

РГБ ОА

12 СЕН 1994

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

На правах рукописи

УДК 591.48:591.16

Вараксин Анатолий Алексеевич

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ И ПОЛОВЫЕ СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ
В РЕГУЛЯЦИИ РАЗМНОЖЕНИЯ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ И
МОРСКИХ ЕЖЕЙ

03.00.11 - эмбриология, гистология и цитология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук
в форме научного доклада

Владивосток
1994

Работа выполнена в Институте биологии моря ДВО РАН

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор	В.Н.Иванков
доктор биологических наук, профессор	В.М.Колдаев
доктор биологических наук	А.Л.Дроздов

Ведущая организация - Институт биологии развития РАН

Защита диссертации состоится "30 сентября 1994 г.
в 10 час на заседании Специализированного совета
Д 084.24.01 при Владивостокском государственном медицинском
институте по адресу: 690600, Владивосток, пр.Острякова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Влади-
востокского государственного медицинского института.

Диссертация разослана "29 августа 1994 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета,
доцент

 Г.М.Холоденко

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Познание закономерностей развития половых клеток, нереста, оплодотворения и раннего эмбриогенеза морских беспозвоночных за последние годы все больше смещается в область исследования механизмов регуляции этих процессов. Большое внимание уделяется значению экологических факторов, холинергической и моноаминергической системы, внутриклеточным мессенджерам и молекулярным механизмам (Касьянов и др., 1980. Размножение...., М.: Наука. 134 с.; Деридович, Хотимченко, 1985. Биол. моря. 3: 53-58; Eckberg, 1988. Biol. Bull., 174: 95-108; Motavkine, Varaksine, 1989, La Reproduction ..., Brest: Ifremer. 250 p.; Хотимченко и др., 1993. Биология..., М.: Наука. 169 с.). Важным компонентом нервной регуляции функций в организме является пептидергическая система.

Представления о регуляторных пептидах претерпели за последние годы чрезвычайно бурное развитие. К настоящему времени сформировались понятия об особенностях их биосинтеза и процессинга, локализации, распространении, функциональной непрерывности, регуляторном континууме, состоящем из регуляторных пептидов и сопряженных с ними межклеточных сигнализаторах другой природы (Ашмарин, Каменская, 1988. Итоги науки и техники. Т. 34. 184 с.; Ашмарин и др., 1989. Физиол. ж. 75: 627-632; Замятин, 1990. Ж. общ. биол. 51: 147-162 и др.). Подавляющее большинство сведений о регуляторных пептидах получено на позвоночных животных. В последнее время эндогенные регуляторные пептиды найдены в нервной системе, пищеварительном тракте, половой железе, эндокринных и других органах и тканях ряда беспозвоночных животных. Накапливаются данные о их участии в регуляции различных функций, в том числе и репродуктивной. Структурное сходство функционально значимых участков регуляторных пептидов беспозвоночных и позвоночных животных указывает на то, что, очевидно, общие принципы их взаимодействия с рецепторами у тех и других животных могут быть очень похожими или даже одинаковыми. В то же время функциональные проявления регуляторных пептидов у беспозвоночных и позвоночных различаются.

Их особое место среди эндогенных биологически активных веществ определяется многочисленностью, полифункциональнос-

тью каждого пептида в сочетании с перекрыванием функций между разными регуляторными пептидами, а также способностью служить материальной основой для передачи сигналов между интегративными системами организма. Однако это не умаляет значения в процессах регуляции размножения других регуляторных систем, таких, например, как моноаминергическая или холинергическая, с которыми они тесно взаимодействуют.

Кооперативное действие регуляторных систем опосредуется в гонаде половыми стероидными гормонами. Их значение в регуляции функций у позвоночных изучено достаточно обстоятельно. У беспозвоночных эти факторы долгое время оставались неизвестными и лишь в последние десятилетия стероидные гормоны были найдены у многих морских беспозвоночных, в том числе и у двустворчатых моллюсков, и морских ежей. Основные пути их синтеза и обмена, очевидно, сходны у всех животных. Уже в первых исследованиях было высказано предположение, что в регуляции половой системы двустворчатых моллюсков и иглокожих стероидные гормоны выполняют функции аналогичные таковым у млекопитающих. Однако многие стороны их функциональной значимости оставались неизвестными. Очень важен вопрос о месте, которое занимают половые стероидные гормоны в общей системе регуляции функций гонады. Это потребовало обратить более пристальное внимание на их участие в гаметогенезе.

Открытие донервной регуляции эмбриогенеза стимулировало исследование эндогенных механизмов регуляции раннего эмбрионального развития (Бузников, 1987. Нейротрансмиттеры ..., М.: Наука, 232 с.). Учитывая имеющиеся представления, можно предполагать, что пептидергическая и стероидергическая системы играют важную роль в раннем эмбриогенезе двустворчатых моллюсков и морских ежей.

Цель и задачи работы. Цель работы заключалась в установлении пептидергических механизмов регуляции пролиферации, роста, созревания и формирования половых клеток, нереста и раннего эмбрионального развития у двустворчатых моллюсков и морских ежей.

В основные задачи работы входило:

1) Охарактеризовать пептидергическую нейросекреторную систему, ее структурные и функциональные изменения на протяжении репродуктивного цикла. Выявить наличие, локализацию и содержание регуляторных пептидов в нервной системе и половой

железе;

2) Проследить морфологические связи между нервной системой и половой железой, получить ультраструктурные, гисто- и иммуноцитохимические доказательства пептидергической иннервации половой железы;

3) Выяснить значение некоторых регуляторных пептидов, гормональных и внутриклеточных механизмов их действия на пролиферацию гониев, рост и созревание ооцитов, нерест и раннее эмбриональное развитие;

4) Описать наличие и локализацию ферментов стероидогенеза и половых стероидных гормонов, выявить и охарактеризовать соматические стероидергические элементы половой железы, исследовать способность половых клеток, эмбрионов и личинок к синтезу половых стероидных гормонов;

5) Показать значение половых стероидных гормонов в пролиферации, росте, созревании и формировании половых клеток;

6) Выявить наличие и значимость функциональных связей между пептидергической системой и половыми стероидными гормонами и их взаимодействие с межклеточными регуляторами другой природы.

Научная новизна. В работе выявлены структурные и функциональные изменения пептидергической нейросекреторной системы на протяжении репродуктивного цикла и нереста. Доказана пептидергическая иннервация половой железы. Выявлено наличие, локализация и содержание некоторых регуляторных пептидов и показано их значение в гонадогенезе. Разные этапы развития половой клетки контролируются различными регуляторными пептидами.

Локализованы основные ферментные системы обмена половых стероидных гормонов. В семенниках и яичниках двустворчатых моллюсков и морских ежей выявлены и охарактеризованы стероидергические элементы. Впервые, кроме соматических стероидергических элементов, ферменты стероидогенеза и половые стероидные гормоны найдены в ооцитах и клетках сперматогенного ряда - сперматогониях, сперматоцитах, сперматидеях и сперматозоидах. Утверждается, что половая клетка двустворчатых моллюсков и морских ежей функционирует как стероидцептивная-стероидергическая система.

У самцов этих животных половые стероидные гормоны ускоряют пролиферацию сперматогониев, созревание сперматоцитов II,

формирование сперматид и сперматозоидов, не влияя на созревание сперматоцитов I. У самок стероидные гормоны повышают пролиферативную активность гониев, ускоряют цито- и трофоплазматический рост за счет активации синтетических процессов как в половой железе, так и в самом ооците.

Реинициация мейоза в ооцитах контролируется гонадостимулирующим регуляторным пептидом. Гормональная индукция мейоза является многоступенчатым процессом. Выявлено, что серотонин выполняет функцию эндогенного гормонального фактора реинициации мейоза в ооцитах двустворчатых моллюсков. Доказано, что действие серотонина осуществляется через специфические серотониновые рецепторы. Впервые подробно исследованы внутриклеточные механизмы передачи сигнала с серотонинового рецептора в ооцит, которая протекает по Ca^{2+} -фосфоинозитидзависимому пути. Активными участниками усиления рецепторзависимых внутриклеточных сигналов является арахидоновая кислота и ее липоксигеназный метаболит - 5-гидроксиэйкозатетраеновая кислота.

Выявлено, что серотонин, являясь мейозиндуцирующим веществом у двустворчатых моллюсков, вызывает нерест у этих животных. Простагландины усиливают нерест, не влияя на реинициацию мейоза в половой клетке.

