

СФЕРА ВЛИЯНИЯ ГОНАДОТРОПНОГО ГОРМОНА ГИПОФИЗА И НЕКОТОРЫЕ СВЯЗАННЫЕ С ЭТИМ СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЕТАЛИ ПРИМЕНЕНИЯ ГИПОФИЗАРНЫХ ИНЪЕКЦИЙ В РЫБОВОДСТВЕ

Н. Л. Гербильский

(Ленинградский Университет)

Мне приходится начинать это сообщение с примечания, потому что с недавних пор в литературе фигурирует не один, а два гонадотропных гормона гипофиза у рыб. Б. М. Казанскому в нашей лаборатории (Ленинградский Университет) на примере колюшки (*Gasterosteus aculeatus* L.) удалось установить существование второго гонадотропного гормона, выясненная функция которого заключается в ускорении вителлогенеза, то есть в ускорении трофоплазматического роста овоцитов. Локализация выработки этого гормона в гипофизе и его химическая характеристика, как показал Казанский, также отличает его от ранее изученного гонадотропного гормона. Второй гормон вырабатывается в переходной зоне гипофиза и разрушается или растворяется при обработке ацетоном. По-видимому он в противоположность первому гормону не является чисто белковой субстанцией. В настоящем сообщении речь идет только о первом гонадотропном гормоне, функции которого более изучены.

Рассматривая самые общие биологические обоснования метода гипофизарных инъекций в рыбоводстве, мы должны снова обратиться к экологии размножения рыб и к некоторым особенностям их гомеогенеза и полового цикла. Однако, постараемся быть возможно более краткими в этой части сообщения. Мы легко припомним насколько крупное приспособительное значение имеет способность рыб пребывать более или менее длительное время будучи подготовленными к переходу в перестное состояние. И знаем, что эта способность основывается на стадийном характере гомеогенеза и всего полового цикла в организме рыбы. Вспомним, что, например, овогенез не является процессом, плавно протекающим во времени—ведь фазы характеризующиеся ускоренным развитием, например, фаза ядерных изменений, предшествующих протоплазматическому росту или фаза трофоплазматического роста, сменяются состояниями относительного покоя, например, фаза заверченного протоплазматического роста, предшествующая краевой вакуолизации, и фаза, завершенная трофоплазматического роста, предшествующая предовуляционным изменениям овоцита. Выходом овоцитов старшей генерации из состояния относительного покоя и их переход к предовуляционным изменениям, протекающим в норме весьма быстро, характеризуется переходом от так называемой 4-ой к 5-ой стадии зрелости, переход всего организма рыбы в перестное состояние. В природе этот переход осуществляется, как это ясно каждому из нас, при наличии комплекса условий, строго соответствующего сложившимся в процессе эволюции требованиям

данного вида. Применяя гипофизарные инъекции с расчетом на использование гонадотропного гормона этого органа, мы имеем возможность получить вполне нормальный результат—зрелые половые клетки самок и самцов в экспериментальных условиях, при отсутствии тех специфических раздражителей, которые вызывают переход организма в нерестное состояние в естественных условиях и воспринимаются экстрорецепторами, при этом мы должны, однако, соблюдать наличие и в опыте, так же как и в естественных условиях, тех элементов среды, от которых в первую очередь зависит интенсивность обмена веществ (нерестные температуры данного вида и оптимальные концентрации кислорода). Остальные элементы комплекса природных условий—такие, как наличие обычно требуемого субстрата, ход против течения реки, наличие представителя другого пола, освещение и время суток, фотопериодизм,—обычно, при помощи гипофизарных инъекций, удается исключить. Так у анадромных рыб, например, у осетровых и у других костистых полупроходных рыб, удается получить желаемые результаты после полного исключения речного периода нерестной миграции.

Итак, именно в этом выведении воспроизводительной системы из состояния относительного покоя, а у всего организма рыбы в целом из состояния “выжидания комплекса благоприятных условий”, заключается самое общее биологическое обоснование метода гипофизарных инъекций в рыбоводстве. Ожидать нужной нам полноценной реакции от рыб, находящихся в иных состояниях, не следует; в этом заключается, к сожалению, обычная ошибка многих не понимающих сущности объекта и поэтому быстро разочаровывающихся экспериментаторов. Поэтому наша задача сегодня состоит прежде всего в достаточно полной характеристике момента гомеогенеза и состояния гонад, при которых мы вправе ожидать отличных результатов. Вторая наша задача заключается в том, чтобы представить себе, в каком состоянии гипофиз содержит максимальное количество интересующего нас гонадотропного гормона. Наша третья задача заключается в том, чтобы возможно яснее и по возможности “с часами в руках” представить себе то изменения, которые происходят в половых клетках и половых железах под влиянием гипофизарных инъекций. В заключение мы должны будем рассмотреть некоторые детали метода гипофизарных инъекций, связанные с характером действия гонадотропного гормона к природе и в условиях эксперимента.

