

Оценка физиологического состояния самок осетровых рыб в преднерестовый период по доле ооцитов, овулировавших *in vitro*

Канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики и селекции рыб **Д.А. Балашов**;

канд. с-х. наук, заведующий лабораторией криобиологии **К.В. Ковалев** – филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»);

Н.А. Козовкова – главный рыбовод Конаковского завода по осетроводству;

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории

генетики и селекции рыб **А.В. Рекубрятский** – филиал по пресноводному рыбному хозяйству ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)

@ balashoff@gmail.com; silur5@mail.ru; recobra@mail.ru



Ключевые слова: овариальные фолликулы, овуляция, ооциты, качество икры, преднерестовое содержание, полиненасыщенные жирные кислоты, сибирский осетр

Данные о полноте овуляции при инкубации изолированных овариальных фолликулов *in vitro* можно использовать для получения достоверной информации о ходе преднерестовой подготовки самок сибирского осетра и точного прогнозирования их репродуктивных свойств. Инъекция самкам препарата жирных кислот и витаминов улучшает рыбоводное качество их икры.



ASSESSMENT OF STURGEON FEMALES' PHYSIOLOGICAL STATE IN PRESPAWNING PERIOD ACCORDING TO OVULATION SUCCESS IN OOCYTES INCUBATED IN VITRO

Balashov D.A., PhD, Kovalev K.V., PhD, Recoubratsky A.V., PhD -

Branch on Freshwater Fisheries of Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography

Kozovkova N.A. - Konakov sturgeon fishery farm, balashoff@gmail.com; silur5@mail.ru; recobra@mail.ru

Ovulation success in isolated ovarian follicles of Siberian sturgeon during incubation in vitro can be used to estimate physiological state of females in prespawning period and to forecast their reproductive properties. A preparation consisting of polyunsaturated fatty acids and vitamins injected to Siberian sturgeon females improved quality of their eggs.

Keywords: ovarian follicles, ovulation, oocytes, egg quality, prespawning period, polyunsaturated fatty acids, Siberian sturgeon

Самки осетровых рыб в условиях рыбоводных хозяйств переходят в состояние зимовки с разной готовностью к нересту. Во время осенней бонитировки рыбоводы определяют степень их готовности на основании данных о величине индекса поляризации ооцита (ИПО). Это позволяет судить о физиологическом состоянии самок и приблизительно планировать график их использования в период проведения нерестовой кампании. Уже давно показано, что ИПО не может являться диагностическим критерием высокой точности [3]. Более точный прогноз дает метод, предложенный Б.Ф. Гончаровым, который основан на скорости созревания изолированных овариальных фолликулов *in vitro* под действием прогестерона или гонадотропных гормонов. Метод заключается в оцен-

ке скорости растворения зародышего пузырька: если по истечении 18 тау после индукции созревания, фолликулы некоторых самок не созрели, то такие самки не подходят для получения рыбоводной икры хорошего качества [1; 2]. Однако этот метод достаточно трудоемкий, поскольку требует точности, ловкости и быстроты в манипуляциях с фолликулами. В дальнейшем было показано, что после созревания фолликулы способны к овуляции – полной или частичной. Эта способность была предложена в качестве критерия физиологического состояния самок и степени готовности их к нересту [8; 9].

В настоящей работе проверяли, насколько точно по доле овулировавших ооцитов можно предсказать физиологическое состояние самок сибирского осетра,