Регуляторные пептидергическая и стероидергическая системы, формирующиеся в процессе развития половой клетки, сохраняются после ее созревания, участвуют в оплодотворении и начинают функционировать на ранних стадиях эмбриогенеза, осуществляя регуляцию нормального развития.

Теоретическое и практическое значение работы. Выполненная работа носит экспериментально-теоретический характер. Полученные сведения раскрывают механизмы регуляции гаметогенеза, нереста и раннего эмбрионального развития и могут быть использованы в разработке способов контроля над размножением морских беспозвоночных. На основании полученных данных разработан и предложен способ стимуляции нереста у двустворчатых моллюсков. Способ прост и удобен в исполнении как в лабораторных, так и полевых условиях и не оказывает отрицательного влияния на развитие потомства. Способ защищен авторским свидетельством. Знание особенностей полового цикла самцов приморского гребешка и его регуляции позволило разработать способ оценки гонадотроп-

ной активности химических соединений. Использование самцов этого моллюска в качестве тест-объекта дает возможность дифференцированно оценивать пролиферативную активность гониев, гонез сперматоцитов I, сперматоцитов II, сперматид и сперматозоидов после действия различных природных или синтетических химических соединений, чего нельзя выявить при использовании традиционных лабораторных животных. Способ защищен авторским свидетельством.

Апробация работы. Основные результаты были представлены на I и II Всесоюзных конференциях по нейроэндокринологии (Ленинград, 1974; Иваново, 1982), VII Международном симпозиуме по нейросекреции (Ленинград, 1976), Пятом и Восьмом Всесоюзных совещаниях по изучению моллюсков (Ленинград, 1975, 1987), IV Всесоюзном коллоквиуме по иглокожим (Боржом, 1979), XIV Тихоокеанском научном конгрессе (Хабаровск, 1979), VI Всесоюзном совещании эмбриологов (Москва, 1981), II Всесоюзном съезде океанологов (Севастополь, 1982), Всесоюзной конференции "Механизмы действия медиаторов и гормонов на эффекторные клетки" (Суздаль, 1989), Советско-Финском симпозиуме по биологии развития (Суздаль, 1991), Региональной конференции Международного общества нейробиологии беспозвоночных "Простые нервные системы" (Минск, 1991), Восьмом международном рабочем совещании по лектинидам (Франция, 1991), рабочем совещании "Консервация генетических ресурсов" (Пущино, 1992), научных семинарах и конференциях Института биологии моря ДВО РАН.

Объем и структура работы. Диссертация изложена в настоящей брошюре в форме научного доклада, обобщающего результаты, представленные в 44 публикациях в отечественных и международных изданиях:

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основные наблюдения и экспериментальные исследования выполнены на двустворчатых моллюсках: приморском гребешке *Mizuhopecten yessoensis*, мидии Грея *Crenomytilus grayanus*, спизуле сахалинской *Spisula sachalinensis*, анадаре Броутона *Anadara broughtoni*, мерценарии *Mercenaria stimpsoni*, гребешке Свифта *Swiftopecten swifti* и черном и сером морских ежах *Strongylocentrotus nudus* и *Strongylocentrotus intermedius*. При выпол-

нении отдельных разделов работы использовали двустворчатых моллюсков: мактру *Mactra sulcataria*, модиолуса *Modiolus dif-
ficilis*, глицимериса *Glycymeris yessoensis*, гигантскую уст-
рицу *Crassostrea gigas*.

Для изучения структуры пептидергической нервной системы, ее изменений на протяжении репродуктивного цикла, исследования половых и соматических элементов гонады, обеспечивающих развитие половых клеток и нерест, оценки экспериментального влияния регуляторных пептидов, половых стероидных гормонов, других биологически активных соединений на гаметогенез применены световые и электронно-микроскопические морфологические и морфометрические методы. Действие регуляторных пептидов, биогенных аминов, полиненасыщенных жирных кислот и их метаболитов, блокаторов липоксигеназного окисления полиненасыщенных жирных кислот, кальциевых ионофоров, ингибиторов Na^+/H^+ -обмена на реинициацию мейоза и внутриклеточные механизмы этого процесса исследовали цитоспектрофлуорометрическим методом с применением флуоресцентных зондов по изменениям содержания свободного и связанного кальция в клетке и уровня цитоплазматического pH. Методами световой и электронной гистохимии определяли характеристики холинергических и моноаминергических структур и локализацию ферментов обмена стероидных гормонов. Локализацию и идентификацию регуляторных пептидов и стероидных гормонов в половых клетках, эмбрионах и личинках проводили иммуногистохимическими методами с применением соответствующих антисывороток. Количественное определение этих веществ проводили радиоиммунологическим методом. Синтетические процессы в гонаде и половых клетках исследовали автордиографически и биохимическими методами. Методики экспериментальной эмбриологии применяли при исследовании механизмов нереста и раннего эмбрионального развития.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Локализация и идентификация регуляторных пептидов

Для выполнения этой работы необходимо было показать наличие и локализацию регуляторных пептидов. В первую очередь, мы обратили внимание на семейство опиоидных пептидов. С тех

пор как в нервной системе млекопитающих были найдены опиоидные рецепторы, а позднее и сами опиоидные пептиды, эндогенные опиоиды описаны у всех исследованных беспозвоночных и позвоночных животных и человека.

Иммуноцитохимическими методами выявлено, что энкефалинимунореактивные нейроны локализованы в висцеральных, цереброплевральных и педальных ганглиях мидии Грея, приморского гребешка, анадара Броутона. Во всех нервных ганглиях двустворчатых моллюсков найдены вещество Р-иммунореактивные нейроны. Это-униполярные клетки, располагающиеся по одиночке или небольшими группами в местах выхода нервов. Широко распространены в нервной системе двустворчатых моллюсков ФМРФамид- и инсулинимунореактивные нейроны, а в нейропиле, коннективах и комиссурах найдены очень мелкие энкефалин-, ФМРФамид- и вещество Р-иммунореактивные волокна.

Энкефалинимунореактивный материал найден нами в растущих ооцитах и клетках сперматогенного ряда - сперматогониях и сперматоцитах I.

3.2. Влияние некоторых регуляторных пептидов на сперматогенез двустворчатых моллюсков

Ранее в цереброплевральных ганглиях и гемолимфе двустворчатых моллюсков найден фактор, стимулирующий пролиферацию сперматогониев. Он является пептидом с небольшой молекулярной массой и, как полагают, относится к группе регуляторных пептидов с митогенным действием (Mathieu et al., 1988. Gen. Comp. Endocrinol., 72: 257-263; Toullec et al., 1988. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 119: 111-117). Как показано нами выше, кроме фактора пролиферации сперматогониев в нервной системе и половой железе двустворчатых моллюсков содержатся другие регуляторные пептиды. Исследовано влияние некоторых из них, в частности, пептидного морфогена гидры, на гаметогенез приморского гребешка. С этой целью пептидный морфоген гидры растворяли в стерилизованной морской воде и вводили в аддукторную мышцу по 0,2 мл раствора, содержащего 5 мкг пептида, ежедневно на протяжении двух недель на различных стадиях полового цикла. На стадии начала гаметогенеза (октябрь) после введения животным пептидного морфогена гидры средняя площадь профильного поля ацинуса возрастает почти в 1,5 раза (табл. I). Цитологический анализ показывает, что

у контрольных животных на долю вторичных сперматогониев в это время приходится почти 98% клеток, присутствующих в ацинусах. Значительно меньшую долю составляют первичные сперматогонии. Первичные и вторичные сперматогонии располагаются по периферии ацинуса, формируя зону размножения и роста - другой важный морфометрический показатель состояния половой железы. Площадь профильного поля зоны размножения и роста у опытных животных возрастает более, чем в 3 раза, по сравнению с контролем. Плотность вторичных сперматогониев также значительно увеличивается. По существующим представлениям начало пулу вторичных сперматогониев дают первичные крупные гонии. Очевидно, этим следует объяснять тот факт, что одновременно с резким увеличением плотности вторичных сперматогониев плотность первичных уменьшается. В зоне размножения и роста в ацинусах половой железы моллюсков из опытной группы имеются сперматоциты I на стадии начала профазы мейоза.

Опыты, проведенные во второй половине декабря, т.е. в период начала созревания сперматоцитов I, показали, что площади ацинусов и зоны размножения и роста у опытных животных увеличиваются незначительно (табл. 2). Доля сперматогониев в ацинусах контрольных животных составляет 100%, а после введения пептидного морфогена гидры, как и на стадии начала развития, в ацинусах моллюсков появляются сперматоциты I начала профазы мейоза. Другие сперматогенные клетки в гонаде отсутствуют.

