на фолликулах 14 самок лягушки, показали, что объем исходных и созревших под влиянием экстракта гипофизов или прогестерона, но не овулировавших ооцитов не меняется (данные не приведены). Небольшие (2.8–8.5%), но достоверные увеличения объема наблюдаются у большинства овулировавших ооцитов (табл. 1). В двух случаях различия между исходными и овулировавшими ооцитами оказались недостоверным (самки 6 и 8).

### *Влияние ионов калия и $Na^+-K^+-ATP$ азы на овуляцию ооцитов, стимулированную экстрактом гипофизов, и на объем ооцитов*

Результаты опытов по влиянию раствора Рингера без ионов калия на овуляцию ооцитов травяной лягушки, стимулированную экстрактом гипофизов, и на объем ооцитов приведены в табл. 2. Можно видеть, что у всех пяти самок отсутствие в растворе ионов калия приводит к достоверному снижению объема ооцитов по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле, и к достоверному уменьшению процента овулировавших ооцитов.

Результаты опытов по влиянию оубаина на овуляцию ооцитов травяной лягушки, стимулированную экстрактом гипофизов, и на объем ооцитов сведены в табл. 3. Оубаин также достоверно снижает объем ооцитов по сравнению с объемом

ооцитов, овулировавших в контроле, и достоверно подавляет стимулированную овуляцию у всех восьми самок.

### *Влияние ингибиторов аквапоринов (хлористой ртути и метилметанетиосульфоната) на овуляцию ооцитов травяной лягушки, индуцированную прогестероном и простагландином $F_{2\alpha}$ , и на объем ооцитов*

В первых опытах мы использовали хлористую ртуть в концентрации 100 мкМ–1 мМ. Такая обработка сильно повреждала фолликулы. Дальнейшие опыты показали, что фолликулы разных самок травяной лягушки обладают разной чувствительностью к хлористой ртути. В табл. 4 приведены данные о влиянии разных концентраций хлористой ртути на объем фолликулов шести самок. Обработку 100 мкМ (10 мин) выдержала часть фолликулов двух самок (16 и 30), все фолликулы остальных самок при такой обработке погибли. Часть фолликулов пяти самок выдержала обработку 50 мкМ хлористой ртути (20 мин), обработку от 20 до 40 мкМ хлористой ртути (25 мин) выдержали фолликулы всех самок, но достоверное снижение объема достигалось не во всех случаях. Снижение объема фолликулов не зависело от концентрации хлористой ртути. На фолликулах дорады (Fabra et al., 2005) и японского речного угря (Kagawa et al., 2009) показано, что обработка фолликулов β-меркаптоэтанолом (1–5 мМ) сразу же после обработки хлористой ртутью в той или иной мере восстанавливает их объем. В наших опытах объем фоллику-

**Таблица 2.** Влияние раствора Рингера без ионов калия на процент ооцитов травяной лягушки, овулировавших под влиянием экстракта гипофизов, и на объем ооцитов/фолликулов

Дата опыта	Номер самки	Объем, мм <sup>3</sup> ( $M \pm m$ )		Овулировавшие ооциты, %	
		ооцитов, овулировавших в контроле	ооцитов/фолликулов в опыте	в контроле	в опыте
3/01	1	3.21 ± 0.13 (34)	3.09 ± 0.14 (33)***	71 ± 6	12 ± 5*
3/01	28	3.18 ± 0.16 (29)	2.95 ± 0.22 (32)***	35 ± 3	11 ± 2*
15/01	29	2.25 ± 0.12 (64)	2.10 ± 0.14 (79)***	43 ± 0	15 ± 2*
14/02	2	1.86 ± 0.09 (31)	1.72 ± 0.10 (27)***	52 ± 5	16.5 ± 3.5*
04/03	6	2.04 ± 0.13 (147)	1.89 ± 0.14 (155)***	36.5 ± 1.5	12.5 ± 4.5*

Здесь и далее созревание в контроле и опыте 98–100%.

**Таблица 3.** Влияние оубаина в концентрации 0.05 мМ на процент ооцитов травяной лягушки, овулировавших под влиянием экстракта гипофизов, и на объем ооцитов/фолликулов

Дата опыта	Номер самки	Объем, мм <sup>3</sup> ( $M \pm m$ )		Овулировавшие ооциты, %	
		ооцитов, овулировавших в контроле	ооцитов/фолликулов в опыте	в контроле	в опыте
14/02	2	1.86 ± 0.09 (31)	1.76 ± 0.09 (61)***	56 ± 3.5	5 ± 2*
14/02	3	2.36 ± 0.14 (31)	2.18 ± 0.17 (28)***	82 ± 5	10 ± 3*
22/02	6	2.04 ± 0.13 (147)	1.95 ± 0.13 (161)***	37 ± 2	0*
14/03	7	1.95 ± 0.10 (122)	1.82 ± 0.11 (142)***	64 ± 6	22 ± 5*
18/03	8	1.76 ± 0.09 (46)	1.69 ± 0.11 (56)**	47 ± 8	9 ± 3*
29/03	9	1.23 ± 0.06 (186)	1.14 ± 0.08 (136)***	78 ± 5	22 ± 4*
29/03	10	1.68 ± 0.07 (202)	1.57 ± 0.11 (65)***	85 ± 2	57 ± 4*
05/04	12	2.13 ± 0.12 (97)	2.05 ± 0.13 (66)***	57 ± 4	7 ± 2*

