

© А.Б. БУРЛАКОВ

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (г. Москва)
burlakova@mail.ru

УДК 597.08:591.1.6

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ В ГОНАДОТРОПОЦИТАХ
ГИПОФИЗА ОВУЛЯТОРНОЙ ВОЛНЫ ГОНАДОТРОПИНА
ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ВОСПРОИЗВОДСТВЕ РЫБ
С ВЫСОКОЙ ПЛОДОВИТОСТЬЮ**

**FEATURES OF FORMATION OF THE HYPOPHYSIS
OF THE OVULATORY WAVE IN GONADOTROPIN
IN GONADOTROPOCYTES DURING ARTIFICIAL REPRODUCTION
OF FISH WITH HIGH FECUNDITY**

Исследования состояния центральных и периферических гонадотропоцитов гипофиза самок толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.) на световом и электронно-микроскопическом уровнях после стимуляции созревания хорионическим гонадотропином показали, что в обоих типах клеток уменьшается количество секреторного материала. У рыб, дающих икру высокого рыбоводного качества (80-95% оплодотворения), значительно уменьшаются площади гонадотропных клеток (ГТК) и их ядер, значительно снижается их загруженность секреторным содержимым. Происходит интенсивное выведение как секреторных гранул, так и содержимого цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. У рыб, продуцирующих икру низкого рыбоводного качества (5-10% оплодотворения), массовой секреции эндогенного гонадотропного гормона (ГТГ) из клеток не происходит. У таких самок секреции ГТГ из ГТК по типу голокринии не наблюдается. Формирование гипофизом овуляторной волны гонадотропина у самок с разной плодовитостью происходит неодинаково за счет изменения соотношения процессов меро- и голокринии.

Investigations on the state of the central and peripheral gonadotropocytes of the hypophysis of silver carp's females *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.) at the light and electronic-microscopic levels, following the stimulation of maturation with the chorionic gonadotropin, showed that the amount of secretory material diminishes in both types of cells. The area of gonadotropic cells (GTC) and their nuclei, as well as their workload secretory content, was significantly reduced for the fish with spawn eggs of high fishing quality (80-95% fertilization). There is an intensive decrease of both secretory granules and content of cisterns of the granular endoplasmic reticulum. By contrast, mass secretion of endogenous gonadotropic hormone (GTG) from the cells does not occur in the case of fish producing eggs of low fish quality (5-10% fertilization). As for females of the latter type GTG secretion from the GTC-type holocrine is not observed. By the hypophysis the formation of the ovulatory wave of gonadotropin for females with different fecundity takes place differently due to the change of correlation of mero- and holocrine secretion processes.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Рыбы, *Hypophthalmichthys molitrix*, искусственное воспроизводство, гипофиз, гонадотропоциты, гонадотропные гормоны, плодовитость.

KEY WORDS. Fishes, *Hypophthalmichthys molitrix*, artificial reproduction, hypophysis, gonadotropocytes, gonadotropins, fecundity.

Многообразие в способах размножения у рыб (существуют все переходы от икротетания до сложных форм вынашивания и живорождения), в строении органов репродуктивной системы и особенностях ее регуляции значительно шире, чем у всех других групп позвоночных животных. Разнообразные условия обитания обусловили появление в эволюции рыб ряда физиологических приспособлений (в том числе и в гормональной регуляции репродуктивной системы), позволяющих успешно адаптироваться к изменениям среды. Именно чрезвычайная пластичность такой регуляторной системы дает функциональную основу для закрепления в эволюции у отдельных систематических групп различных форм гермафродитизма, открывает возможность плавных переходов от единовременного икротетания к порционному и обратно, создает условия для регуляции численности потомства и соотношения в нем самцов и самок. Гормональная регуляция подготовки созревания рыб при искусственном их воспроизводстве является актуальным и пока еще слабо изученным аспектом репродуктивной физиологии [1-4]. Показано, что при использовании различных гормональных препаратов, начиная от гипофизарных гонадотропных гормонов (ГТГ) до различных половых стероидных гормонов и кортикостероидов и их синтетических аналогов, собственная эндокринная система принимает определенное участие в регуляции заключительных этапов созревания и овуляции ооцитов [4-7]. При этом во всех случаях наблюдается и определенное вовлечение собственных ГТГ реципиента в процесс формирования овуляторной волны ГТГ. Чем больше возраст, размеры особей, тем выше становится и их плодовитость. Хорошей моделью для таких исследований является ценный объект аквакультуры — толстолобик *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.), плодовитость которого в разных возрастных группах варьирует от 30000 до 2000000 ооцитов.