В январе у моллюсков доля сперматоцитов I в семеннике значительно возрастает. Появляется небольшое число сперматоцитов II. В этот период сперматогенез приморского гребешка удобно использовать как модель для оценки действия химических соединений на сперматоцитогенез. Введение пептидного морфогена гидры показывает, что хотя площадь профильного поля возрастает незначительно, площадь зоны размножения и роста увеличивается на большую величину. Это свидетельствует об активации пролиферации сперматогониев. Цитологический анализ показывает, что одновременно возрастает доля сперматоцитов I начала профазы мейоза, в то время как количество сперматоцитов I конца профазы мейоза и сперматоцитов II у животных в опыте, по сравнению с контрольными, снижается (табл. 3). Это указывает на то, что наряду с гониальной пролиферативной активностью пептидный морфоген гидры обладает спо-

Таблица I

Влияние пептидного морфогена гидры на морфометрические и цитологические характеристики семенника приморского гребешка в период пролиферации гониев (октябрь)

Группа	Площадь, отн. ед.		Плотность, отн. ед.		
	ацинус	зона размножения и роста	первичные сперматогонии	вторичные сперматогонии	сперматocyты I
Контроль	0,55±0,14	0,06±0,01	1,5±0,4	16,4±5,1	-
Опыт	0,79±0,22 [*]	0,20±0,03 [*]	1,2±0,4	31,3±6,5 [*]	5,1±3,5

Примечание. Здесь и далее * - $p < 0,05$ - уровень значимости различий относительно контрольной группы животных.

Таблица 2

Влияние пептидного морфогена гидры на морфометрические и цитологические характеристики семенника приморского гребешка в период созревания сперматоцитов I (вторая половина декабря)

Группа	Площадь, отн. ед.		Доля сперматогенных клеток, %			
	ацинус	зона размножения и роста	сперматогонии	сперматоциты I начала профазы мейоза	сперматоциты I конца профазы мейоза	сперматоциты II
Контроль	0,62±0,02	0,43±0,03	100	-	-	-
Опыт	0,78±0,05*	0,52±0,06*	96	4	-	-

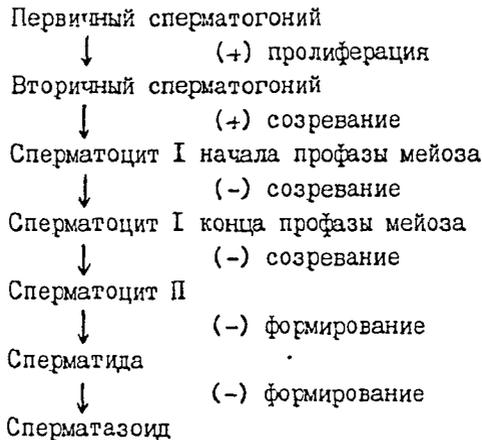
Таблица 3

Влияние пептидного морфогена гидры на морфометрические и цитологические характеристики семенника приморского гребешка в период созревания сперматоцитов I (январь)

Группа	Площадь, отн. ед.		Доля сперматогенных клеток, %			
	ацинус	зона размножения и роста	сперматогонии	сперматоциты I начала профазы мейоза	сперматоциты I конца профазы мейоза	сперматоциты II
Контроль	0,73±0,03	0,46±0,03	25	30	35	10
Опыт	0,83±0,05*	0,69±0,06*	27	38	29	8

способностью ускорять созревание сперматоцитов I начала профазы мейоза, не влияя на созревание сперматоцитов I конца профазы мейоза и сперматоцитов II.

Во второй половине февраля основными сперматогенными клетками в гонаде являются сперматоциты I и сперматоциты II. Пептидный морфоген гидры вызывает накопление сперматоцитов I начала профазы мейоза. Сперматиды и сперматозоиды отсутствуют, т.е. формирование сперматид под влиянием пептидного морфогена гидры не происходит (табл. 4). Таким образом, пептидный морфоген гидры вызывает резкое увеличение пролиферативной активности сперматогониев, что, очевидно, является наиболее характерным физиологическим свойством пептида и, в меньшей степени, ускоряет созревание сперматоцитов I начала профазы мейоза. Пептидный морфоген гидры не оказывает влияния на созревание сперматоцитов I конца профазы мейоза, формирование сперматид и сперматозоидов. Полученные данные о действии пептидного морфогена гидры представлены в виде следующей схемы:



Наличие в нервной системе и сперматогенных клетках других иммунореактивных регуляторных пептидов поставило вопрос о их возможном значении в сперматогенезе этого моллюска. Мы обратили внимание на синтетический аналог лейэнкефалина даларгин, в молекуле которого, в отличие от эндогенного лейэнкефалина, глицин заменен на Д-аланин, а к С-терминальной части добавлен аргинин. Даларгин обладает опиоидными свойствами, однако модификация молекулы лейэнкефалина привела к появлению новых свойств: даларгин не вызывает привыкания, физической зависимости

Таблица 4

Влияние пептидного морфогена гидры на морфометрические и цитологические характеристики семенника приморского гребешка в период созревания сперматоцитов II (вторая половина февраля – первая половина марта)

Группа	Площадь, отн. ед.		Доля сперматогенных клеток, %			
	ацинус	зона размножения и роста	сперматогонии	сперматоциты I начала профазы мейоза	сперматоциты I конца профазы мейоза	сперматоциты II
Контроль	0,78±0,03	0,61±0,02	5	23	30	42
Опыт	0,90±0,05 ^ж	0,80±0,03 ^ж	3	44	32	21

и толерантности, что характерно для многих опиоподобных веществ (Титов и др., 1985. Бюл. ВКНЦ, 2: 72-76).

Применение даларгина и обработка материала велась как указано выше. Используя морфометрический анализ и цитологическую оценку состояния семенника, мы не обнаружили каких-либо изменений в процессах пролиферации сперматогониев, созревании или формировании сперматогенных клеток.

Характеристике взаимодействия синтетических опиоидных пептидов с их рецепторами помогает наличие специфических антагонистов. Одним из таких соединений является налоксон, который связывается с опиоидными рецепторами μ - и δ -типов, но при этом не вызывает биологического ответа и блокирует эффекты агонистов этих рецепторов. Ежедневные инъекции даларгина в аддукторную мышцу приморского гребешка в течение 2-х недель в дозах от 10 до 100 мкг/кг веса не оказывают влияния на морфометрические и цитологические показатели семенника приморского гребешка в период пролиферации сперматогониев. Это подтверждает сведения, полученные при исследовании действия даларгина.

3.3. Влияние регуляторных пептидов на пролиферацию сперматогониев опосредуется простагландинами

Как известно из литературы и было показано нами выше, некоторые регуляторные пептиды обладают мощными митогенными свойствами (Rozenfurt, 1986. Science, 234: 161-166; Zagon, 1987. Brain Res., 412: 68-72). На основании этих сведений было предположено, что действие фактора пролиферации сперматогониев у двустворчатых моллюсков, подобно другим регуляторным пептидам у млекопитающих, опосредуется эйкозаноидами, в частности, простагландинами, принимающими участие в контроле пролиферации различных типов клеток у позвоночных животных (Hori et al., 1991. Biochem. Biophys. Res. Commun., 174: 758-766). Для проверки этого предположения мы провели исследование влияния индометацина (блокатора циклоксигеназного окисления полиненасыщенных жирных кислот), арахидоновой кислоты и продуктов ее циклоксигеназного пути окисления - простагландина E_2 и простагландина $F_2 \alpha$ на пролиферацию сперматогониев у приморского гребешка.

Результаты этого исследования приведены на рис. 1. В сентябре, в начале периода пролиферации, плотность сперматогониев

в ацинусах семенников животных контрольной группы невелика и составляет $6,8 \pm 1,4$ усл. ед. Введение индометацина вызывает увеличение плотности сперматогониев в 2,9 раза (рис. 1а). К началу октября плотность сперматогониев у животных контрольной группы возрастает до $17,6 \pm 3,2$ усл. ед. Введение индометацина в этот период увеличивает плотность сперматогониев примерно в такой же степени, как и в предыдущем случае (рис. 1б). Ко второй половине октября исходная плотность сперматогониев в ацинусах животных контрольной группы составляет $144,0 \pm 15,4$ усл. ед. Индометацин в этот период также вызывает значительное увеличение плотности сперматогониев, хотя в меньшей степени, чем в начале периода пролиферации. Введение арахидоновой кислоты подавляет пролиферацию, а совместное с ней введение индометацина устраняет ингибирующее действие арахидоновой кислоты (рис. 1в).