**Таблица 4.** Влияние концентрации хлористой ртути на объем созревших ооцитов, окруженных фолликулярными оболочками

Дата опыта	Номер самки	Объем ооцитов в контроле, мм <sup>3</sup> ( $M \pm m$ )	Объем ооцитов, мм <sup>3</sup> ( $M \pm m$ ) после обработки ртутью в концентрации				
			20 мкМ	30 мкМ	40 мкМ	50 мкМ	100 мкМ
30/01	15	2.68 ± 0.18 (63)	2.52 ± 0.14 (54)***	2.50 ± 0.10 (39)***		2.52 ± 0.13 (35)***	
09/02	16	2.28 ± 0.11 (90)		2.25 ± 0.12 (71)	2.24 ± 0.12 (49)	2.21 ± 0.10 (40)***	2.17 ± 0.26 (31)***
09/02	17	1.66 ± 0.09 (32)	1.62 ± 0.05 (32)*	1.54 ± 0.12 (11)**		1.50 ± 0.07 (17)**	
09/02	30	2.33 ± 0.13 (83)		2.24 ± 0.10 (39)***	2.21 ± 0.10 (41)***	2.15 ± 0.09 (32)***	2.16 ± 0.09 (26)***
14/02	18	2.38 ± 0.18 (29)		2.31 ± 0.15 (29)	2.26 ± 0.18 (30)*	2.26 ± 0.13 (22)**	
07/04	27	1.56 ± 0.08 (61)		1.54 ± 0.10 (54)	1.53 ± 0.09 (54)*		

Достоверность указана по отношению к контролю.

лов двух самок травяной лягушки достоверно увеличивался под влиянием 15-минутной обработки  $\beta$ -меркаптоэтанолом (5 мМ) сразу же после их обработки хлористой ртутью (30 мкМ). Однако  $\beta$ -меркаптоэтанол в отсутствие хлористой ртути тоже достоверно увеличивал объем фолликулов (данные не приведены). Кроме того, фолликулы, обработанные  $\beta$ -меркаптоэтанолом, как после обработки ртутью, так и без нее, повреждались. У японского речного угря отмечено снижение процента созревания ооцитов на 90% после обработки фолликулов хлористой ртутью и  $\beta$ -меркаптоэтанолом (1 мМ) (Kagawa et al., 2009).

Окруженные фолликулярными оболочками ооциты травяной лягушки, обработанные хлористой ртутью, не созревали под влиянием экстракта гипофизов. Прогестерон стимулировал созревание выживших ооцитов всех самок при всех использованных обработках. Фолликулы с созревшими ооцитами выглядели неповрежденными в течение двух суток (времени, необходимого для овуляции *in vitro* ооцитов травяной лягушки в период зимовки), но овуляция не происходила, а в контроле овулировали единичные ооциты. Поскольку под влиянием прогестерона ооциты травяной лягушки плохо овулируют, а простагландин  $F_{2\alpha}$  увеличивает стимулирующее действие стероида (Скоблина и др., 1996), к фолликулам в опыте и контроле добавляли простагландин  $F_{2\alpha}$ .

Кроме того, опыты проводили в самом конце периода зимовки и обрабатывали ртутью не только фолликулы на исходной стадии, но и предварительно обработанные прогестероном или экстрактом гипофизов, чтобы ингибитор действовал на наиболее подготовленные к овуляции фолликулы и ооциты.

Опыты проведены на фолликулах пяти самок. Их результаты сведены в табл. 5. Можно видеть, что в большинстве случаев хлористая ртуть вызывает и снижение объема ооцитов по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле, и подавление овуляции, стимулированной прогестероном и простагландином  $F_{2\alpha}$ . Однако есть и исключения. В двух случаях (самка 21 — обработка 30 мкМ хлористой ртути после 15 ч предобработки экстрактом гипофизов (0.0025 гип/мл) и самка 26 — обработка 10 мкМ хлористой ртути после 8.5 ч предобработки прогестероном) различия в объеме ооцитов оказались недостоверными, а различия в проценте овулировавших ооцитов — достоверными. Возможно, в этих случаях фолликулярные клетки оказались более чувствительными к повреждающему действию ртути. Чем объясняется противоположный результат — отсутствие подавления овуляции ооцитов при достоверном снижении объема фолликулов (обработка хлористой ртутью (30 мкМ) фолликулов самки 27 после 6 ч их предобработки прогестероном) — сказать трудно. Возможно, снижения объема ооцита (хоть

оно и достоверно по сравнению с объемом овулировавших ооцитов) недостаточно для подавления овуляции. Можно видеть также, что даже при использовании предварительной гормональной обработки только к концу периода зимовки из обработанных хлористой ртутью фолликулов овулируют единичные ооциты. Позднее хлористая ртуть (20 и 30 мкМ) уже не влияет ни на объем фолликулов, ни на овуляцию ооцитов (самка 27).

В качестве другого ингибитора водных каналов мы использовали не содержащий ртути сульфгидрильный реагент — метилметанетиосульфат (ММТС) (Kurbannazarova et al., 2003; Kida et al., 2005), который не оказывает на клетки такого повреждающего влияния, как хлористая ртуть.