I. Гистологическая и цитологическая характеристика половых желез и половых клеток в завершённой четвертой стадии зрелости.

Независимо от того, имеем ли мы дело с рыбой, характеризующейся порционным или единовременным икрометанием, основным показателем, позволяющим судить о завершении четвертой стадии зрелости, является состояние овоцитов старшей генерации. А для семенника завершенность процесса сперматогенеза во всех ампулах семенника. При дальнейшем изложении я основываюсь, главным образом, на исследованиях специально предпринятых в нашей лаборатории в связи с определением границ или как мы говорим сферы гонадотропного влияния гипофиза (работы Б. М. Казанского, Т. И. Фалеевой и Персова на осетровых и работы О. Ф. Сакун и Т. И. Фалеевой на костистых).

Наиболее просто решается этот вопрос относительно самцов, в которой завершенная четвертая стадия зрелости семенников характеризуется тем, что во всех

ампулах и канальцах этого органа абсолютно преобладают зрелые вполне сформировавшиеся спермии, которые могут находиться в главной своей массе вне цист и характеризоваться “вихревым” расположением, либо находиться еще в пределах тончайших стенок цист, образованных фолликулярными клетками. Понятно, что кроме зрелых спермиев в таких семенниках завершенной четвертой стадии зрелости, мы вблизи стенок ампул или в составе клеток, образующих эти стенки, находим покоящиеся сперматогонии, которые дадут начало новой волне сперматогонеза. Наличие в семенниках отстающих фаз, практическому результату гипофизарных инъекции обычно не мешает.

Сложнее обстоит вопрос с диагностикой сферы влияния гонадотропного влияния гипофиза и завершенной четвертой стадии зрелости у самок. Не случайно ведь некоторым авторам приходится подразделять эту стадию яичника на более дробные классификационные единицы, именуемые обычно 4-а, 4-б, 4-в и т. д. Это означает, что в течение пребывания органа в 4-ой стадии зрелости, овоциты старшей генерации и реживают характерные изменения. Таким образом, нас интересует вопрос, в чем заключаются основные черты этих изменений, и начиная от какого элемента мы вправе ожидать получения безупречных результатов в результате гипофизарных инъекций.

Самой характерной, характеризующей изменение овоцитов старшей генерации, овоцитов в органе, пребывающем в четвертой стадии зрелости, является поляризация, возможная только после полного завершения процесса вителлогенеза. Поляризация овоцита осуществляется путем продвижения ядра вместе с участком, свободной от желтка, или почти вполне свободной от желтка, цитоплазмы по направлению к микропиле у костистых или по направлению к группе микропилярных отверстий у осетровых. Так, согласно точному наблюдению О. Ф. Сакун пад процессом созревания яйцеклетки у сырты (*Vimba vimba* L.) в яйцеклетках этой рыбы, прошедших период протоплазматического роста, анимальный полюс не выражен. Будущее же местоположение анимального полюса у них определяется микропилем, “к которому при созревании перемещается ядро”. Таким образом, эксцентричное положение ядра свидетельствует о том, что яйцеклетка уже вступила в период созревания. Полностью сместившееся ядро располагается непосредственно под микропиле в протоплазматическом диске анимального полюса, образование которого непосредственно связано с движением ядра.

Механизм процесса продвижения ядра к будущему анимальному полюсу может быть различные в зависимости от наличия или отсутствия в яйцеклетках данной рыбы жировой капли, но, очевидно, скорость этого продвижения, и вообще всего процесса поляризации клетки у рыб весьма велика и измеряется, по всей вероятности, даже не часами, а десятками минут или происходит еще быстрее. Так например, Т. И. Фалеева установила, что поляризация овоцитов у макропода тесно связана с процессом слияния мелких, распределенных по всей плазме жировых вакуол в одимую, центрально расположенную жировую каплю и что этот процесс происходит в период переворачивания самки под гнездом.

Обращаясь к нашему длительному опыту работы с осетровыми, мы можем сказать, что центральное положение ядра до настоящего времени совпадало в наших опытах с отрицательным результатом гипофизарных инъекций, что поляриная

дифференцировка овоцита являлась обязательным критерием для начала работ по применению гипофизарных инъекций для получения зрелой икры осетровых.