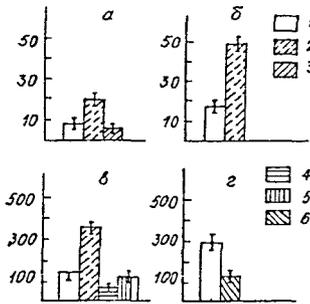


Рис. 1. Изменение плотности сперматогониев в ацинусах семенника приморского гребешка после введения индометацина, арахидоновой кислоты, простагландина $F_{2\alpha}$ и простагландина E_2 . Время проведения опытов: а - сентябрь, б - начало октября, в - середина октября, г - конец октября. 1 - контроль; введение: 2 - индометацина, 3 - простагландина $F_{2\alpha}$, 4 - арахидоновой кислоты, 5 - арахидоновой кислоты совместно с индометацином, 6 - простагландина E_2 .

Это дает основание считать, что ингибирующее действие на пролиферацию сперматогониев способны оказывать продукты циклоксигеназного окисления арахидоновой кислоты. У позвоночных животных отмечено увеличение синтеза простагландина E_2 в фибробластах кожи, макрофагах и других клетках после действия веществ, обладающих митогенным свойством. Одновременно, но с меньшей активностью образуются простагландины A_2 , D_2 , $F_{2\alpha}$, 6-кето- $F_{1\alpha}$ (Wachwich et al., 1986. Biochem. Biophys. Res. Commun., 136: 94-101).

Введение простагландина E_2 блокирует пролиферацию сперматогониев у приморского гребешка более, чем в 2 раза (рис. 1 г). Простагландин $F_{2\alpha}$ также замедляет пролиферацию сперматогониев, хотя в меньшей степени, чем простагландин E_2 (рис. 1 а).

Известно, что у позвоночных животных именно простагландины, главным образом простагландин E_2 , оказывает отрицательное влияние на пролиферацию клеток при действии различных митогенов. Очевидно, что это свойство простагландинов проявляется при регуляции пролиферации сперматогониев у двустворчатых моллюсков.

3.4. Стероидергические элементы половой железы двустворчатых моллюсков и морских ежей

Гистохимическое изучение локализации 3 β - и 17 β -гидроксистероиддегидрогеназ у приморского гребешка и мидии Грея показало, что эти ферменты выявляются как в семенниках, так и в яичниках исследованных животных. Высокая активность ферментов отмечается в телах и отростках вспомогательных клеток. Известно, что эти клетки выстилают ацинус, имеют широкое основание размером до 12 мкм и отростки, направленные к центру ацинуса. Количество таких клеток на протяжении полового цикла остается относительно постоянным. Эти клетки делят ацинусы на отделы - компартменты, в которых развиваются половые элементы.

Гранулы диформаза, распределенные диффузно по цитоплазме, выявляются также в гранулярных амебоцитах. Эти клетки имеют хорошо развитые отростки, прилегающие к половым элементам. Размер гранулярных амебоцитов у приморского гребешка составляет около 10 мкм, а у мидии Грея - 20 мкм. Цитоплазма богата крупными округлыми митохондриями с плотным матриксом. Хорошо развиты эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. В зоне этих органелл имеются многочисленные гранулярные включения. Немногочисленные электронноплотные гранулы ферроцианида меди, указывающие на локализацию ферментов, располагаются вблизи гладкой эндоплазматической сети или прилегают к наружной поверхности ее мембраны, а их скопления выявляются в глобулах.

У морских ежей активность ферментов стероидогенеза локализована в хорошо развитых вспомогательных клетках половых желез. Эти клетки при световом микроскопировании имеют неправильную форму без четких границ и многочисленные отростки.

Ядра - вытянутые или овальные.

Ранее у морской звезды *Asterias rubens* удалось выявить элементы по ультраструктурной характеристике сходные со стероидпродуцирующими клетками позвоночных (Schoenmakers et al., 1981. *Cell Tissue Res.*, 217: 577-597), но локализация ферментов обмена в половых железах беспозвоночных оставалась неизвестной. Обнаруженная нами высокая активность 3 β - и 17 β -гидроксистероиддегидрогеназ в отдельных вспомогательных клетках двустворчатых моллюсков и морских ежей и гранулярных амебоцитах двустворчатых моллюсков, их ультраструктурная характеристика и тесная взаимосвязь с половыми элементами доказывает стероидергическую природу этих клеток.

3.5. Локализация ферментов стероидогенеза в половых клетках

Кроме специализированных стероидергических элементов у двустворчатых моллюсков и морских ежей ферменты стероидогенеза локализованы в половых клетках. Как правило, зерна диформаза в ооцитах при выявлении 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы располагаются диффузно, а при выявлении 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы, главным образом, перинуклеарно. В процессе роста ооцитов отмечается изменение активности ферментов. Интенсивность гистохимической реакции в молодых растущих ооцитах выше, чем в крупных свободнолежащих ооцитах трофоплазматического роста. Активность 3 β - и 17 β -гидроксистероиддегидрогеназ в ооцитах, закончивших рост, невысокая и сохраняется на таком уровне до нереста. Достоверность этих сведений подтверждается обнаружением иммуноцитохимическим методом наличия эстрадиола в яйцеклетках морских ежей (Вараксин, Вараксина, 1990).

Положительную реакцию на ферменты дают различные популяции клеток сперматогенного ряда. Невысокая активность 3 β - и 17 β -гидроксистероиддегидрогеназ выявляется в сперматогониях. В период созревания сперматоцитов и формирования сперматид и сперматозоидов их активность возрастает.

В ооцитах млекопитающих также показано присутствие различных ферментов стероидогенеза (Niimura et al., 1980. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 51: 191-196; Patinawin et al., 1980. *J. Steroid Biochem.*, 13: 1277-1281) и определено содержание 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (Tsutsumi et al., 1982. *Folia*

Endocrinol. Jap., 58: 1321-1322). Более того иммуноцитохимическими методами в ооцитах человека найдены прогестерон и эстрадиол и доказана их эндогенная природа (Suzuki et al., 1983. Fertil. Steril., 39: 683-689). Известно, что сперматозоиды морских ежей и устрицы гигантской способны превращать эстрадиол в эстрон, а тестостерон - в андростендион. Эти сведения позволяют считать, что гаметы способны продуцировать и трансформировать половые стероидные гормоны, которые, очевидно, играют важную роль в их развитии и оплодотворении. С другой стороны, большая часть авторов рассматривает половую клетку как мишень для стероидных гормонов. Полученные нами и имеющиеся в литературе сведения позволяют рассматривать половую клетку двустворчатых моллюсков и морских ежей как стероидцептивную-стероидергическую систему. Это заключение послужило основой для проведения исследований значения половых стероидных гормонов в гаметогенезе двустворчатых моллюсков и морских ежей.

3.6. Влияние половых стероидных гормонов на оогенез

Нами изучено влияние половых стероидных гормонов на оогенез на различных стадиях полового цикла у приморского гребешка и морских ежей. У приморского гребешка на стадии половой инертности через 30 сут после введения прогестерона и тестостерона масса яичника и гонадный индекс практически не меняются, но достоверно возрастают после введения эстрадиола. Во всех случаях в половых железах наблюдается увеличение числа гониев и появление ооцитов малого роста, в то время как у животных контрольной группы последние отсутствуют.

Половые железы моллюсков, взятые на стадии начала роста, содержат преимущественно ооциты, вступающие в фазу большого роста. Однократное введение эстрадиола, прогестерона и тестостерона увеличивает через 15 сут массу гонады на 20-30%, объемы ацинусов в 1,5-2 раза, а ооцитов на 30-40%. Повторное введение половых стероидных гормонов оказывает более выраженное действие на гонаду. Достоверно увеличиваются масса половой железы и гонадный индекс, объемы ацинуса и зоны, занятой половыми клетками. Объем ооцитов более чем в три раза превышает этот показатель в контроле. В половой железе присутствуют все типы клеток - от оогониев до ооцитов, закончивших рост и потерявших связь с базальной мембраной.