Опыты по влиянию ММТС на изменение объема и овуляцию ооцитов лягушки, стимулированную прогестероном, проведены на фолликулах трех самок (табл. 6). (В этих опытах простагландин  $F_{2\alpha}$  не использован.) Оказалось, что ни одна из концентраций ММТС (от 10 мкМ до 1 мМ) при продолжительности обработки от 1 ч до суток внешне не повреждала фолликулы. В концентрации 1 мМ ММТС во всех случаях подавлял созревание ооцитов, в концентрации 450 мкМ ооциты созревали, но не овулировали. В концентрациях от 10 до 150 мкМ, часть ооцитов овулировала. При обработке фолликулов 10 мкМ ММТС в течение 1–2 ч у всех самок не наблюдалось ни снижения объема ооцитов, ни подавления овуляции. Достоверное снижение объема ооцитов по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле, и подавление овуляции наблюдалось при использовании ММТС в концентрациях 50 и 150 мкМ (2 ч) и 10 мкМ (12 ч). Видно, что достоверному снижению объема фолликулов под влиянием ММТС соответствует снижение процента овулировавших ооцитов. Исключение составляет обработка 50 мкМ ММТС фолликулов самок 20 и 23. Объем фолликулов в этих случаях менялся достоверно, а процент овуляции — недостоверно. Возможная причина такого расхождения результатов обсуждалась выше.

Стоит отметить, что ММТС повреждает фолликулы меньше, чем хлористая ртуть, поскольку овуляция ооцитов происходит без предварительной гормональной обработки фолликулов и без добавления в среду простагландина  $F_{2\alpha}$ .

#### *Роль фолликулярных оболочек в оводнении ооцитов*

Ооциты травяной лягушки после удаления фолликулярных оболочек созревают в растворе Рингера с прогестероном, их объем не отличается достоверно от объема фолликулов на исходной стадии и не изменяется при созревании. Он не меняется и при инкубации в растворе Рингера без ионов калия или в растворе Рингера с оубаином

**Таблица 5.** Влияние хлористой ртути на объем ооцитов/фолликулов и процент ооцитов, овулировавших под влиянием прогестерона и простагландина F<sub>2α</sub>

Дата опыта	Номер самки	Концентрация HgCl <sub>2</sub> , мкМ	Время предобработки гормоном (ЭГ, прог) до начала обработки HgCl <sub>2</sub> , часы	Объем, мм <sup>3</sup> ( <i>M</i> ± <i>m</i> )		Овулировавшие ооциты, %		
				ооцита/фолликула в контроле	ооцита/фолликула в опыте	в контроле	в опыте	
14/03	21	30	0	2.36 ± 0.10 (68)	2.24 ± 0.11 (45)***	8.5 ± 2.5	0*	
			ЭГ 0.0025	2.38 ± 0.09 (35)	2.29 ± 0.06(28)***	15.5 ± 0.5	0*	
			12					
			ЭГ 0.0025 15	2.40 ± 0.10 (34)	2.36 ± 0.07(34)	33.5 ± 3.5	0*	
22/03	24	30	0	1.52 ± 0.08 (100)	1.42 ± 0.06 (61)***	26.5 ± 6.5	0*	
			ЭГ 0.00125	1.52 ± 0.07 (31)	1.45 ± 0.05 (35)***	33 ± 0	0*	
			3					
			ЭГ 0.00125 12	1.51 ± 0.06 (36)	1.46 ± 0.07 (33)***	35 ± 2	0*	
22/03	25	30	0	2.43 ± 0.09 (134)	2.29 ± 0.14 (63)***	43 ± 5	0*	
			ЭГ 0.00125	2.44 ± 0.09 (68)	2.31 ± 0.06(65)***	43 ± 5	0*	
			3					
			ЭГ 0.00125 12	2.44 ± 0.09 (68)	2.20 ± 0.21(35)***	65 ± 2	0*	
04/04	26	10	0	1.64 ± 0.07 (54)	1.59 ± 0.08 (47)***	40.5 ± 12.5	0*	
			0	1.64 ± 0.07 (54)	1.55 ± 0.07 (48)***	40.5 ± 12.5	0*	
			0	1.64 ± 0.07 (54)	повреждены	40.5 ± 12.5	повреждены	
			10	прог. 8.5	1.64 ± 0.07 (56)	1.63 ± 0.01 (59)	54 ± 1.5	14 ± 0*
			20	прог. 8.5	1.64 ± 0.07 (56)	1.56 ± 0.08 (59)***	54 ± 1.5	1.5 ± 1.5*
			30	прог. 8.5	1.64 ± 0.07 (56)	1.53 ± 0.07 (56)***	54 ± 1.5	0*
07/04	27	30	0	1.63 ± 0.07 (82)	1.56 ± 0.09 (59)**	35 ± 5	14 ± 4*	
			20	прог. 3	1.63 ± 0.07 (77)	1.60 ± 0.08 (56)	35.5 ± 3.5	40 ± 3
			30	прог. 3	1.63 ± 0.07 (77)	1.56 ± 0.09 (56)**	35.5 ± 3.5	1.5 ± 1.5*
			20	прог. 6	1.63 ± 0.07 (83)	1.61 ± 0.07 (80)	35.5 ± 3.5	30 ± 10
			30	прог. 6	1.63 ± 0.07 (83)	1.58 ± 0.07 (60)***	35.5 ± 3.5	41.5 ± 1.5
			20	прог. 9	1.63 ± 0.07 (78)	1.60 ± 0.08 (53)	35.5 ± 3.5	33.5 ± 3.5
			30	прог. 9	1.63 ± 0.07 (78)	1.60 ± 0.08 (53)	35.5 ± 3.5	35 ± 2

ЭГ – экстракт гипофиза – гип/мл, прог – прогестерон – 1 мкг/мл.