Рисунок 1. Схема эксперимента
Figure 1. Experimental design

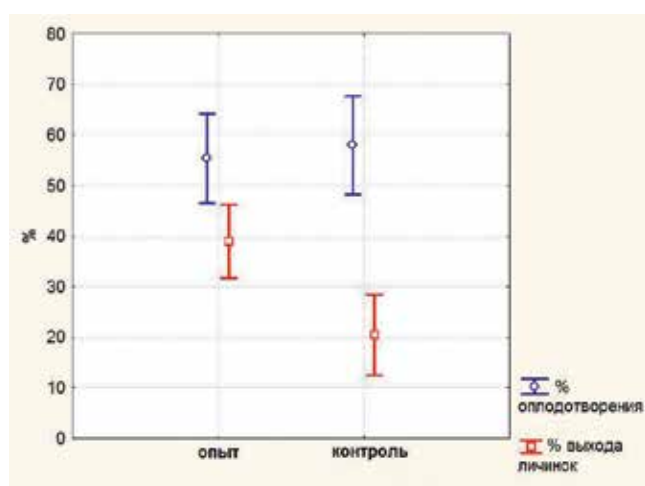


Рисунок 2. Влияние препарата жирных кислот на оплодотворение и выход личинок *in vivo*. Здесь и на других рисунках даны средние величины показателей и их дисперсии
Figure 2. The effect of the fatty acid preparation on fertilization and *in vivo* larval output. Here and in other figures, average values of indicators and their dispersion are given

их готовность к нересту и способность продуцировать икру высокого рыболовного качества. Для того, чтобы увеличить физиологическую разнородность исследованных самок и тем самым получить более точную оценку, часть самок в период зимовки получили инъекцию препарата полиненасыщенных жирных кислот, который, как предполагалось, способен влиять на физиологическое состояние фолликулов.

Материал и методика

Материалом служили впервые нерестующие девятилетние самки сибирского осетра (*Acipenser baerii*) из стада Конаковского завода по осетроводству. Средняя масса самок составляла 8-10 кг.

Схема эксперимента

Общая схема эксперимента представлена на рисунке 1.

В опыте использовано 20 самок. Во время зимовки всех самок содержали в одном бассейне при тем-

пературе около 10°C. 5 февраля самки были подвергнуты биопсии овариальных фолликулов (1 биопсия). Для изъятия фолликулов использовали специальные металлические щупы. После изъятия овариальные фолликулы инкубировали *in vitro*. Параллельно с первой биопсией 10 самкам сделали внутрибрюшинную инъекцию экспериментального препарата полиненасыщенных жирных кислот и витаминов. В 100 мл препарата содержалось: высокоочищенного рыбьего жира – 5 г, масла зародышей пшеницы – 5 г, соевого лецитина – 2 г, стерильной бидистиллированной воды до 100 мл. Препарат представлял собой однородную нерасщлаивающуюся эмульсию, достаточно текучую, чтобы без труда пройти по игле шприца. Доза препарата составила 1 мл/кг массы тела самки.

Далее всех самок содержали совместно в одинаковых условиях в бассейне с проточной речной водой при температуре зимовки. Через месяц, 5 марта, провели вторую биопсию, повторно изъяти овариальные фолликулы и проинкубировали их *in vitro*.

Во второй половине апреля, после перевода на нерестовые температуры, от всех самок получили икру и проинкубировали ее *in vivo*. Качество икры оценивали по проценту оплодотворения и выходу личинок.

Инкубация ооцитов *in vitro*

Овариальные фолликулы инкубировали по методике, разработанной Гончаровым [1; 2; 3; 8; 9] для осетровых рыб. Инкубацию фолликулов проводили при температуре 16°C в чашках Петри диаметром 60 мм в растворе Рингера, модифицированном для осетровых (РМО), в присутствии прогестерона. В каждую чашку, содержащую 10 мл РМО, помещали 33±3 фолликула и затем вносили 10 мкл спиртового раствора прогестерона для получения концентрации 333 нг/мл. Фолликулы каждой из самок инкубировали в пяти повторностях. Подсчет овулировавших ооцитов проводили через 38-40 τ_0 ¹ после внесения прогестерона. У сибирского осетра продолжительность 1 τ_0 при 16° составляет 59 мин. [6]. Учитывали количество овулировавших ооцитов в каждой чашке.

Получение икры *in vivo*

Икру получали в заводских условиях методом подрезания яйцеводов после двукратной инъекции гипофизарных препаратов. Инкубацию эмбрионов каждой из самок проводили индивидуально в чашках Петри диаметром 100 мм в трех повторностях, а также в заводских условиях в аппарате «Осетр». Процент оплодотворения определяли подсчетом развивающихся и погибших эмбрионов на стадии 17 (малая желточная пробка) [5].