Половые стероидные гормоны повышают митотическую активность гониев в 2,5 раза. Наряду с этим увеличивается количество ооцитов малого роста в 2-4 раза, а ооцитов большого роста - на 55-65%. Численность пристеночнолежащих ооцитов уменьшается, а свободнолежащих увеличивается. Эти данные свидетельствуют об активации пролиферации гониев и роста ооцитов. Анализ частот распределения ооцитов по диаметру показывает, что у опытных животных отмечается большая гетерогенность и значительно более широкий разброс диаметра ооцитов. Размер половых клеток увеличивается в 1,5 раза и достигает 65 мкм, в то время как в контроле не превышает 40 мкм.

Однократное введение эстрадиола и тестостерона на преднерестовой стадии вызывает увеличение массы яичников более чем на 25%. Одновременно повышается гонадный индекс и возрастает объем ацинусов. На фоне этих показателей наблюдается интенсивный рост ооцитов, что проявляется в увеличении их объема почти в 10 раз, а ядер - в 3 раза. Формируются свободнолежащие клетки, завершающие трофоплазматический рост. Меняется картина размерных частот распределения ооцитов. Если в контроле размер ооцитов колеблется от 15 до 60 мкм, с преобладанием клеток диаметром 35-45 мкм, то тестостерон вызывает массовое появление ооцитов диаметром 75-105 мкм, а эстрадиол - 95-110 мкм.

У морских ежей однократное введение эстрадиола на стадии начала развития приводит к увеличению почти в 1,5 раза массы гонады, объема ацинусов - более чем в 3 раза, а объема половых клеток - на 30-40%. Соответственно изменяется клеточный состав гонады. Появляются крупные свободнолежащие половые клетки, третью часть которых составляют зрелые яйцеклетки, отсутствующие у животных контрольной группы. При повторном введении эстрадиола объем ооцитов увеличивается на 40-55%, в 2,5 раза возрастает объем ядер. Доля пристеночнолежащих ооцитов сокращается до 66,2%, число крупных свободнолежащих клеток, готовых к созреванию, увеличивается в 5 раз, а зрелых яйцеклеток - более чем в 2 раза.

Введение эстрадиола в период активного гаметогенеза увеличивает массу половой железы на 50%, объем ацинусов - в 3,5 раза, а объем половых клеток - в 3 раза. В ацинусах содержатся преимущественно зрелые половые клетки и небольшое число свободнолежащих ооцитов трофоплазматического роста.

Значение половых стероидных гормонов в размножении бесполоночных долгое время оставалось неизвестным. Было показано, что введение эстрадиола гигантской устрице приводит к увеличению дыхания и гликолиза в яичнике (Mori, 1968. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 34: 915-919). Позднее биохимическими методами обнаружено изменение содержания некоторых половых стероидных гормонов в ходе репродуктивного цикла у морской звезды (Schoenmakers, Dieleman, 1981. Comp. Endocrinol., 43: 915-919). После нереста уровень эстрогенов низок, их количество возрастает с началом роста ооцитов и снижается на преднерестовой стадии. Это дало авторам возможность считать, что 17 β -эстрадиол функционирует в репродуктивной системе морских звезд как половой гормон. Результаты наших исследований показывают, что половые стероидные гормоны у самок двустворчатых моллюсков и морских ежей индуцируют развитие гонады, пролиферацию и рост половых клеток.

3.7. Половые стероидные гормоны ускоряют синтез белка в яичнике

Представленные выше сведения позволяют предполагать наличие связи стероидогенеза с синтезом белка в яичнике двустворчатых моллюсков и морских ежей. Исследование синтеза белка проводили авторами радиографическими и биохимическими методами спустя 48 ч после введения эстрадиола дипропионата. Изучение радиоавтографов показывает, что у контрольных животных интенсивность включения ^3H -лейцина в ядрышко, ядро и цитоплазму пристеночных и свободнoleжащих ооцитов неодинакова (табл. 5). Наиболее интенсивно метится цитоплазма свободнoleжащих ооцитов. Число зерен серебра над ядрами составляет 50-55% их количества над цитоплазмой ооцитов, ядрышко практически не метится. Зерна серебра над цитоплазмой ооцитов распределены, как правило, небольшими группами, над ядром они сосредоточены по его периферии. Интенсивность включения ^3H -лейцина в исследуемые структуры пристеночных ооцитов была в несколько раз ниже.

Введение эстрадиола приводит к значительным изменениям белоксинтезирующей активности половых клеток приморского гребешка. Интенсивность включения ^3H -лейцина в ядро и цитоплазму ооцитов превышает контрольный уровень более чем в 3 раза, а в ядрышко - в 5-6 раз. Характер распределения метки над ооци-

тами гребешка после воздействия эстрадиола был таким же как в контроле. Блокаторы синтеза белка – пуромидин и актиномицин Д достоверно снижают интенсивность включения ^3H -лейцина в ооциты гребешков, подвергнутых воздействию эстрадиола (табл. 5). Актиномицин Д оказывает большее угнетающее действие на синтетические процессы, чем пуромидин.

Исследование белкового синтеза в яичнике приморского гребешка, определяемого по включению ^3H -лейцина с учетом проницаемости клеток для предшественника, позволяет установить различия синтетических процессов в контроле и опыте. Расчетная величина синтеза белка у контрольных животных равна 435 имп/мин. Введение эстрадиола сопровождается резким увеличением скорости синтеза белка, уровень которого соответственно превышает контрольный на 72%. Анализ изменений объема внутриклеточного фонда свободного лейцина показывает, что после введения эстрадиола его величина практически не меняется и составляет 19124, а в контроле – 20805 имп/мин соответственно. Введение эстрадиола увеличивает включение ^3H -лейцина в белки. Радиоактивность белковой фракции в данном случае равна 712, а в контроле – 398 имп/мин. Ускорение синтеза белка почти в 2 раза наблюдается при неизменной проницаемости клеток для аминокислоты и постоянном фонде внутриклеточного лейцина.

Введение в инкубационную среду блокаторов белкового синтеза приводит к угнетению синтетических процессов в яичнике. В среде с добавлением пуромидина происходит торможение включения предшественника в белки более чем в 3 раза от уровня контроля. Одновременно наблюдается уменьшение скорости синтеза белка. Пуромидин снижает интенсивность скорости синтеза белка на 52%, а актиномицин Д – на 67%. Анализ изменений внутриклеточного фонда ^3H -лейцина показывает, что его величина при введении в инкубационную среду блокаторов также уменьшается.

Таким образом, после введения эстрадиола дипропионата интенсивность включения меченого лейцина возрастает во всех изученных структурах ооцитов приморского гребешка. Увеличение белкового синтеза в ооцитах моллюска коррелирует с ускорением развития яичников и ростом половых клеток, что, очевидно, сопряжено с усилением процессов желткообразования (Зараксина, Вараксин, 1991). О возможной роли половых стероидных гормонов в вителлогенезе свидетельствуют данные, полученные на ооцитах

Таблица 5

Влияние эстрадиола дипропионата, пурамицина и актиномицина Д на включение ^3H -лейцина в ооциты приморского гребешка

Варианты опыта	Пристеночнолежащие ооциты			Свободнолежащие ооциты		
	ядрышко	ядро	цитоплазма	ядрышко	ядро	цитоплазма
I - контроль	0,4 \pm 0,05	3,6 \pm 0,4	6,4 \pm 0,6	1,2 \pm 0,08	11,2 \pm 1,0	20,6 \pm 1,9
II - эстрадиол-дипропионат	2,5 \pm 0,2*	11,9 \pm 1,0*	22,8 \pm 0,3*	5,2 \pm 0,5*	32,5 \pm 3,2*	68,2 \pm 6,9*
III - эстрадиол-дипропионат+пурамицин	1,5 \pm 0,13*	8,5 \pm 0,8*	18,6 \pm 1,6*	2,9 \pm 0,25*	22,5 \pm 2,4*	47,5 \pm 4,4*
IV - эстрадиол-дипропионат+актиномицин Д	0,6 \pm 0,06*	4,4 \pm 0,5*	7,8 \pm 0,7*	0,8 \pm 0,08*	13,3 \pm 1,1*	23,6 \pm 2,1*

Примечание. * - $p < 0,05$. Контролем для III и IV вариантов служил вариант II опыта.

морских звезд (Schoenmakers, 1981. Adv. Invert. Reprod., N.Y. etc: 127-150; Takahashi, 1982. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 48: 509-511).