(0.05 мМ) как в присутствии, так и в отсутствие прогестерона (данные не приведены).

#### *Влияние хлористой ртути и ММТS на объем ооцитов без фолликулярных оболочек*

В опытах с хлористой ртутью использованы ооциты без фолликулярных оболочек четырех самок. Ооциты оказались более чувствительными к хлористой ртути, чем фолликулы. Неповрежденные “голые” ооциты, созревшие после обработки хлористой ртутью, удалось получить только при использовании концентраций от 10 до 20 мкМ

(25 мин). Однако объем таких ооцитов или не отличался достоверно от объема созревших в прогестероне ооцитов, или увеличивался. Увеличение концентрации ртути приводило к более выраженному разбуханию ооцита, а затем и к его повреждению (данные не приведены).

Поскольку ранее было показано, что при использовании хлористой ртути в концентрациях 0.3–10 мкМ достоверное снижение объема ооцитов шпорцевой лягушки наблюдается при обработке 1 мкМ (Virkki et al., 2002), мы обработали ооциты четырех самок травяной лягушки хлористой ртутью в концентрации 0.1, 0.5, 1, и 5 мкМ.

**Таблица 6.** Влияние метилметанесульфоната (ММТС) на овуляцию ооцитов травяной лягушки, стимулированную прогестероном, и объем ооцитов/фолликулов

Дата опыта	Номер самки	Концентрация ММТС, мкМ	Объем, мм <sup>3</sup> ( $M \pm m$ )		Овулировавшие ооциты, %	
			ооцитов, овулировавших в контроле	ооцитов/фолликулов в опыте	в контроле	в опыте
22/02	19	10	2.21 ± 0.12 (62)	2.17 ± 0.11 (58)	34.5 ± 2.5	36.5 ± 6.5
		10	2.21 ± 0.12 (62)	2.12 ± 0.10 (29)**	34.5 ± 2.5	19.5 ± 1.5*
07/03	20	50	2.25 ± 0.12 (62)	2.19 ± 0.13 (29)*	29 ± 3	19.5 ± 6.5
		150	2.25 ± 0.12 (62)	2.18 ± 0.10 (31)**	23 ± 9	0*
18/03	23	50	2.38 ± 0.09 (59)	2.29 ± 0.06 (28)***	23 ± 9	14.5 ± 7.5
		150	2.38 ± 0.09 (59)	2.26 ± 0.08 (31)***	23 ± 9	0*

Объем ооцитов измеряли до обработки ртутью, непосредственно после нее и через сутки после обработки. Ни одна из использованных концентраций не привела к достоверному снижению объема ооцита (данные не приведены).

Влияние ММТС на лишённые фолликулярных оболочек ооциты травяной лягушки исследовано на трех самках. Обработка ММТС в концентрации 50 и 150 мкМ в течение 2 ч внешне не повредила ооциты и не влияла на их созревание, объем ооцитов не изменялся. Увеличение концентрации ММТС приводило к повреждению ооцитов (данные не приведены).

## ОБСУЖДЕНИЕ

### *Измерение объема ооцитов травяной лягушки*

Мы измеряли объем ооцитов и фолликулов травяной лягушки на исходной стадии, созревших (после РЗП) и овулировавших и показали, что небольшие, но достоверные изменения объема наблюдаются только у овулировавших ооцитов (табл. 1). Поскольку изменение объема очень невелико, для получения достоверных результатов приходится отбраковывать самок с очень разным размером исходных фолликулов и самок с заметным числом дегенерирующих фолликулов, которые легко отличить по изменению пигментного рисунка. Другим ограничением является время измерения объема овулировавших ооцитов. Наибольшие различия удается получить, если овуляция ооцитов происходит достаточно синхронно: между появлением первых овулировавших ооцитов и овуляцией основной их массы проходит несколько часов. Дело в том, что для овулировавшего ооцита раствор Рингера становится гипертоничным и со временем объем ооцита начинает снижаться (Руднева, 1968, цитировано по Детлаф, 1977). По-видимому, именно с гомогенностью исходной популяции фолликулов и синхронностью стимулированной овуляции связаны различия в

величине изменения объема ооцитов разных самок, выраженные в процентах (табл. 1).