Вторым важным критерием, имеющим равное отношение, как к осетровым, так и к костистым, является состояние ядрышкового аппарата в ядре овоцита, находящимся в предовуляционном состоянии.

Мы все хорошо помним, что в течение всего периода малого или протоплазматического и периода большого или трофоплазматического роста, ядра овоцитов рыб характеризуются весьма большим количеством ядрышек, тесно прилегающих, как бы прикрепленных к оболочке ядра. Перемещение ядрышек по направлению к центру ядра и их растворение в кариолимфе является весьма важными и характерными для всех изученных в этом отношении рыб симитомом к переходу ядра из состояния зародышевого пузырька в состояние мейотическое, а для рассматриваемого метода гипофизарных инъекций весьма четким симитомом, позволяющим видеть наилучшие результаты. Как будет видно из дальнейшего, прямые эксперименты с большой точностью показали, что, начиная от перемещения ядрышек и до осуществления овуляции, весь этот завершающий период развития овоцитов в пределах яичника протекает под воздействием гонадотропного гормона гипофиза. Однако, прежде всего, несколько слов о том, что же именно происходит с ядром овоцита у костистых и у осетровых в этот ответственный период.

2. Изменения, происходящие в овоцитах рыб перед овуляцией и при овуляции под влиянием гонадотропного гормона гипофиза.

Как было упомянуто, основным процессом в этот период является переход ядра из состояния зародышевого пузырька в состояние метафазы первого мейотического деления, не вполне удачно обозначаемого многими авторами термином "растворение ядра". Так например, Сакци для сырти описывает этот процесс следующими словами. "В центре такого переместившегося ядра, незадолго до его растворения, сначала можно обнаружить клубок, состоящий из зернистых нитей, а позднее группа хромосом в виде изогнутых палочек. После растворения ядра хромосомы выявляются вблизи микропиле. Затем они располагаются в пластинку, лежащую параллельно к поверхности яйцеклетки... Веретинно первого деления созревания обычно лежит около самого микропиле, касаясь одним из своих полюсов радиальной оболочки... Овуляция у сырти может осуществляться как на ранней, так и поздней анафазе второго деления созревания. "А вот как быстро происходит переход ядра в мейотическое состояние овоцитах столь обычного для Китая объекта, каковым является макропод, излюбленный объект для подобных исследований нашей лаборатории. "У самки, взятой после нескольких переворачиваний, ядро в овоцитах старшей генерации уже перешло в состояние, характерное для мейозиса. В овоцитах обнаруживаются картины деления созревания. (Фалеева, 1958).

Для дальнейшего усовершенствования метода гипофизарных инъекций весьма важно представить себе процессы, происходящие под воздействием гонадотропного гормона с учетом времени. Такую работу проделал сотрудник нашей лаборатории доктор биологических наук В. М. Казанский. Одновременно с гипофизарной инъекцией при помощи металлического шука у подопытных самок бралась проба овоцитов. Затем такие же пробы овоцитов брались от той же самки через каждые 5 часов по ходу её созревания после гипофизарной инъекции вплоть до завершения

овуляции (автор фиксировал материал и в более поздние сроки и получил результаты, которые мы в дальнейшем используем при анализе процесса оплодотворения). Материал фиксировали в жидкостях Буэна и Карнуа. Из каждого овоцита готовились серийные срезы толщиной 10 микронов, которые окрашивали железным гематоксилином, азан по Гейденгайду, метилгрюн-ниронином; производилась также реакция Фельгела.

В результате исследования этого материала установлено, что при температуре $+18 - +20^{\circ}$ в течение первых пяти часов после гипофизарной инъекции, параллельность с исчезновением ядрышек в ядре начинает выявляться зреломомы в виде попарно расположенных, часто перекрещивающихся, слабо узловатых нитей. одновременно с этим обращенный к центру яйцеклетки край ядра становится фестончатым; у этой области ядра заметно скопление плазмы, почти лишенной желтка. В течение дальнейших пяти часов параллельно с резким уменьшением объема ядра увеличивается скопление лишенной желтка протоплазмы вблизи его, так что к 9—10 часам после гипофизарной инъекции образуется приблизительно в 300 раз меньшее в объеме “ядро созревания”. В дальнейшем в этом видоизмененном ядре, потерявшем большую часть кариоплазмы, формируется профазы непосредственно предшествующая первому делению созревания. Хромосомы в этом состоянии очень укорочены.