Известны сведения о регуляции синтеза белка половыми стероидными гормонами в репродуктивном тракте млекопитающих. У этих животных способность гормонов оказывать биологическое действие связывают с наличием рецепторных белков. Обнаруженные в цитозоле пилорических придатков самок морских звезд специфические белки обладают высоким сродством и низкой связывающей емкостью к стероидным гормонам, что обуславливает возможное сходство механизмов действия стероидных гормонов у позвоночных и беспозвоночных животных (De Waal et al., 1982. Mar. Biol. Lett., 3: 317-323).

Анализ полученных нами данных позволяет сделать вывод, что введение эстрадиола дипропионата приморскому гребешку повышает белоксинтезирующую активность половой клетки. Одновременно нарастает интенсивность синтеза белка в яичнике. Изменение уровня синтетической деятельности клеток сопряжено с эффективным включением предшественника в белки при постоянном пуле свободной аминокислоты и не зависит от скорости поступления предшественника в клетку. Это дает основание полагать, что половые стероидные гормоны у приморского гребешка имеют прямое отношение к регуляции синтеза белковых молекул в клетках половой железы.

3.8. Влияние половых стероидных гормонов на сперматогенез

Исследование влияния эстрадиола, тестостерона и прогестерона на сперматогенез приморского гребешка показывает, что во всех случаях отмечается достоверное увеличение площади ацинусов. Сперматогонии на стадии половой инертности немногочисленны и выраженной зоны размножения и роста в ацинусах не имеется. Поэтому основными морфометрическими и цитологическими параметрами на этой стадии развития половой железы, наряду с площадью ацинусов, является плотность и состав сперматогенных клеток. При введении эстрадиола, тестостерона и прогестерона плотность сперматогониев возрастает в 2,6 4,1 и 1,6 раза соответственно. Другие клеточные элементы сперматогенного ряда в ацинусах отсутствуют.

Для определения влияния стероидных гормонов на пролиферацию гониев наиболее удобной является стадия начала гаметогенеза. В этот период идут активные процессы пролиферации, в гонаде накапливается пул сперматогониев, формирующих зону размножения и роста. После введения эстрадиола, прогестерона и тестостерона возрастает площадь ацинусов. Во всех случаях значительно увеличивается зона размножения и роста.

После завершения пролиферации сперматогониев в гонаде происходит созревание половых клеток. Введение самцам гребешка эстрадиола вызывает увеличение размеров ацинусов, при этом площадь зоны размножения и роста не меняется, но значительно, в 2,5 раза, возрастает площадь зоны формирования. Более резко меняются морфометрические параметры при введении тестостерона, что выражается в увеличении зоны формирования в 3 раза. Сперматогонии единичны, но почти в 2 раза после действия гормонов возрастает плотность сперматоцитов II. Меняется клеточный состав зоны формирования. После введения эстрадиола в зоне формирования появляются средние (7%) и поздние (3%) сперматиды, а после введения тестостерона их доля увеличивается до 23 и 17% соответственно.

Литературные данные о физиологической значимости половых стероидных гормонов у самцов двустворчатых моллюсков, как и у других беспозвоночных, крайне ограничены. Известно, что введение тестостерона, прогестерона и эстрогена виноградной улитке приводит к накоплению в овотестисе в основном сперматоцитов II, в то время как I9-нортестостерон, наряду со сперматоцитогенезом, активизирует формирование сперматозоидов (Scaba, Bierbauer, 1979, 1981. *Acta Biol. Med. Germ.*, 38: 1145-1148, *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 32: 15-18). Полученные нами сведения позволяют считать, что половые стероидные гормоны - эстрадиол, тестостерон и прогестерон вызывают пролиферацию сперматогониев в семенниках приморского гребешка как на стадии относительной половой инертности, так и на стадии начала гаметогенеза. Их действие особенно четко проявляется на стадии начала гаметогенеза, когда плотность гониев в ацинусах семенника увеличивается в несколько раз. Отсутствие сперматоцитов I свидетельствует о том, что половые стероидные гормоны не вызывают их созревания. Напротив, введение эстрадиола, тестостерона и прогестерона способствует накоплению в ацинусах сперматоцитов II

Формирование сперматид тоже ускоряется после введения гормонов, особенно тестостерона, который приводит к увеличению в ацинусах количества поздних сперматид и сперматозоидов.

У морских ежей тестостерон и эстрадиол также оказывают стимулирующее действие на развитие половой железы. Масса гонады возрастает почти на 50%, одновременно увеличиваются гонадный индекс и размеры фолликулов. Их объем при действии тестостерона возрастает почти в 2, а эстрадиола - более чем в 2 раза. Цитологические наблюдения показывают, что в зоне размножения и роста возрастает число редукционных делений в сперматогенных клетках, что приводит к образованию большого числа сперматоцитов II. Увеличение зоны формирования происходит за счет накопления сперматид и, главным образом, сперматозоидов.

Сходные данные были получены при инъекции эстрадиола и эстрогена самцам морских звезд (Takahashi, 1982. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 48: 509-511) и при действии тестостерона ацетата на креветок (Nagabhushanam, Kulkarni, 1981. Aquaculture, 23: 19-27). Увеличение размеров ацинусов, объемов зоны размножения и роста, зоны формирования, накопление сперматоцитов II и сперматозоидов у исследованных нами морских ежей после действия стероидных гормонов согласуется с данными, полученными нами на двустворчатых моллюсках. Таким образом, у самцов морских ежей, как и двустворчатых моллюсков, половые стероидные гормоны влияют, главным образом, на пролиферацию сперматогониев, созревание сперматоцитов II и спермиогенез.

3.9. Созревание ооцитов

3.9.1. Влияние серотонина на реинициацию мейоза в ооцитах двустворчатых моллюсков

Созревание ооцитов у большинства беспозвоночных и позвоночных животных блокируется на стадии профазы мейоза I. В таком состоянии они могут оставаться долгое время и затем возобновлять мейоз в ответ на экстраклеточный сигнал. Этот процесс включает разрушение зародышевого пузырька, конденсацию хромосом и образование веретена деления. Позднее выделяется первое полярное тельце и развитие ооцитов вновь блокируется на стадии метафазы II как, например, это происходит у большинства млекопитающих, амфибий и рыб. У морских звезд мейоз после

гормональной стимуляции претерпевает все стадии до полного завершения, а у некоторых беспозвоночных он вновь блокируется в метафазе I. Реинициация мейоза после второго блока и активация ооцита к последующему развитию вызывается оплодотворением (Eckberg, 1988. *Biol. Bull.*, 174: 95-108; Guerrier et al., 1990. *Int. J. Dev. Biol.*, 34: 93-109).

Созревание половой клетки тесно скоррелировано с овуляцией и нерестом. Ведущим фактором, вызывающим разблокировку мейоза и овуляцию ооцита у млекопитающих, амфибий и рыб, является гонадотропный гормон. У иглокожих сходным по значению с гонадотропным гормоном позвоночных выступает гонадостимулирующее вещество. Оно выделено из радиальных нервов морских звезд, является пептидом с молекулярной массой около 2100 дальтон, однако его структура не расшифрована. У заднежаберных моллюсков первичным стимулом, вызывающим реинициацию мейоза и экстрюзию гамет, является гормон овуляции, регуляторный пептид, синтезируемый нейросекреторными клетками париетовисцерального ганглия. Подобный по химической структуре и биологическому действию регуляторный пептид найден у заднежаберных и легочных брюхоногих моллюсков. У двустворчатых моллюсков также выделен гонадотропный регуляторный пептид с неизвестной пока структурой, вызывающий разрушение зародышевого пузырька (Fang et al., 1985. *Acta Oceanol. Sin.*, 4: 107-112). Ранее мы наблюдали усиленное выведение нейросекреторного материала из нейросекреторных клеток у двустворчатых моллюсков перед нерестом. За несколько дней до нереста почти все клетки освобождаются от нейросекрета, который локализуется в нервных волокнах. В гонаде этих животных описаны пептидергические терминали, содержащие гранулы неодинакового размера и разной плотности, которая меняется, очевидно, по мере секреции материала в ткани органа или его сосудистую систему (Мотавкин, Вараксин, 1983). Наличие таких аксонов среди коллагеновых волокон и мышечных клеток гонады подтверждает участие гонадотропного регуляторного пептида в созревании яйцеклеток и нересте у этих животных.