### *Изменение объема ооцитов амфибий в процессе созревания и овуляции и увеличение поступления ионов*

Отсутствие изменения объема ооцитов травяной лягушки в процессе созревания не противоречит литературным данным, поскольку показано, что в процессе созревания ооцитов шпорцевой (*Xenopus laevis*) и леопардовой (*Rana pipiens*) лягушек не изменяется ни объем ооцита, ни содержание воды (Morrill, Ziegler, 1980; Cameron et al., 1983; Lau et al., 1984). С другой стороны, увеличение объема овулировавших ооцитов травяной лягушки, наблюдавшееся в наших опытах, было отмечено и ранее. Объем ооцитов, овулировавших *in vivo*, оказался больше объема исходных ооцитов на 6.7% (Mild, Lovtrup, 1985), а вес — на 6.9% (Руднева, 1968, цитировано по Детлаф, 1977). Эти изменения объема и веса ооцитов, по-видимому, обусловлены поступлением воды, стимулированным поступлением ионов. Во всяком случае, показано, что по сравнению с исходными ооцитами в овулировавших ооцитах жабы-аги (*Bufo marinus*) и синеголовой квакши (*Hyla labialis*) статистически достоверно увеличивается концентрация ионов калия (De Luque al., 1961). Ооцит леопардовой лягушки в процессе овуляции поглощает ионы натрия (Morrill et al., 1974). Увеличение концентрации ионов натрия ко времени овуляции ооцитов леопардовой лягушки наблюдали и Гупта с соавторами (Gupta et al., 1985).

В наших опытах раствор Рингера без ионов калия и оубаин (0.05 мМ) достоверно подавляли увеличение объема окруженных фолликулярными оболочками ооцитов травяной лягушки по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле, и их овуляцию и не влияли на объем “голых” ооцитов. Данных об оубаин-чувствительной Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазе в фолликулярных оболочках,

окружающих ооциты амфибий, нет. Однако показано, что фермент присутствует в гомогенатах яичников леопардовой лягушки (Morrill et al., 1974) и его активность увеличивается в период созревания, достигая максимума незадолго до завершения РЗП. И на стадии профазы мейоза, и в процессе созревания ее активность подавляется оубаином или строфантиндином (1 мМ) (Morrill et al., 1974). Мы предполагаем, что  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, ответственная за увеличение объема ооцитов амфибий, локализована в фолликулярных клетках. Предположение о том, что механизм поглощения ионов калия в фолликулах фундулюса локализован в фолликулярных клетках было высказано ранее (Wallace et al., 1992). Локализация  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, участвующей в оводнении ооцитов рыб, тоже не известна, поскольку измерения проводили в ткани яичника (Cerdea et al., 2007). Возможно, что у лягушки заметную роль в оводнении ооцитов играют и ионы натрия. Наши предварительные опыты показали, что амилорид (ингибитор натриевых каналов) снижает процент овулировавших ооцитов. Однако в отличие от оубаина амилорид заметно влияет на созревание ооцитов, что осложняет его использование при изучении зависимости между увеличением объема и овуляцией. Кроме того, он светочувствителен, что при использовании нашего метода измерения объема, не позволяет проводить повторных измерений, поскольку происходит дезактивация ингибитора. По этим причинам мы не использовали амилорид в наших опытах на фолликулах травяной лягушки.

#### *Роль фолликулярных оболочек*

В наших опытах объем “голых” ооцитов травяной лягушки не менялся ни при созревании под влиянием прогестерона в растворе Рингера, ни под влиянием воздействий, подавляющих оводнение ооцитов костистых рыб. Участие фолликулярных клеток в процессе оводнения впервые обнаружено на фолликулах фундулюса. “Голые” ооциты фундулюса нормально созрели, но не увеличивались в объеме. Авторы высказали предположение о том, что фолликулярные клетки обеспечивают транспорт в ооцит воды или ионов калия или и того и другого (McPherson et al., 1989; Wallace et al., 1992). Моррилл с соавторами (Morrill et al., 1977) обнаружили, что в фолликуле леопардовой лягушки (*Rana pipiens*) фракция быстро обменивающихся ионов калия связана в основном с фолликулярными оболочками. Уже упоминалось, что “голые” ооциты японского речного угря также не оводняются (Kagawa et al., 2009).

#### *Роль аквапоринов*

Используя два ингибитора АП (хлористая ртуть и ММТС), мы показали, что они вызывают досто-

верное снижение объема ооцитов травяной лягушки по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле. Ингибиторы действовали только в присутствии фолликулярных оболочек, не влияли на созревание ооцитов, стимулированное прогестероном, но подавляли овуляцию.

Подавление хлористой ртутью оводнения окруженных фолликулярными оболочками ооцитов ранее описано у дорады (Fabra et al., 2005) и японского речного угря (Kagawa et al., 2009). Подавление оводнения у этих видов не влияло на созревание ооцитов, стимулированное мейоз-индуцирующим стероидом (Fabra et al., 2005; Kagawa et al., 2009) и не происходило в отсутствие фолликулярных клеток (McPherson et al., 1989; Kagawa et al., 2009). Снижение объема фолликулов рыб зависело от концентрации хлористой ртути (Fabra et al., 2005; Kagawa et al., 2009), для фолликулов травяной лягушки такой зависимости не обнаружено.

Остановимся подробнее на данных об АП в ооцитах рыб и амфибий. Как в ооцитах рыб, которым свойственно выраженное оводнение (дорада, японский речной угорь), так и в ооцитах пресноводных рыб, оводняющихся незначительно (речной сом), обнаружен специфичный для костистых рыб АП, относящийся к подсемейству – *aqp1b* (Fabra et al., 2005, 2006, Tingaud-Sequeira et al., 2008; Chaube et al., 2011; Kagawa et al., 2011). *aqp1b* обнаружен даже в яичнике данио (*Danio rerio*) (Tingaud-Sequeira et al., 2010), ооциты которого практически не претерпевают оводнения (Selman et al., 1993).