Целью настоящей работы являлось выяснение особенностей формирования гипофизарными гонадотропоцитами (ГТЦ) овуляторной волны ГТГ у самок разных возрастных групп толстолобика, обладающих разной плодовитостью.

Материалы и методы. Работу проводили на базе экспериментально-показательного производственного объединения рыбной промышленности «Балыкчи» (Узбекистан) и малого инновационного предприятия «Акванатор» Астраханской области. Гормональную стимуляцию созревания самок толстолобика проводили с использованием инъекций хорионического гонадотропина по ранее описанной методике [8]. После получения икры рыб подвергали полному биологическому анализу. Выделенный гипофиз разделяли сагиттально на две симметричные половины, одну из которых фиксировали для изучения на светооптическом уровне, другую - для электронномикроскопических исследований. Материал для светооптического исследования фиксировали в жидкости Буэна и после обезвоживания через бутанол заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали реактивом Шиффа (PAS-реакция), паральдегид-фуксином по Гомори-Габу с докраской азановым методом. Для выявления локализации в аденогипофизе гонадотропоцитов использовали иммунофлюоресцентный непрямой метод Кунса по ранее описанной методике [9]. В мезоаденогипофизе на 6-9 срезах, удаленных друг от друга на расстояние в 20 мкм, подсчитывали число

нормальных и подвергшихся голокринии гонадотропоцитов. Материал для электронномикроскопического исследования фиксировали 2,5%-ным раствором глютарового альдегида на 0,02 М фосфатном буфере (рН 7,2-7,4) в течение 4 часов с последующей дофиксацией 1%-ным раствором четырехоксида осмия на том же буфере при температуре +4°С в течение 4-6 часов, затем обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и по стандартной методике заливали в эпон. ГТЦ выявляли на полутонких срезах (толщина 2 мкм) по гистохимической реакции с реактивом Шиффа на светооптическом уровне. На выявленные в центральной и периферической зонах мезоаденогипофиза ГТЦ прицельно заготавливали пирамидки и изготавливали срезы на ультрапирамиде фирмы ЛКВ. Срезы контрастировали 2%-ным раствором уранилацетата и окрашивали по Рейнольдсу, просматривали и фотографировали на трансмиссионном электронном микроскопе «JEM — 100В» фирмы «JEOL». Все результаты обработаны статистически, достоверность различий исследуемых параметров определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования состояния ГТЦ самок на световом и электронно-микроскопическом уровнях после стимуляции созревания показали, что как в центральных, так и периферических ГТЦ уменьшается количество секреторного материала как за счет мерокриновой, так и голокриновой секреции (рис. 1).

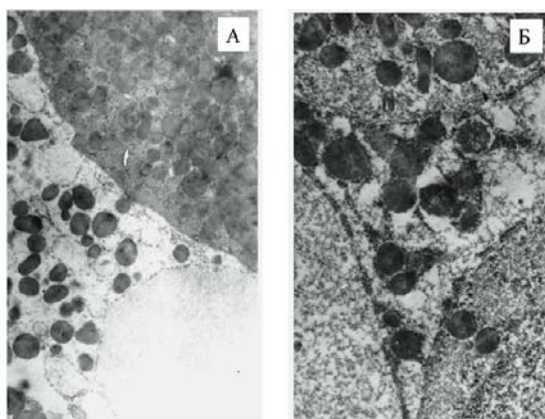


Рис. 1. Выведение секреторного материала из ГТЦ мезоаденогипофиза самок толстолобика после гормональной стимуляции созревания по: А — голокриновому типу, $\times 15000$; Б — по мерокриновому типу, $\times 20000$