Гормональная индукция реинициации мейоза является многоступенчатым процессом. У рыб и амфибий действие гонадотропного гормона опосредуется синтезом в фолликулярных клетках стероидных гормонов, вызывающих созревание ооцита (Nagahama, 1987. *Devel. Growth Differ.*, 29: 1-12). У морских звезд гонадо-

стимулирующий регуляторный пептид стимулирует синтез в фолликулярных клетках мейозиндуцирующего вещества - I метиладенина.

У двустворчатых моллюсков таким мейозиндуцирующим фактором, очевидно, является серотонин. Добавление серотонина к взвеси яйцеклеток дозозависимо индуцирует разрушение зародышевого пузырька в ооцитах спизулы сахалинской. Количество яйцеклеток с разрушенным зародышевым пузырьком значительно возрастает при концентрации серотонина в инкубационной среде выше 0,1 мкм (рис. 2). Разрушение зародышевого пузырька в ооцитах спизулы сахалинской после их активации серотонином протекает, по-видимому, с участием ионов кальция. Так ли это происходит в природе? Ответить на этот вопрос помогло исследование механизмов этого процесса.

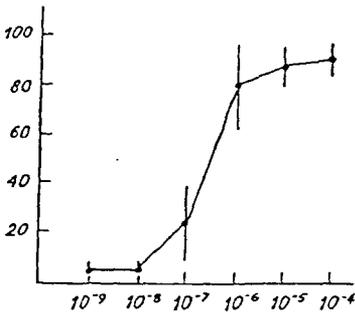


Рис. 2. Влияние серотонина на разрушение зародышевого пузырька в ооцитах спизулы сахалинской. По оси абсцисс - концентрация серотонина, в М; по оси ординат - доля яйцеклеток с разрушенным зародышевым пузырьком, в %.

3.9.2. Изучение ионных механизмов внутриклеточной сигнализации при индукции реинициации мейоза серотонином

При добавлении серотонина к ооцитам спизулы сахалинской наблюдается увеличение содержания свободного кальция в цитозоле (рис. 3). Нарастание концентрации $[Ca^{2+}]$ и происходит в течение первых 5-6 мин при температуре 18-20°C. После быстрой фазы наступает медленная фаза роста, продолжающаяся около 20 мин, после чего концентрация $[Ca^{2+}]$ и вновь уменьшается.

Для ответа на вопрос - принимает ли участие внутриклеточное депо кальция в формировании $[Ca^{2+}]$ и сигнала, были проведены опыты на ооцитах, окрашенных хлортетрациклином. Как видно из рисунка 4, серотонин вызывает выброс Ca^{2+} из внутрикле-

точных структур, очевидно, в первую очередь, из эндоплазматического ретикулума. Выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума происходит в течение 5-6 мин, что соответствует быстрой фазе роста $[\text{Ca}^{2+}]_i$, наблюдаемой на рисунке 5. Затем происходит медленный рост флуоресценции хлортетрациклина, что отражает возвращение Ca^{2+} в эндоплазматический ретикулум и, примерно, через 42 мин уровень Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме достигает исходного. Таким образом, внутриклеточное депо половой клетки вновь заполняется кальцием и только после этого времени она будет готова к восприятию следующего сигнала.

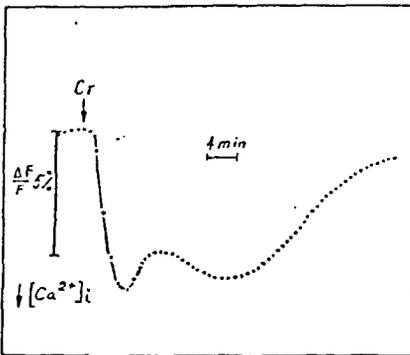


Рис. 3. Изменение концентрации свободного Ca^{2+} в ооцитах спизулы сахалинской под действием серотонина, измеренное по флуоресценции Indo-1. Уменьшение флуоресценции соответствует росту $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Возбуждение - 365 нм, регистрация - 490 нм.

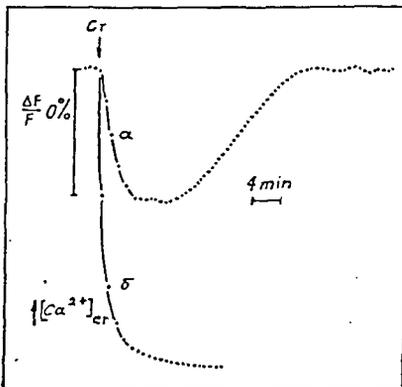


Рис. 4. Изменение концентрации Ca^{2+} во внутриклеточных структурах ооцита спизулы сахалинской под действием серотонина, измеренное по флуоресценции хлортетрациклина. Уменьшение флуоресценции соответствует выходу Ca^{2+} из депо. а - клетки не отмыты от хлортетрациклина; б - клетки отмыты от внешнего хлортетрациклина. Возбуждение - 405 нм, регистрация - 530 нм.

Известно, что при активации рецепторов, сопряженных с фосфоинозитидной системой внутриклеточной передачи сигнала, происходит не только мобилизация Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, но также активируется Na^+/H^+ -обмен, что приводит

к увеличению pH_i цитозоля клетки. С помощью флуоресцентного индикатора pH_i показано, что серотонин вызывает быстрое защелачивание цитозоля в течение 14 мин. Затем pH_i снижается даже ниже исходного уровня (рис. 5). При добавлении ингибиторов Na^+/H^+ -обмена защелачивания цитоплазмы ооцита мы не наблюдали.

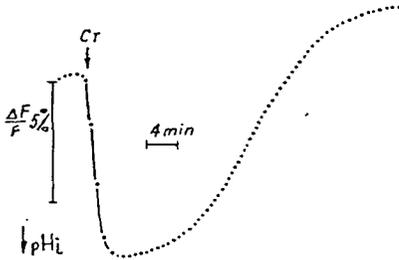


Рис. 5. Изменение pH_i в ооцитах спизулы сахалинской под влиянием серотонина, измеренное по флуоресценции 2',7'-бискарбокситил-5(6)-карбоксифлуоресцеина. Возбуждение - 436 нм; регистрация - 530 нм.

3.9.3. Действие некоторых полиненасыщенных жирных кислот и их метаболитов на реинициацию мейоза

У многих беспозвоночных найдены эйкозаноиды - продукты окислительного метаболизма полиненасыщенных жирных кислот и прежде всего С-20 кислот (Ruggeri, Throughgood, 1985. Mar. Ecol. Progr. Ser., 23: 301-306). В половой железе двустворчатых моллюсков выявлены простагландины и гидроксикислоты. Содержание некоторых из них в значительной степени меняется на протяжении репродуктивного цикла и достигает максимума к началу нереста (Ono et al., 1982. Mar. Biol. Lett., 3: 223-230; Ruggeri, Throughgood, 1985. Prostagland. Leukotrien. Med., 20: 69-77). Мейджер с соавторами (Meijer et al., 1986. Dev. Biol., 114: 22-32) показали, что липоксигеназные метаболиты полиненасыщенных жирных кислот индуцируют созревание ооцитов у морских звезд. Кажется естественным предположение, что индуцированное серотонином разрушение зародышевого пузырька протекает с участием метаболитов полиненасыщенных жирных кислот, которые выступают в качестве вторичных мессенджеров внутриклеточной передачи сигнала с серотонинового рецептора.

Добавление к суспензии ооцитов ключевых жирных кислот (п-6) серии - линолевой и арахидоновой индуцирует разрушение зародышевого пузырька аналогично действию серотонина. Эйкозопентаеновая и докозогексаеновая кислоты, относящиеся к (п-3) серии, не вызывают реинициацию мейоза (рис. 6). 5-липо-

кислородные производные - 5-гидроксиэйкозатетраеновая и 5-гидроксиэйкозапентаеновая кислоты действуют таким же образом как и их соответствующие метаболитические предшественники - арахидоновая кислота и эйкозапентаеновая кислота (рис. 7). Другие жирные кислоты - 5,6-дегидроарахидоновая, арахидиновая, октадекапентаеновая не вызывают реинициацию мейоза. Специфический ингибитор липоксигеназного пути окисления полиненасыщенных жирных кислот нордигидрогуаретиковая кислота блокирует разрушение зародышевого пузырька. После ее добавления к взвеси ооцитов до конечной концентрации 10-20 мкМ разрушение зародышевого пузырька, стимулированное серотонином или ионофором A23187, не происходит.