Результаты и обсуждение

У сибирского осетра в условиях искусственного разведения качество икры варьирует от самки

¹ τ_0 – безразмерная величина, равная продолжительности одного митотического цикла в период синхронных делений дробления. Этой величиной описывают продолжительность эмбрионального развития различных организмов, она не зависит от температуры [4].

к самке и в значительной степени зависит от их физиологического состояния, от условий содержания в период летнего нагула, а также преднерестового выдерживания.

На рисунке 2 представлены средние показатели качества икры (% оплодотворения и выход личинок) в опытной (инъекция жирных кислот) и контрольной группах самок. Процент оплодотворения у опытных и контрольных самок достоверно не различался, однако выход личинок из икры опытных самок был в два раза выше, чем в контроле (40 и 20% соответственно).

Известно [7; 10; 11], что к созреванию и овуляции ооцитов у рыб и других позвоночных приводит каскад биохимических реакций, ключевым этапом которого является синтез различных простагландинов. Основным внутриклеточным предшественником простагландинов служат полиненасыщенные жирные кислоты и преимущественно арахидоновая кислота [10; 11]. Животные и растительные жиры богаты и другими незаменимыми жирными кислотами, а также витаминами, в особенности витамином Е, который также незаменим для нормального функционирования репродуктивной системы. Эти данные обусловили состав экспериментального препарата, включающего рыбий жир, богатый арахидоновой и другими полиненасыщенными жирными кислотами, а также масло зародышей пшеницы, богатое витамином Е.

Таким образом, с помощью инъекции препарата жирных кислот и витаминов в нашем исследовании были сформированы две группы самок, различающиеся своим физиологическим состоянием, которое нашло отражение в качестве икры. Как же эти различия проявились в показателях, по которым оценивают готовность самок к нересту, традиционному – ИПО и, определяемому по результатам инкубации изолированных фолликулов, проценту овуляции?

На рисунке 3 показаны изменения индекса поляризации ооцита (ИПО) в промежутке между двумя биопсиями после инъекции опытным самкам препарата жирных кислот. В течение месяца зародышевый пузырек в ооцитах всех самок значительно сместился к анимальному полюсу (рис. 3а), что обусловило снижение величины ИПО. Однако между опытными и контрольными самками различий не обнаружено (рис. 3б). Это согласуется с данными Гончарова, согласно которым по величине ИПО нельзя судить о качестве икры отдельно взятой самки [1; 2; 8].

Овуляция изолированных фолликулов – это процесс, который можно проследить визуально, используя только стереомикроскоп. Овуляция начинается непосредственно после созревания ооцита, в результате каскада биохимических процессов, индуцированных прогестероном. В процессе изучения созревания и овуляции фолликулов сибирского осетра мы обнаружили, что массовая овуляция начинается примерно через 8 тау после созревания или через 23-24

тау от внесения прогестерона. Визуально овуляцию можно определить по лопнувшей фолликулярной оболочке и освобождению из нее ооцита (рис. 4). Освобождаясь от оболочки, ооцит протискивается через разрыв, зачастую принимая форму гантели (рис. 4б). Опустевшая оболочка съезжается и образует колпачок, который либо остается слегка прикрепленным к ооциту, либо отделяется от него (рис. 4в, 4г). Фолликулярную оболочку пронизывают крове-

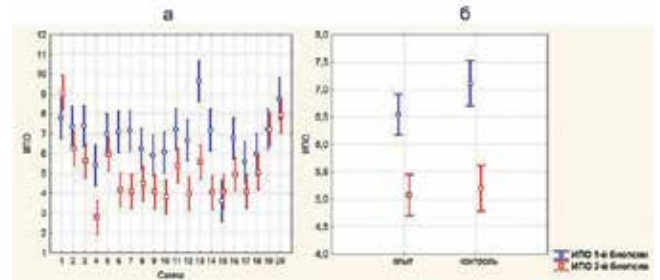


Рисунок 3. Изменение ИПО у самок в течение зимовки: а – индивидуальные значения, объединенная выборка; б – средние значения ИПО у опытных и контрольных самок
Figure 3. The change in fertility index in females during wintering: a - individual values, combined sample; b - average values of fertility index in experimental and control females