Через 15 часов после инъекции выявляется метафаза первого деления созревания, а через 20 часов, за 1.5—2 часа до завершения овуляции, выявляется уже метафаза второго деления созревания и лежащее над ней первое редукционное тельце. В этом состоянии яйцеклетка пребывает вплоть до осеменения. Фигуры первого и второго деления по сравнению с гигантским зародышным пузырьком, каковым было ядро овоцита в течение трофоплазматического роста и после завершения поляризации яйца, отличаются ничтожными размерами—36 микрон и 27 микрон вдоль продольной оси; так что они целиком помещаются в одном или иногда в двух соседних срезах, и поэтому легко могут быть пропущены при соответствующих поисках.

Не подлежит сомнению, что описанные Казанским ядерные процессы, осуществляются, как в природе, так и в условиях эксперимента, под влиянием гонадотропного гормона гипофиза.

Второй, параллельно возникающий процесс, начинается, очевидно, также под воздействием гонадотропного гормона гипофиза. Этот процесс завершается овуляцией. Гистологические исследования на осетровых показали, что при осуществлении овуляции, активную роль играют клетки фолликулярного эпителия. (Казанский, 1952). В результате, очевидно, лизирующих свойств, выделяемого этими клетками секрета, нарушается связь верхнего слоя студенистой оболочки овоцита с фолликулом и происходит овуляция. Очевидно, в данном случае гонадотропный гормон является только побудителем начала процесса овуляции и что по мере отделения фолликулярного эпителия, путем появления обширных пустот в периферической части студенистой оболочки, по мере автономизации, заканчивающей развитие яйцеклетки, происходит и автономизация (в данном случае можно сказать автономизация) самого процесса овуляции. Так, Б. М. Казанскому, а вслед за ним другим экспериментаторам, в том числе и рыбоведам, удавалось наблюдать

завершение овуляции у осетровых в кусках яичника, погруженных в овариальную жидкость вне организма. Для примера приводим цифровую таблицу, взятую из работы Б. М. Казанского (Д. А. Н. СССР. 1952).

Таблица 1. Сравнение качества икры, взятой в момент начала овуляции, и икры, овулировавшей и созревшей вне организма*.

Вариант	Навеса, штук икринок в кг.	Колич. икры в кг.	% оплодот- ворения (8-16 блас- томеров)	% отхода к концу гастрюляции.
Икра из полости тела и с поверхности яичников, соб- ранная в момент овуляции	44	0,3	20	85
Икра, овулировавшая в опыте вне организме	44	5,0	73	30

* Икра в обоих случаях оплодотворялась смесью сперм от трех самцов.

В этой таблице могут вызвать удивление объективные показатели преимуществ икры, полученной в результате овуляции вне организма по сравнению с икрой, собранной в момент овуляции, произошедшей в организме самки (см, % оплодотворения и % отхода икры к концу гастрюляции). Однако, если вспомнить только что охарактеризованные ядерные процессы, требующие некоторого времени для своего осуществления, то икра, собранная с яичника, где она свободно отделялась от стромы, вполне может оказаться еще недостаточно полно подготовленной в противоположность икре, спокойно овулировавшей в течение более длительного срока даже и вне организма.

Таким образом, по нашим современным представлениям сфера влияния гонадотропного гормона гипофиза рыб сводится к стимуляции предовуляционных ядерных изменений и к стимуляции во всяком случае начального периода овуляции. Завершение же овуляции осуществляется как пусковой механизм уже без стимуляции гонадотропного гормона. Однако, принимая во внимание, что как в условиях эксперимента, так и в природе, эти процессы не могут осуществляться во всех овоцитах и яйцевых фолликулах вполне синхронно, а также, принимая во внимание возможно весьма быструю инактивацию гормона, введенного в организм при инъекции, мы имеем право заранее предположить, что единовременная инъекция всей дозы возможно не при всех обстоятельствах целесообразна, тем более, что ведь в природных условиях выведение накопленного в гипофизе гонадотропного гормона в кровь, в лимфу или в ликвор третьего мозгового желудочка (нейрокриния) осуществляется отнюдь не единовременно, а постепенно. Однако, к этому вопросу лучше вернуться в четвертой части настоящего сообщения.

3. Некоторые данные о гонадотропной функции гипофиза у рыб в связи с вопросом сезонных изменений его концентрации.