Степень этих изменений, соотношение процессов меро- и голокринии находится в прямой зависимости от возраста и плодовитости самок, а также от качества получаемой икры. У рыб, дающих икру высокого рыболовного качества (80-95% оплодотворения), значительно уменьшаются площади ГТЦ и их ядер (табл.), значительно снижается их загруженность секреторным содержимым, причем у самок разных возрастных групп такие изменения достоверны ($p \leq 0,01$). В центральных ГТЦ уменьшается количество мелких гранул; они часто сливаются между собой, образуя гантелеобразные структуры и большие, неправильной формы электронноплотные глобулы, занимающие значительную часть площади клеток. В цистернах гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР) обнаруживаются опустошенные участки с электроннопрозрачным ма-

триксом, которые можно интерпретировать как выведение секреторного материала (рис. 2). В периферических ГТЦ изменениям подвергаются преимущественно цистерны ГЭР. Степень опустошения их гораздо большая, чем в центральных ГТЦ. Число мелких гранул изменяется незначительно, а крупных глобул — заметно уменьшается за счет выведения секреторного материала.

Таблица

Изменение площади ГТЦ и объема их ядер у самок толстолобика после гормональной стимуляции созревания с помощью хорионического гонадотропина

Плодовитость самок (тыс. икринок)		IV стадия зрелости гонад		V стадия зрелости гонад	
		Центральные	Периферические	Центральные	Периферические
40 — 60	S	127,3 ± 1,26	98,4 ± 1,12	87,6 ± 1,32	61,2 ± 1,45
	V	7,2 ± 0,11	6,8 ± 0,12	6,9 ± 0,11	5,2 ± 0,12
300 — 600	S	195,8 ± 2,34	163,4 ± 2,11	123,6 ± 1,54	92,7 ± 1,56
	V	22,6 ± 0,34	17,3 ± 0,18	12,3 ± 0,16	10,3 ± 0,14
1 000 — 1 800	S	360,8 ± 3,52	286,8 ± 3,27	272,6 ± 3,61	184,8 ± 2,85
	V	32,3 ± 0,45	26,3 ± 0,21	18,7 ± 0,31	15,3 ± 0,35

Примечание: S — площадь клеток (мкм²), V — объем ядер (мкм³).

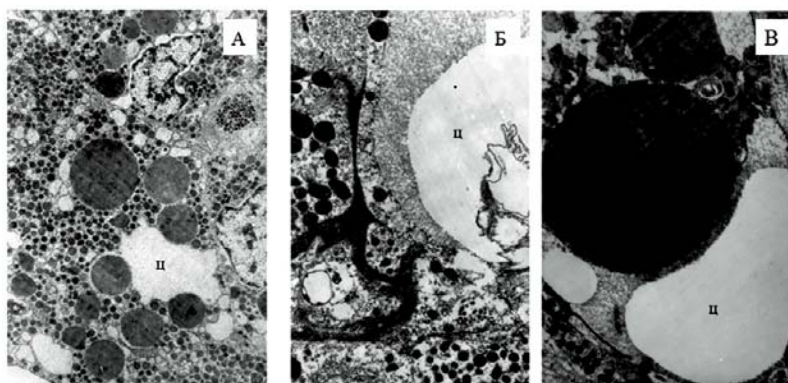


Рис. 2. Изменения в цистернах гранулярного эндоплазматического ретикулума (ц) после гормональной стимуляции созревания самок толстолобика: А — состояние ГТЦ до начала гормональной стимуляции, ×8000; Б — разрезание цистерн в центральных ГТЦ, ×20000; В — разрезание цистерн в периферических ГТЦ и слияние мелких гранул в более крупные, ×20000.