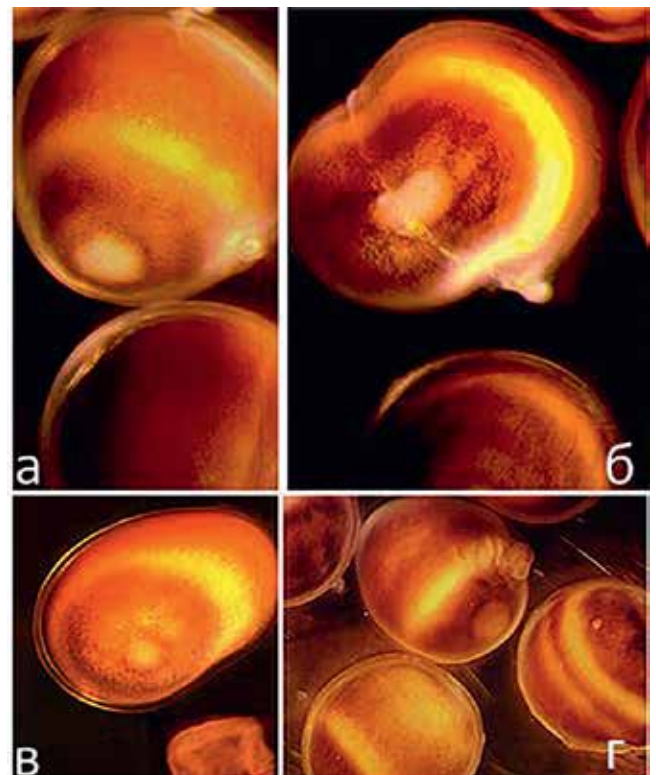


Рисунок 4. Овуляция фолликулов сибирского осетра: а – начало овуляции, разрыв фолликулярной оболочки; б – освобождение ооцита от оболочки; в – вышедший из оболочки ооцит и отделившийся колпачок оболочки; г – овулировавший ооцит с прикрепленным колпачком
Figure 4. Ovulation of follicles of Siberian sturgeon: a - the beginning of ovulation, the follicular membrane ruptured; b - release of the oocyte from the membrane; c - the oocyte emerging from the membrane and the detached cap of the shell; g - ovulated oocyte with attached cap

Таблица 1. Корреляционный анализ по различным парам признаков, полученных при инкубации *in vitro* и *in vivo* / **Table 1.** Correlation analysis for various pairs of traits obtained by incubation *in vitro* and *in vivo*

Пары вариантов	N	Коэф. кор. Спирмена	t(N-2)	p-level
% овуляции 1-й биопсии <i>in vitro</i> & Самка	100	0,233	2,3659	0,011
% овуляции 1-й биопсии & % оплодотворения <i>in vivo</i>	100	0,003	0,0148	0,988
% овуляции 1-й биопсии & % выхода личинок	100	0,188	1,8932	0,061
% овуляции 2-й биопсии опыта & Самка	100	-0,127	-1,270	0,207
% овуляции 2-й биопсии <i>in vitro</i> & % оплодотворения <i>in vivo</i>	100	0,324	3,385	0,001
% овуляции 2-й биопсии <i>in vitro</i> & % выхода личинок	100	0,408	4,423	0,000025

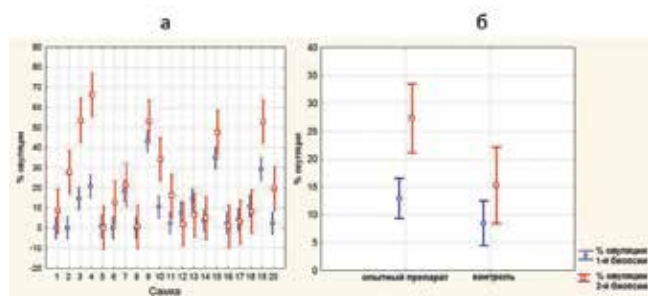


Рисунок 5. Доли овулировавших *in vitro* ооцитов: а – общая выборка; б – средние доли овулировавших ооцитов у опытных и контрольных самок / **Figure 5.** Fraction of ovulated oocytes in vitro: a - total sample; b - the average proportion of ovulated oocytes in experimental and control females

носные сосуды, их можно увидеть на неовулировавшем ооците (рис. 4а) или на отделившемся колпачке.