Разрешите здесь не повторить данных из области микроскопической анатомии гипофиза у костистых и осетровых, и начать прямо с изложения вопроса о локализации гонадотропного фактора в гипофизе рыб и о способе измерения его активности. Прежде всего следует отметить, что уже наши старые опыты (Гербицкий и др., 1947 и раньше) показали, что гипсфен леща, собранные после нереста этой рыбы, вообще не содержат гонадотропного гормона, во всяком случае в коли-

чествах достаточных для их применения в качестве препарата, используемого для управления рыб в нерестное состояние, и что в гипофизах судака, собранных после нереста этой рыбы, содержится значительно уменьшенное количество этого гормона.

Это означает, что при заготовке ацетонированных гипофизов, для нас далеко не безразличен сезон выполнения этой работы. Естественно, что мы заинтересованы в том, чтобы заготовить впрок гипофины для последующих инъекций именно в тот период, когда они содержат гонадотропный гормон в макимальных для данного вида концентрациях. Однако, в то время, когда выполнялись моменты работы, мы еще не имели тест объекта, позволяющего в достаточной мере точно определять силу действия испытуемого препарата. Благодаря работе Б. М. Казанского мы такой чрезвычайно удобный в лабораторных условиях тест объект имеем (Казанский 1949). Это вьюн (*Misgurnus fossilis* L.), самки и самцы которого зимуют в четвертой стадии зрелости и при комнатной температуре быстро отзываются на гипофизарные инъекции. В нашей лаборатории, а теперь и в других аналогичных лабораториях, в качестве биологической единицы гонадотропного гормона рыб принимается то наименьшее количество этого гормона или точнее препарата его содержащего, которое достаточно для перевода организма самки среднего веса в нерестное состояние зимой при комнатной температуре. Благодаря наличию такого удобного тесеобъекта можно было приступить к работам по вопросу о локализации гонадотропной функции гипофиза у рыб и вообще открылись возможности при помощи прямого физиологического эксперимента проверять достоверность выводов, сделанных на основании гистологических данных.

Зная о понятном, особом интересе, проявляемом здесь к сазану, выбираю в качестве примера работу, посвященную локализации гонадотропного гормона в гипофизе именно этой рыбы. Цитируемая работа выполнена Б. М. Казанским и Г. М. Персовым в 1948 г. в нашей лаборатории и опубликована в Д.А.Н. СССР.

В гипофизе сазана четко разграничиваются три основные доли, характерные для всех костистых — главное, промежуточное и переходное. Можно спорить по

Таблица 2. Сезонные изменения гонадотропной активности гипофиза леща (*Abramis brama*) Дон-Рогожино, (Доза по два гипофиза на 1 самку).

Время заготовки гипофизов	Колич. самок	Сроки созревания		Итого
		28 IV	29 IV	
Август	20	13	—	13
Сентябрь	20	5	6	11
Октябрь	21	14	1	15
Ноябрь	20	18	—	18
Декабрь	20	11	—	11
Январь	20	12	—	12
Февраль	20	16	—	16
Март	20	14	—	14
Апрель	20	16	—	16
Май (выбой 1938г.)	10	0	—	0
Контроль	20	—	—	0

Крайние температуры воды за время опыта —18.2—20°.

Таблица 3 Сезонные изменения гонадотропной активности гипофиза судака (*Lucioperca lucioperca*) Дон-Рогожкино. (Доза по два гипофиза на 1 самку).

Время заготовки гипофизов	Колич. самок	Сроки созревания		Итог
		20 IV	21 IV	
Сентябрь	22	1	1	2
Октябрь	22	10	6	16
Ноябрь	27	7	7	14
Декабрь	25	10	10	20
Январь	28	7	13	20
Февраль	25	7	12	19
Март	25	9	13	22
Апрель	25	6	12	18
Выбой 5-V 1938 г.	15	3	5	8
Контроль без воздействия	126	—	2	2

Крайние температуры воды за время опыта $-11.5-16^{\circ}$.

вопросу о гомологизации частей гипофиза, но сегодня не в этом дело. Переходная зона наиболее удалена от теста прикрепления гипофиза к мозгу и по объёму составляют $1/3$ всей массы железы. Эта зона довольно богата кровеносными сосудами и пронизана тонкими ветвями нейрогофиза. Промежуточная доля составляет значительную часть железы. Железистая ткань этой доли окружает наиболее мощные корни гипофиза и расположено ближе к вентральной стороне гипоталамуса. Наконец, ткань главной доли расположена по периферии органа и покрывает собою заднюю часть промежуточной доли. Главная доля не имеет разветвлений нейрогофиза.