У рыб, продуцирующих икру низкого рыбоводного качества (5-10% оплодотворения), изменений в морфофункциональном состоянии ГТЦ, по сравнению с интактными самками, не так много, т.е. массовой секреции эндогенного ГТГ из клеток в этом случае не происходит. У таких самок секреции ГТГ из ГТЦ по типу голокринии не наблюдается. Интенсивное выведение ГТГ из гипофиза реципиента после введения экзогенных ГТГ подтверждается снижением общей гонадотропной активности гипофизов на 17-25% ($p \leq 0,01$) и изменением соот-

ношения отдельных гонадотропных фракций [4-6], изменением фракционного состава пептидов в гипофизе [6]. При подготовке к овуляции и переходе на V стадию зрелости гонад в ГТЦ гипофиза самок наблюдается интенсивное выведение как секреторных гранул, так и содержимого цистерн ГЭР, т.е. формирование овуляторной волны ГТГ происходит обязательно с вовлечением в этот процесс собственного гипофиза (ГТЦ) реципиента.

Формирование в ГТЦ гипофиза овуляторной волны ГТГ у самок с разной плодовитостью происходит неодинаково за счет, в первую очередь, изменения соотношения процессов меро- и голокринии. У впервые созревающих самок толстолобика с плодовитостью менее 50000 ооцитов формирование овуляторной волны ГТГ гонадотропоцитами осуществляется только за счет мерокринии (голокриния отсутствует). У повторно созревающих самок при плодовитости 100000-500000 ооцитов появляется голокриния в центральных ГТЦ (4-8% от общего их числа), в то время как в периферических она отсутствует. У 6-9-летних самок при плодовитости от 1000000 до 1800000 икринок при формировании овуляторной волны ГТГ голокринии подвергаются 9-17% центральных и 2-4% периферических ГТЦ. При этом, как было показано ранее [4], [8], [10], уровень ГТГ в крови в момент овуляции пропорционально возрастает при увеличении возраста самок и их плодовитости. Процесс мерокринии в ГТЦ у рыб с высокой плодовитостью характеризуется появлением на заключительных стадиях вителлогенеза гигантских удлинённых глобул, накапливающих громадное количество ГТГ (рис. 3А). Такая глобула образуется за счет слияния более мелких гранул (рис. 3Б). Во время созревания ооцитов гигантская глобула натягивает клеточную оболочку тонким концом (рис. 3В), прорывает ее и быстро выводит свое содержимое в межклеточное пространство (рис. 3Г). Это приводит к очень быстрому поступлению большого количества ГТГ в кровь, позволяет формировать мощную овуляторную волну.

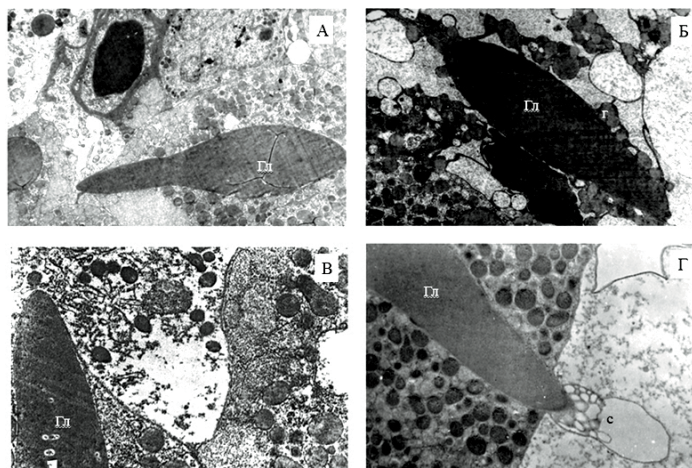


Рис. 3. Особый тип мерокринии в гонадотропоцитах мезоаденогипофиза.