На рисунке 5 представлены результаты инкубации фолликулов *in vitro*. После первой биопсии фолликулы не всех самок отзывались на прогестерон овуляцией, однако те, которые отреагировали, также овулировали и после второй биопсии. При этом процент овулировавших ооцитов достоверно увеличился (рис. 5а). Процент овуляции *in vitro* у самок, подвергнутых инъекции экспериментального препарата, также оказался достоверно выше, чем у интактных (рис. 5б).

Полученные в ходе эксперимента показатели были использованы для корреляционного анализа по различным парам признаков (табл. 1). Из таблицы следует, что процент овуляции после второй биопсии имел достоверную и положительную связь с процентом оплодотворения и выходом личинок *in vivo*.

Таким образом, данные о полноте овуляции изолированных овариальных фолликулов можно использовать для получения достоверной информации о ходе преднерестовой подготовки самок и точного прогнозирования их репродуктивных свойств.

В настоящем исследовании было также показано, что однократная инъекция препарата жирных кислот и витаминов способна положительно влиять на овуляцию изолированных фолликулов, увеличивая долю овулировавших ооцитов по сравнению с контролем. Инъекция жирных кислот привела к повышению выживаемости эмбрионов. Очевидно, можно рекомендовать применение подобных инъекций самкам осетровых в предне-

рестовый период для улучшения их репродуктивных свойств.

| Выводы |

1. Индекс поляризации ооцита является критерием с низкой прогностической способностью.
2. Инъекция препарата жирных кислот и витаминов в преднерестовый период положительно влияет на долю овулировавших ооцитов.
3. Инъекция препарата жирных кислот положительно сказывается на выживаемости эмбрионов.
4. Данные о полноте овуляции изолированных овариальных фолликулов можно использовать для получения достоверной информации о ходе преднерестовой подготовки самок и точного прогнозирования их репродуктивных свойств.

| ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ |

1. 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.
2. Гончаров, Б.Ф. Использование модельной системы гормональной стимуляции *in vitro* созревания и овуляции ооцитов осетровых рыб для решения ряда фундаментальных и прикладных проблем // Онтогенез. 2003. Т. 34 (2). С. 102-111.
3. Гончаров Б.Ф. Исследование продолжительности созревания ооцитов осетровых рыб как критерий для отбора производителей // Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.И. Развитие осетровых рыб (Созревание, оплодотворение, развитие зародышей и предличинок). М.: Наука, 1981. Приложение. С. 189-190.
4. Детлаф, Т.А., Детлаф, А.А. О безразмерных характеристиках продолжительности развития в эмбриологии // Докл. АН СССР. 1960. Т. 134 (1). С. 199-202.
5. Детлаф, Т.А. Развитие осетровых рыб / Т.А. Детлаф, А.С. Гинзбург, О.И. Шмальгаузен. М.: Наука, 1981. 224 с.
6. Gisbert, E., Williot, P. Duration of synchronous egg cleavage cycles at different temperatures in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) // Journal of Applied Ichthyology. 2002. Vol. 18 (4-6). P. 271-274.
7. Goetz, F.W., Garczynski, M. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish // Fish Physiology and Biochemistry. 1997. Vol. 17 (1-6). P. 33-38.
8. Goncharov, B.F. In vitro approach to studying the mechanisms of oocyte maturation in sturgeons: a review of fundamental and applied aspects // Journal of Applied Ichthyology. 2002. Vol. 18 (4-6). P. 368-374.
9. Goncharov, B.F., Skobolina, M.N., Trubnikova, O.B., Vassetzky, S.G., Hormonal Induction of Ovulation in vitro in Sturgeon Fishes, in Biology, Conservation and Development of Sturgeon, Carmona, R., et al., Eds., Springer, 2009, pp. 175-185.
10. Patiño, 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 // Biology of reproduction. 2003. Vol. 68 (2). P. 516-523.
11. Lister, A. L., Van Der Kraak, G. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation // General and comparative endocrinology. 2008. Vol. 159 (1). P. 46-57.