Материалом для характеризующих опытов служили ацетонированные гипофизы волжского сазана, заготовленные в начале зимы (ноябрь). После обработки ацетоном и последующего высушивания ткань переходной зоны делается более твердой и темной; поэтому эта доля гипофиза хорошо отличима от более светлой и менее плотной ткани промежуточной доли. Это делает ацетонированные гипофизы сазана весьма удобными для постановки эксперимента.

Производилось отделение участка переходной зоны, затем для большей чистоты опыта удалялась оставшаяся ткань переходной зоны вместе с частью ткани промежуточной и производилось раздельное испытание от препарированных участков на половозрелых самках вьюна (упомянутые выше тост-объект), причём участки переходной зоны, взятые для опыта, составляли около $1/5$ всего гипофиза.

Предварительно была определена в мг. минимальная доля ткани целого гипофиза, причём оказалось, что наименьшая эффективная доза была равна 0.2 мг. на одну самку вьюна весом в 35—45 гр. и при температуре $16-17^{\circ}\text{C}$. Таким образом в одном мг. порошка, изготовленного из ацетонированных гипофизов содержа-

Таблица 4 Тестирование гипофизов сазана.

Доза в мг.	Число инъектированных самок.	Созрело самок.
0.1	5	0
0.3	5	5
0.3	5	5

жось 5 вьюновых единиц гонадотропного гормона.

далее производилась разделная инъекция в мышце спины суспензии ткани переходной зоны и ткани промежуточной доли вместе с главной. Итог показан в следующей таблице:

Таблица 5 Определение локализации гонадотропного фактора в гипофизе сазана.

Что инъектировалось	Доза в мг.	Число инъектированных самок.	Созрело самок.
Ткань переходной зоны.	0.2	5	0
	0.3	5	0
	1.0	10	0
	2.0	10	0
Ткань промежуточной и главной долей.	0.2	5	5
	0.3	5	5
	1.0	10	10
	2.0	10	10

Примечание: температура воды за время опыта 16—17° С; вес самок в опыте от 35 до 15 г.

Как ясно из этой таблицы, даже 10-кратной увеличение зоны по сравнению с минимально действующей дозировкой остальной части гипофиза, не привело в наши экспериментах к созреванию вьюна.

Остается возможность предположения, что гонадотропный гормон содержится в главной доли. Однако, главная доля у окуневых и карповых весьма редуцирована. Кроме того, ее ткань не проявляет признаков секреторной активности и тем более её сезонных изменений. Поэтому полученный положительный эффект не приходится относить за счет функции главной доли.

Итак, можно считать доказанным путем прямого эксперимента, что выработка гонадотропного гипофиза сазана действительно осуществляется клетками в той части аденогипофиза, которая примыкает к главным корням нейрогипофиза, в проксимальной части органа.

Можно ли, используя гистологическую методику, определить состояние гипофиза сазана в отношении заготовки гонадотропного гормона. Вопрос этот представляет в связи с темой нашего сообщения некоторый интерес потому, что сазан в различных водоемах и в различных частях своего громадного по протяженности ареала, может зимовать в весьма различных в этом отношении состояниях и прежде всего в зависимости от продолжительности вегетационного периода предыдущего года. Вполне вероятно, например, что сазан, размножающийся в пойменной системе Янцзы и зимующий на ямах в этой реке, существенно отличается по степени накопления гонадотропного гормона особенно в первой половине зимы от озерного сазана, весь жизненный цикл которого протекает в озере Донху или в каком-нибудь другом близком озере. Конечно, это постановка вопроса, требующая своего научно-исследовательского разрешения. Я думаю, что здесь среди мелких сорных рыб, надо подобрать такую форму, которая могла бы служить удобным тестобъектом для измерения силы действия препарата, приготовленного для инъекции, однако, есть и гистологический критерий (так как мы можем различать клетки одной и той же части гипофиза, находящиеся в различных функциональных состояниях, поэтому позвольте несколько остановиться на этом существенном вопросе.