А — гигантская электронноплотная глобула (Гл) в центральном ГТЦ, $\times 8000$;

Б — формирование растущей глобулы за счет поглощения мелких секреторных гранул (г), $\times 15000$; В — глобула тонким концом натягивает оболочку ГТЦ, $\times 20000$;

Г — тонкий конец глобулы прорывает оболочку ГТЦ и выделяет свое содержимое (с) в межклеточное пространство, $\times 20000$.

Такой щадящий механизм секреции, обеспечивающий в короткое время прохождение по крови к гонадам мощной овуляторной волны ГТГ, с одной стороны, приводит к овуляции огромного количества ооцитов в очень короткий временной промежуток, а с другой — позволяет сохранить целостность и жизнеспособность самих ГТЦ мезоаденогипофиза, что, по-видимому, дает возможность осуществлять гормональную регуляцию гаметогенеза у видов с высокой плодовитостью без пропусков последующих сезонов размножения, что, например, характерно для осетровых рыб, у которых формирование овуляторной волны гонадотропина происходит в основном за счет массовой голокринии ГТЦ [11]. Кроме этого, у осетровых, в отличие от карповых рыб, при размножении голокринии подвергается и ряд тиреотропцитов (клетки, вырабатывающие тиреотропный гормон) в гипофизе [11], что, несомненно, сопровождается более продолжительным периодом восстановления нормального функционирования эндокринной железы у этих видов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavi-Sivan, B. Regulation of fish gonadotropins // *Int. Rev. Cytol.* 2003. V. 225. Pp. 131-185.
2. Honji, R.M., Nybrega, R.H., Pandolfi, M., Shimizu, A., Borella, M., Moreira, R.G. Immunohistochemical study of pituitary cells in wild and captive *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) females during the annual reproductive cycle // *Springerplus.* 2013 Sep. 13. № 2. P. 460.
3. Andersson, E., Schulz, R.W., Male, R., Bogerd, J., Patuca, D., Benedet, S., Norberg, B., Taranger, G.L. Pituitary gonadotropin and ovarian gonadotropin receptor transcript levels: seasonal and photoperiod-induced changes in the reproductive physiology of female Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013. Sep 15. V. 191. Pp. 247-258.
4. Бурлаков А.Б. Гормональная регуляция репродуктивной функции у икромечущих рыб: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. М.: МГУ, 2002. 50 с.
5. Бурлаков А.Б. Роль гипофиза реципиента в формировании качества половых продуктов при искусственном воспроизводстве карпообразных рыб // *Современные проблемы экологической физиологии и биохимии рыб.* Вильнюс, 1988. С. 91-113.
6. Бурлаков А.Б., Белова Н.В., Годович П.Л., Цибезов В.В. Роль эндокринной системы в формировании качества икры белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* при искусственном воспроизводстве // *Вопросы ихтиологии.* 1991. Т. 31. Вып. 5. С. 839-850.
7. Бурлаков А.Б. Роль эндокринной системы реципиента при экзогенной гормональной стимуляции созревания карповых рыб // *Наука и образование: проблемы и перспективы развития.* Сб. науч. тр. междунар. науч.-практич. конф. 30 авг. 2014. Ч. 2. Тамбов, 2014. С. 28-29.
8. Бурлаков А.Б., Белова Н.В., Емельянова Н.Г. Активность гонадотропина в сыворотке крови и качество икры при искусственном воспроизводстве толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* // *Вопросы ихтиологии.* 1987. Т. 27. Вып. 6. С. 962-970.
9. Добрынина М.Т., Бурлаков А.Б. Иммуногистохимическое исследование гликопротеидных клеток в гипофизе белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.) // *Биологические науки.* 1989. № 10. С. 3-8.
10. Бурлаков А.Б. Активность гонадотропинов в гипофизе и сыворотке крови самок толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.) (Cyprinidae) на разных этапах репродуктивного цикла // *Вопросы ихтиологии.* 1985. Т. 25. Вып. 3. С. 494-504.
11. Баранникова И.А. Гормональная регуляция размножения у осетровых // *Труды ВНИРО.* 1978. Т. СXXX. Ч. 2. С. 6-16.