Первые данные, позволяющие предполагать существование водных каналов в ооцитах амфибий, были получены на песочной жабе (*Bufo arenarum*) (Capurro et al., 1994). Капуро с соавторами показали, что проницаемость ооцитов жаб для воды значительно выше, чем у ооцитов шпорцевых лягушек. Более того, хлористая ртуть в концентрации 300 мкМ обратимо подавляла осмотическую проницаемость ооцитов жаб и не влияла на проницаемость ооцитов лягушек. Авторы пришли к выводу о том, что в ооцитах жаб в отличие от ооцитов шпорцевых лягушек присутствуют водные каналы. Инъекция мРНК, полученной из ооцитов жаб в ооциты шпорцевых лягушек, увеличивала осмотическую проницаемость последних, теперь она обратимо снижалась при обработке ооцитов хлористой ртутью (Ford et al., 1996). Несмотря на то, что физиологическими методами обнаружить присутствие водных каналов в ооцитах шпорцевой лягушки не удалось, оказалось, что в ее ооцитах присутствуют два АП. Шрейбер с соавторами клонировали гомолог АП3 шпорцевой лягушки и обнаружили экспрессию мРНК АП3 в ооцитах (Schreiber et al., 2000). Кроме того, из ооцитов шпорцевой лягушки клонировали новый АП, который был назван АП<sub>х10</sub> (Virkki et al., 2002). Экспрессия мРНК АП<sub>х10</sub> в ооцитах шпорцевой лягушки увеличивала их осмотическую проницае-

мость для воды. Уровень экспрессии белка АПх<sub>0</sub>, по-видимому, различен в разных ооцитах шпорцевой лягушки. Как уже отмечалось ранее, хлористая ртуть в концентрации 1 мкМ достоверно снижает проницаемость ооцитов шпорцевой лягушки для воды (Virkki et al., 2002). Однако, судя по тому, что эта проницаемость очень невелика и хлористая ртуть или не влияет на нее (Sаригго et al., 1994; Schreiber et al., 1997, 2000), или вызывает лишь небольшое снижение (Virkki et al., 2002), эндогенных белков АПЗ и АПх<sub>0</sub> в ее ооцитах очень мало. Об АП в ооцитах травяной лягушки ничего не известно.

Мы не наблюдали снижения объема “голых” ооцитов травяной лягушки под влиянием хлористой ртути (0.1–20 мкМ) и ММТС. У дорады и угря такие попытки не предпринимались. Капуру с соавторами наблюдали снижение под влиянием хлористой ртути (300 мкМ) объема “голых” ооцитов жабы, но не шпорцевой лягушки (Sаригго et al., 1994), а Вирки с соавторами – и “голых” ооцитов шпорцевой лягушки под влиянием очень низких концентраций хлористой ртути (Virkki et al., 2002). С чем связана такая разница в реакции ооцитов на хлористую ртуть даже при проведении опытов на ооцитах одного вида амфибий сказать трудно.

В фолликуле низших позвоночных АП обнаружены только в ооцитах, но фолликулярные клетки необходимы для оводнения (McPherson et al., 1989; Fabra et al., 2005; Kagawa et al., 2009). Какова же их роль? Уоллес с соавторами (Wallace et al., 1992) предположили, что в фолликулярных клетках локализован механизм поглощения ионов калия, которые переходят в ооцит по щелевым контактам. С тех пор при изучении роли гетерологичных щелевых контактов между ооцитом и фолликулярными клетками получены противоречивые результаты. Серда с соавторами (Serda et al., 1993) показали, что активатор протеинкиназы С (форболовый эфир форбол-12-миристат-13-ацетат) и 1-октанол, которые разобшают щелевые контакты, подавляют оводнение фолликулов фундулюса, а Кагава с соавторами (Kagawa et al., 2009), что два других ингибитора щелевых контактов (карбенксалон и 1-октанол) не влияют на оводнение ооцитов японского речного угря. В последнем случае, однако, не доказано, что ингибиторы действительно подавляют щелевые контакты. Являются ли фолликулярные клетки источником какого-то воздействия, стимулирующего оводнение ооцитов, или в процессе их удаления ооциты повреждаются и теряют способность к оводнению, пока сказать трудно.

#### *Роль оводнения в овуляции*

Показано, что у карпа (*Cyprinus carpio*) и золотой рыбки (*Carassius auratus*) содержание воды в яичнике выше у овулирующих самок, чем у неовулирующих как при индуцированной гормоном, так и