Как это выяснилось для многих рыб с весенним и весенне-летним нерестом (Н. Л. Гербильский, 1941, 1947), клеткам, вырабатывающим гонадотропный гормон свойственна способность накапливать и депонировать этот гормон в виде плотных крупных гранул и скоплений, окрашивающихся при обработке азан по Гейденгайду в красный цвет. Богатство указанной части гипофиза такими клетками указывает на богатство гипофиза секретом, содержащим гонадотропный гормон. Секреторный цикл клетки, вырабатывающей гонадотропный гормон в гипофизе сазана, заканчивается, по-видимому её гибелью (т.е. мы имеем здесь дело с голокриновой секрецией), так что наличие обильных количеств запустевших клеток с периферически расположенными ядрами, обычно с признаками пикнотизации (истощенные клетки Коллена) указывает на резкое снижение количества гонадотропного гормона гипофиза. То и другое состояние является характерными фазами секреторного цикла клетки, вырабатывающего гонадотропный гормон. Начинается этот цикл с так называемых скоплений, когда граница между клетками в препаратах не обнаруживаются. Затем появляются сравнительно мелкие, бедные цитоплазмой хромофильные клетки. Затем они становятся слабо ацидофильными. После этого характерное нарастание базофилии цитоплазмы, что как показывает прямая проверка на тест-объекте соответствует нарастанию гонадотропного гормона в этих клетках. Наконец, появляется скопление базофильного секрета, по-видимому, в состоянии приобретают состояние от плотных ацидофильных образований, которые были упомянуты раньше. В таком состоянии клетка выделяет секрет, который дальше следует по пути нейрокринный и, вероятно также, по пути гемокринный через капилляры в корнях нейрогипофиза.

Исходя из изложенного, мы можем без особого труда и даже без наличия биологического тест-объекта определить состояние гонадотропной функции гипофиза или другой рыбы. В данном случае уместно было бы проделать эту работу с сазанами, зимующими в Янцзы и в Дунху.

4. Некоторые существенные детали применения гипофизарных инъекций, связанные со сферой влияния гонадотропного гормона гипофиза.

Переходя на основе изложенного к вопросам практического характера, мы прежде всего должны ясно представить себе цель планируемого эксперимента и решить вопрос, какого именно эффекта мы желаем достигнуть, ведь именно от этого зависит и рабочий план всего мероприятия. При помощи гипофизарных инъекций мы можем получить два результата: в первом случае мы ограничиваемся получением зрелых половых клеток самок и самцов, производим искусственное осеменение икры, а затем её инкубацию, и завершаем работу выращиванием молоди до желаемого возраста или размеров; во втором случае мы желаем вызвать полноценный переход организма рыбы в нерестное состояние, эффективный нерест с развитием икры и молоди в обстановке близкой к естественной.

В первом случае мы должны подготовить инкубационную аппаратуру, выростные и нагульные пруды, а во втором случае мы вместо инкубационной аппаратуры должны создать благоприятные условия для нереста и для инкубации икры в условиях близким к естественным. Именно так поступают в карповых прудовых хозяйствах, когда хотят при помощи гипофизарных инъекций получить ранний и фронтальный (единовременный во всех прудах хозяйства) нерест зеркального карпа.

Какой из этих двух путей будет избран, например, здесь применительно к задаче “вне сезона” получения потомства сазана, мне неизвестно. Однако, для меня ясно, что пруды того типа, который используется для выращивания молоди толстобликов и амуров, даже при наличии пловучих подвешенных нерестилищ, для этой цели далеко не вполне благоприятны. В этом вопросе мы должны обратиться к опыту советских, чехословацких и немецких рыбоводов, использующих гипофизарные инъекции для получения нереста карпа в специальных прудах-нерестовиках.

В Европе гипофизарные инъекции потребовались в особенности в карповых хозяйствах её северо-западной части, где при сравнительно холодном мае и позднем наступлении устойчивых достаточно высоких температур воды нерест карпа может очень значительно задерживаться, так что сеголетки к осени оказываются слишком маленькими и недостаточно упитанными, плохо подготовленными к длительной зимовке, за время которой наблюдались очень большие отходы. Первые удачные опыты в этом направлении были поставлены сотрудником нашей лаборатории О. Б. Чернышевым еще в 1940 году. Полученная тогда через четверо суток после инъекции икра инкубировалась при колебаниях температуры от 8 до 18° и дала за время инкубации отход не превышающий 30%. Вскоре был достигнут и полноценный нерест под влиянием гипофизарной инъекции. В 1950 году сотрудник нашей лаборатории Казанский подвел итог целой серии подобных работ, сделанных в рыбхозах дельты Волги на диком сазане (Гербицкий и Баландин, 1941), в прудовых хозяйствах Новгородской области, в прудовых хозяйствах Эстонской ССР, и в прудовых хозяйствах Латвийской ССР и написал инструкцию, суть которой можно изложить очень кратко. “Перед запуском производителей на нерест в нерестовики, при помощи шприца им вводится в мышцы спины суспензия (в физиологическом растворе) порошка из ацетонированных гипофизов сазана или леща. Гипофизы заготавливаются заранее от самцов и самок, находящихся в так называемой четвертой стадии зрелости (т.е. поздней осенью, зимой или весной перед началом нереста). Наиболее эффективные и рекомендуемые нами дозы при наступлении нижних пороговых нерестных температур равны 25—30 вьюновых единиц для самок и 10—15 вьюновых единиц для самцов. В одном мг. сухого порошка, изготовленного из ацетонированных гипофизов сазана, которые были заготовлены в указанное выше время содержится обычно от 3 до 5 вьюновых единиц, а в гипофизах леща от 3 до 4 вьюновых единиц. В пределах нерестных температур (хотя бы вблизи их нижнего порога) через 20—36 часов после инъекции в нерестовых прудах в нерестовых прудах происходит типичный нерест.