REFERENCES

1. Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavi-Sivan, B. Regulation of fish gonadotropins. *International Review of Cytology*. 2003. Vol. 225. Pp. 131-185.
2. Honji, R.M., Nybrega, R.H., Pandolfi, M., Shimizu, A., Borella, M., Moreira, R.G. Immunohistochemical study of pituitary cells in wild and captive *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) females during the annual reproductive cycle. *Springerplus*. 2013. Sep. 13. № 2. P. 460.
3. Andersson, E., Schulz, R.W., Male, R., Bogerd, J., Patuca, D., Benedet, S., Norberg, B., Taranger, G.L. Pituitary gonadotropin and ovarian gonadotropin receptor transcript levels: seasonal and photoperiod-induced changes in the reproductive physiology of female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *General and Comparative Endocrinology*. 2013. Sep 15. Vol. 191. Pp. 247-258.
4. Burlakov, A.B. *Gormonal'naiia reguliatsiia reproduktivnoi funktsii u ikromechushchikh ryb* (Avtoref. dokt. diss.) [Hormonal regulation of reproductive function in egg-laying fish (Extended Abstract of Dr. Sci. Diss.)]. Moscow, 2002. 50 p. (in Russian).
5. Burlakov, A.B. The role of the pituitary gland of recipient in the formation of quality of sexual products during the artificial reproduction of Cypriniformes / In: *Sovremennye problemy ekologicheskoi fiziologii i biokhimii ryb* [Modern problems of ecological physiology and biochemistry of fishes], Vilnius, 1988. Pp. 91-113. (in Russian).
6. Burlakov, A.B., Belova, N.V., Godovich, P.L., Tsibezov, V.V. The role of the endocrine system in forming the quality of fish eggs of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* in the artificial reproduction. *Voprosi ikhtiologii — Problems of Ichthyology*. 1991. Vol. 31. № 5. Pp. 839-850. (in Russian).
7. Burlakov, A.B. The role of endocrine system of the recipient in the maturation of carp fish during exogenous hormonal stimulation / In: *Nauka i obrazovanie: problemy i perspektivy razvitiia. Proceeding of the International scientific and practical conference, 30 August 2014. Ch. 2. Tambov, 2014. Pp. 28-29.* (in Russian).
8. Burlakov, A.B., Belova, N.V., Emel'ianova, N.G. Activity of gonadotropin in blood serum and the quality of eggs during artificial reproduction of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Voprosi ikhtiologii — Problems of Ichthyology*. 1987. Vol. 27. № 6. Pp. 962-970. (in Russian).
9. Dobrynina, M.T., Burlakov, A.B. Immunohistochemical study of glycoprotein cells in the pituitary gland of the white silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.). *Biologicheskie Nauki — Biological Sciences*. 1989. № 10. Pp. 3-8. (in Russian).
10. Burlakov, A.B. Activity of gonadotropins in the pituitary gland and the serum of female silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.) (Cyprinidae) during different stages of the reproductive cycle. *Voprosi ikhtiologii — Problems of Ichthyology*. 1985. Vol. 25. № 3. Pp. 494-504. (in Russian).
11. Barannikova, I.A. Hormonal regulation of reproduction of sturgeon / In: *Proceedings of VNIRO*. 1978. Vol. CXXX. Ch. 2. Pp. 6-16. (in Russian).

Автор публикации

Бурлаков Александр Борисович — ведущий научный сотрудник кафедры ихтиологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, доктор биологических наук, профессор

Author of the publication

Alexander B. Burlakov — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher, Ichthyology Department, Lomonosov Moscow State University