при естественной овуляции (Clemens, Grant, 1964). Авторы пришли к выводу о том, что увеличение содержания воды представляет собой часть процесса овуляции. Сходные результаты были получены для аю (*Plecoglossus altivelis*) (Hirose et al., 1974). Оказалось, что содержание воды и ионов в яичнике аю увеличивалось после инъекции самкам хорионического гонадотропина человека. На основании подобных наблюдений было высказано предположение о том, что оводнение ооцитов рыб может играть роль в механизме овуляции (Hirose, 1976). В дальнейшем подобные предположения высказывались неоднократно: разбухание ооцита может механически способствовать разрушению фолликула и выходу ооцита медаки (Pendegrass, Schroeder, 1976), увеличение внутрифолликулярного давления необходимо для овуляции ооцитов дальневосточного морского карася (Yueh, Chang, 2000), оводнение, происходящее непосредственно перед овуляцией, необходимо для завершения овуляции радужной форели (Milla et al., 2006). Мы попытались проверить это предположение экспериментально и показали, что в процессе овуляции ооцитов травяной лягушки под влиянием гонадотропных гормонов гипофиза их объем достоверно увеличивается. Воздействия, подавляющие оводнение ооцитов костистых рыб: отсутствие ионов калия в среде, подавление Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы и водных каналов приводят к подавлению увеличения объема ооцитов и снижают процент овулировавших ооцитов. По-видимому, есть основания считать, что в процессе овуляции ооцитов травяной лягушки происходит их оводнение, играющее какую-то роль в механизме овуляции. Вопросы о том, справедливо ли это для других низших позвоночных (как имеющих ген *aqp1b*, так и не имеющих его) и какую роль играет оводнение (даже столь незначительное, как у травяной лягушки) в механизме овуляции пока остаются открытыми.

Автор выражает глубокую признательность Б.Ф. Гончарову за помощь в разработке метода измерения объема фолликулов и ценные замечания при подготовке статьи и Г.А. Клевезаль за помощь в статистической обработке материала.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Детлаф Т.А. Становление организации зрелого яйца у амфибий и рыб на заключительных стадиях оогенеза, в период созревания // Современные проблемы оогенеза / Ред. Мицкевич М.С., Детлаф Т.А. и др. М.: Наука, 1977. С. 5–50.
- Руднева Т.Б. 1968, цитировано по Детлаф Т.А., 1977.
- Скоблина М.Н., Кондратьева О.Т. Созревание *in vitro* ооцитов травяной лягушки, одетых фолликулярными оболочками и лишенных их под действием холестерина // Онтогенез. 1983. Т. 14. С. 484–490.
- Скоблина М.Н., Кондратьева О.Т., Никифорова Г.П., Хухтаниemi И. Влияние ингибитора хлорных каналов и сред со сниженной концентрацией ионов