Наша лаборатория до настоящего времени рекомендовала для широкого внедрения в производство применение этого метода хотя бы при наступлении нижних пороговых нерестных температур. Однако, опыты показали, что нерест можно получить при более низких температурах, чем это бывает в природе. Лимитирующим моментом для получения ранней молоди является не возможность икротетания, а возможность инкубации в условиях низких и сильно колеблющихся температур ранней весны и возможность столь раннего получения живого корма в нерестовых и выростных прудах.

Значительных успехов в применении гипофизарных инъекций для получения раннего фронтального нереста карпа в нерестных прудах достигли чехословацкие

учёные рыбоводы. В связи с этим особый интерес представляет работа чешских авторов В. Черняева и И. Бена (Jchernaev и Bena, 1954), которые наблюдали ускоренный переход гнезд зеркального карпа в нерестное состояние при, так называемой, в этой работе “комбинированной посадке”, т.е. когда на нерест высаживались в нерестовые пруды самцы, получившие инъекцию совместно с интактными самками и не получившие инъекцию самки совместно с интактными самцами. Таким образом, здесь мы встречаемся со случаем влияния полов друг на друга при переходе в нерестное состояние.

В связи с задачей “внесезонного” получения потомства сазана весьма существенно припомнить здесь еще некоторые вопросы, требующие серьезного внимания. Это прежде всего вопрос внутривидовой биологической дифференциации, которая столь широко представлена в мире рыб (Гербильский 1950—1958). Так в районе нижней Волги мы различаем по меньшей мере 4 биологических группы сазана, дифференцированных именно по особенностям размножения—“яровой”, “озимый”, “ямный” и “ильменный”, причём начало нерестного сезона и, во всяком случае, количество мёток икры у биологически различных сазанов может быть различным, поэтому я бы считал весьма целесообразным в кратчайший срок изучить состояние воспроизводительной системы у половозрелых особей сазана и других объектов разведения, зимующих в озёрах системы Янцзы и на ямах в русле самой реки. Эти знания явились бы весьма существенной предпосылкой для успешных опытно-производственных работ.

Наконец, позвольте рассмотреть еще один вопрос методического порядка. Обычно, применяя гипофизарные инъекции, мы вводим всю дозу гормона одновременно, а ведь в природе так не бывает. Насыщение организма гонадотропным гормоном в результате выведения его из гипофиза происходит постепенно. Если организм действительно готов к переходу в нерестное состояние—это отличие, вероятно, не имеет существенного значения. Если же мы стремимся привести в нерестное состояние, организм еще не вполне к этому подготовленный, например, для рыб с весенним нерестом—в середине зимы или, например, когда поляризация старших овоцитов еще не вполне завершена, может быть, хотя мы еще не имеем возможности утверждать это с большой уверенностью,—дробность инъекции, т.е. введение намеченной дозы по частям, будет иметь положительное значение. Опыты такого рода будут прокладывать новые пути и представляют интерес в научном, а может быть и в практическом отношении.

В заключении несколько слов о необходимости своевременного взятия икры после экспериментально вызванной овуляции и о своевременности её осеменения. Эти слова имеют практический интерес только в том случае, если экспериментатор решает инкубировать икру, не ожидая нереста. В таких случаях следует принимать во внимание, что икра, отделившаяся от стром яичника, оказывается в условиях не благоприятных и подвергается, так называемому перезреванию, теряет способность к дальнейшему нормальному развитию (оплодотворение и эмбриогенез). Поэтому при констатации перехода рыбы в пятую стадию зрелости икру надложит собрать, осеменить и разместить в инкубационный аппараты без особого промедления. На икре въюна Л. М. Нусенбаум показал, что этот процесс “перезревания икры” происходит тем быстрее, чем при более высокой температуре воды мы содержим подопытные рыбы.