- хлора на овуляцию ооцитов травяной лягушки // Там же. 1996. Т. 27. С. 434–439.
- Agre P., King L.S., Yasui M. et al. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine // J. Physiol. 2002. V. 542. P. 3–16.
- Cameron I.L., LaBadie D.R., Hunter K.E., Hazlewood C.F. Changes in water proton relaxation times and in nuclear to cytoplasmic element gradients during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes // J. Cell Physiol. 1983. V. 116. P. 87–92.
- Capurro C., Ford P., Ibarra C. et al. Water permeability properties of the ovarian oocytes from *Bufo arenarum* and *Xenopus laevis*: a comparative study // J. Membr. Biol. 1994. V. 138. P. 51–57.
- Cerda J.L., Petrino T.R., Wallace R.A. Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation // Dev. Biol. 1993. V. 160. P. 228–235.
- Cerda J., Fabra M., Raldúa D. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration // The fish oocyte. Eds. Babin P.J. et al. Netherlands: Springer, 2007. P. 349–396.
- Chaube R., Chauvigné F., Tingaud-Sequeira A. et al. Molecular and functional characterization of catfish (*Heteropneustes fossilis*) aquaporin-1b: changes in expression during ovarian development and hormone-induced follicular maturation // Gen. Comp. Endocrinol. 2011. V. 170. P. 162–171.
- Clemens H.P., Grant F.B. Gonadal hydration of carp (*Cyprinus carpio*) and goldfish (*Carassius auratus*) after injections of pituitary extracts // Zoologica. 1964. V. 49. P. 193–210.
- Craik J.C.A., Harvey S.M. The causes of buoyancy in egg of marine teleosts // J. Mar. Biol. Assoc. 1987. V. 67. P. 169–182.
- De Luque O., Hunter A.S., Hunter F.R. Osmotic studies of amphibian eggs. III. Ovulated eggs // Biol. Bull. 1961. V. 121. P. 497–506.
- Fabra M., Raldúa D., Power D.M. et al. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated // Science. 2005. V. 307. P. 545.
- Fabra M., Raldúa D., Bozzo M. et al. Yolk proteolysis and aquaporin-1o play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption // Dev. Biol. 2006. V. 295. P. 250–262.
- Ford J.K., Amodeo G., Capurro C. et al. Progesterone inhibition of water permeability in *Bufo arenarum* oocytes and urinary bladder // Am. J. Physiol. 1996. V. 270. P. F880–F885.
- Gupta R.K., Kostellow A.B., Morrill G.A. NMR studies of intracellular sodium ions in amphibian oocytes, ovulated eggs, and early embryos // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 9203–9208.
- Hirose K. Endocrine control of ovulation in medaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*) // J. Fish. Res. Bd. Can. 1976. V. 33. P. 989–994.
- Hirose K., Hirano T., Ishida R. Effects of salmon gonadotropin on ovulation in ayu, *Plecoglossus altivelis*, with special reference to water balance // Comp. Biochem. Physiol. 1974. V. 47A. P. 283–289.
- Kagawa H., Horiuchi Y., Kasuga Y., Kishi T. Oocyte hydration in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) during meiosis resumption and ovulation // J. Exp. Zool. Part A. Ecol. Gen. Physiol. 2009. V. 311A. P. 752–762.
- Kagawa H., Kishi T., Gen K. et al. Expression and localization of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation // Reprod. Biol. Endocrinol. 2011. V. 9. P. 71–80.
- Kida H.T., Miyoshi K., Manabe N. et al. Roles of aquaporin-3 Water channels in volume-regulatory water flow in a human epithelial cell line // J. Membr. Biol. 2005. V. 208. P. 55–64.
- Kurbannazarova R.S., Tashmukhamedov B.A., Sabirov R.Z. Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes // Gen. Physiol. Biophys. 2003. V. 22. P. 221–232.
- LaFleur G.J., Jr., Thomas P. Evidence for a role of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase in the hydration of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation // J. Exp. Zool. 1991. V. 258. P. 126–136.
- Lau Y.T., Reynhout J.K., Horowitz S.B. Regional water changes during oocyte meiotic maturation: evidence of ooplasmic segregation // Dev. Biol. 1984. V. 104. P. 106–110.
- Masui Y., Clarke H.J. Oocyte maturation // Intern. Rev. Cytol. 1979. V. 57. P. 185–282.
- McPherson R., Greeley M.S., Wallace R.A. The influence of yolk protein proteolysis on hydration in oocytes of *Fundulus heteroclitus* // Dev. Growth. Differ. 1989. V. 31. P. 475–483.
- Mild K.H., Lovtrup S. Movement and structure of water in animal cells. Ideas and experiments // Biochem. Biophys. Acta. 1985. V. 822. P. 155–167.
- Milla S., Jalabert B., Rime H. et al. Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and *in vitro* regulation by 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol // J. Exp. Biol. 2006. V. 209. P. 1147–1156.
- Morrill G.A., Ziegler D. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake and exchange by the amphibian oocyte during the first meiotic division // Dev. Biol. 1980. V. 74. P. 216–223.
- Morrill G.A., Kostellow A., Murphy J.B. Role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase in early embryonic development // Ann. NY Acad. Sci. 1974. V. 242. P. 543–559.
- Morrill G.A., Ziegler D., Zabrenetzky V.S. An analysis of transport, exchange, and binding of sodium and potassium in isolated amphibian follicles // J. Cell Sci. 1977. V. 26. P. 311–322.
- Nagahama Y. Endocrine control of oocyte maturation in teleosts // Prog. Clin. Biol. Res. 1990. V. 342. P. 385–392.
- Pendergrass P., Schroeder P. The ultrastructure of the thecal cell of the teleost, *Oryzias latipes*, during ovulation *in vitro* // J. Reprod. Fertil. 1976. V. 47. P. 229–233.
- Schreiber R., Greger R., Nitschke R. et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes // Pflügers Archiv. 1997. V. 434. P. 841–847.
- Schreiber R., Pavenstadt H., Greger R. et al. Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator // FEBS Lett. 2000. V. 475. P. 291–295.
- Selman K., Wallace R.A., Sarka A., Qi X. Stages of oocyte development in zebrafish, *Brachidanio rerio* // J. Morph. 1993. V. 218. P. 203–224.

- Tingaud-Sequeira A., Chauvigne F., Fabra M. et al.* Structural and functional divergence of two fish aquaporin-1 water channels following teleost-specific gene duplication // *BMC Evol. Biol.* 2008. V. 8. P. 259–277.
- Tingaud-Sequeira A., Calusinska M., Finn R.N. et al.* The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals // *BMC Evol. Biol.* 2010. V. 10. P. 38–54.
- Virkki L.V., Franke C., Somieski P., Boron W.F.* Cloning and functional characterization of a novel aquaporin from *Xenopus laevis* oocytes // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 40610–40616.
- 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.
- Wallace R.A., Greeley M.S., Jr., McPherson R.* Analytical and experimental studies on the relationship between  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and water uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation *in vitro* // *J. Comp. Physiol. [B]*. 1992. V. 162. P. 241–248.
- Yueh W.S., Chang C.F.* Morphological changes and competence of maturing oocytes in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* // *Zool. Studies.* 2000. V. 39. P. 114–122.

## Role of Hydration in Ovulation of Common Frog Oocytes *in vitro*

M. N. Skoblina

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

**Abstract**—Stimulation of ovulation of the common frog *Rana temporaria* oocytes with homologous pituitary extract caused an increase in their volume. Factors that are known to inhibit hydration in teleostean oocytes (potassium-free Ringer solution and inhibitor of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase – ouabain), as well as use of aquaporin inhibitors (mercuric chloride and methylmethanethiosulphonate) inhibited also homologous pituitary extract-induced volume increase in follicle-enclosed oocytes and led to reduced percentage of ovulated oocytes. Volume of denuded oocytes remained unchanged in the course of maturation when exposed to progesterone or other treatments. The data obtained suggest that stimulation of oocyte ovulation in the common frog caused an increase in their hydration that is necessary for their ovulation but this did not occur in denuded cells.

**Keywords:** oocyte, follicle, maturation, ovulation, hydration, aquaporins, ouabain, mercuric chloride, methylmethanethiosulphonate, amphibians.