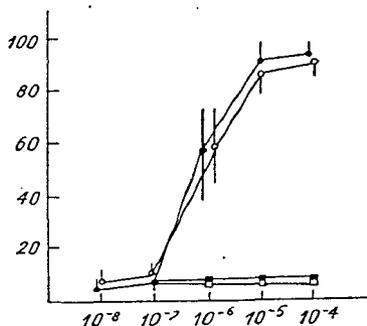


Рис. 6. Влияние некоторых полиненасыщенных жирных кислот (n-6) и (n-3) серий на разрушение зародышевого пузырька в ооцитах спизулы сахалинской. Ооциты были обработаны арахидоновой (светлые кружки), линолевой (темные кружки), эйкозапентаеновой (светлые квадраты) и докозагексаеновой (темные квадраты) кислотами. По оси абсцисс - концентрация, в М; по оси ординат - доля ооцитов с разрушенным зародышевым пузырьком, в %.

Серотонин содержится в нервной системе, половой железе и целомической жидкости двустворчатых моллюсков (Деридович, Хотимченко, 1988. Биол. моря, 5: 3-16). Гистофлуоресцентными и иммуногистохимическими методами показано распределение серотонинергических нейронов в ганглиях и иннервация серотонинергическими нервными волокнами оболочки, стенки ацинусов и половых протоков гонады некоторых видов этих животных (Вараксин и др., 1983; Matsutani, Nomura, 1986. Cell Tissue Res., 244: 515-517). Эти сведения, а также дозозависимый характер действия серотонина на разрушение зародышевого пузырька и недавнее

сообщение о наличии серотониновых рецепторов на поверхности ооцитов спизулы (Kadam et al., 1988. Biol. Bull., 175: 310) дают основание считать, что серотонин в данном случае играет роль нейрогормона и является эндогенным фактором реинициации мейоза у двустворчатых моллюсков.

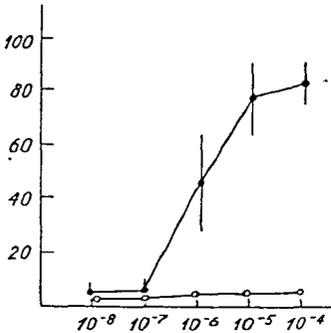


Рис. 7. Влияние 5-гидроксиэйкозатетраеновой (темные кружки) и 5-гидроксиэйкозапентаеновой (светлые кружки) жирных кислот на разрушение зародышевого пузырька в ооцитах спизулы сахалинской.

По оси абсцисс — концентрация, в М; по оси ординат — доля ооцитов с разрушенным зародышевым пузырьком, в %.

Известно, что реинициация мейоза у морских звезд вызывается липоксигеназным производным арахидоновой 5,8,11,14-20:4 кислоты — 8-гидрокси-5,9,11,14-эйкозатетраеновой кислотой. Другие жирные кислоты, в структуре которых имеются двойные связи в положении 5,8,11-углеродного скелета, также способны вызывать реинициацию мейоза у этих животных, при этом наличие двойной связи при С-8 абсолютно необходимо для проявления биологической активности. Гораздо меньшую активность в отношении реинициации мейоза у морских звезд проявляют кислоты с двойными связями при 6,9,12 атомах углерода (Meijor et al., 1986. Prostagl. Leukotrien. Med., 23: 179-184). Однако не все иглокожие отвечают созреванию ооцитов на действие 8(R)-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты и эти различия являются доказательством того, что яйцеклетки беспозвоночных могут иметь липоксигеназы с различной специфичностью.

Можно полагать, что действие серотонина, линолевой кислоты, арахидоновой кислоты и ее окисленного метаболита 5-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты на разрушение зародышевого пузырька у двустворчатых моллюсков сопряжены друг с другом. Это взаимодействие, очевидно, осуществляется в половой клетке на уровне внутриклеточных механизмов трансдукции сигнала. Наличие на поверхности ооцита спизулы серотониновых рецепторов дает

основание считать, что серотонин оказывает влияние непосредственно на мембранные рецепторы половой клетки. Известно, что одним из молекулярных механизмов действия серотонина на эффекторную клетку является активация аденилатциклазной системы (Sonetti et al., 1987. *Neurochem. Int.*, 11: 119-126). В другом случае в качестве вторичного мессенджера выступает Ca^{2+} , который регулирует в клетке многие формы активности, в частности, фосфолипидзависимую протеинкиназу (Berridge, 1985. *Triangle*, 24: 79-90; Eckberg, 1988. *Biol. Bull.*, 174:95-108).

В яйцеклетках спизулы сахалинской, образующийся после добавления серотонина Ca^{2+} , очевидно, активируя Ca^{2+} -зависимую фосфолипазу A_2 , приводит к образованию свободной арахидоновой кислоты из фосфолипидов мембран, а затем ее липоксигеназных метаболитов и, в конечном итоге, вызывает разрушение зародышевого пузырька. Такой путь реинициации мейоза описан у некоторых видов морских звезд. Другой возможный способ образования пула арахидоновой кислоты в клетке связан с влиянием Ca^{2+} на активность инозитолспецифической фосфолипазы C с образованием диацилглицерина, который, в свою очередь, гидролизуется диглицеридацилгидролазой с образованием арахидоновой кислоты. Мы не располагаем данными какой из двух выше указанных путей преобладает у двустворчатых моллюсков. Однако только экзогенная Ca^{2+} -активируемая фосфолипаза C вызывает созревание ооцитов у морских звезд (Meijer et al., 1984. *Dev. Biol.*, 106: 368-378).

Таким образом, полученные нами и имеющиеся в литературе сведения дают основание считать, что реинициация мейоза у двустворчатых моллюсков инициируется гонадостимулирующим регуляторным пептидом. Серотонин у этих животных подобно 1-метиладенину у иглокожих, является мейозиндуцирующим веществом. Передача сигнала с серотонинового рецептора в клетку происходит по Ca^{2+} -фосфоинозитидзависимому пути. Активным участником механизмов усиления рецепторзависимых внутриклеточных сигналов является метаболит арахидоновой кислоты - 5-гидроксиэйкозатетраеновая кислота.

3.10. Нерест

Как было отмечено выше, нерест у двустворчатых моллюсков стимулируется гонадотропным регуляторным пептидом. Его влияние на овуляцию и нерест опосредуется у животных различных уровней

развития веществами разной химической природы. Так, если у морских звезд I-метилденин одновременно с созреванием ооцитов вызывает нерест у этих животных, то у двустворчатых моллюсков таким промежуточным индуктором является серотонин.

Действительно, еще 30 лет назад было предположено, что серотонин принимает участие в нересте у моллюсков (Mann, 1963. *Nature*, 199: 1066-1067). Задачей настоящей работы явилось исследование влияния серотонина на стимуляцию нереста у двустворчатых моллюсков, выяснение некоторых механизмов его действия и разработка удобного способа стимуляции нереста у этих животных. Основные опыты проведены на приморском гребешке в конце апреля - начале мая до начала нереста моллюсков в естественных условиях. Повышение температуры воды в аквариумах, содержащих акклиматизированных к нерестовой температуре воды животных, до 15°C приводит к вымету гамет у самцов приморского гребешка через 4 ч, а у самок - через 6 ч после начала стимуляции. У животных без предварительной акклиматизации нерест начинается позднее. Введение серотонина приводит к резкому сокращению времени, необходимого для стимуляции нереста. Так, у самцов нерест начинается через 10-20 мин, а у самок - через 30-50 мин после инъекции. У неакклиматизированных животных в преднерестовый период после инъекции серотонина нерест у самок не происходит в течение 24 ч, хотя у самцов он протекает в те же сроки, что и у акклиматизированных животных. Во второй половине мая, когда в природе начинается естественный нерест моллюсков, а температура воды поднимается до 10-12°C, нерест как у самцов, так и у самок легко вызывается инъекцией серотонина.

Развитие эмбрионов и личинок после оплодотворения гамет, полученных с помощью обоих методов, протекает сходным образом. Выделение полярных телец происходит через 3-4 мин. Через 1-1,5 ч начинается первое деление, а второе - через 14-15 ч. Вращение зародышей в культуре отмечается через 17 ч после оплодотворения, а массовое всплытие происходит через 20-22 ч. Характерная для двустворчатых моллюсков асинхронность развития на ранних стадиях утрачивается к этому периоду. Спустя три суток основная масса личинок в обеих культурах находится на стадии прямозамкового велигера. Личинки активно плавают и питаются. Первые великонхи, которые легко идентифицировать по образованию макушки, появляются в культурах на девятые сутки развития. На 16-20-е

сутки развития в культурах большинство личинок находится на стадии развитого великонха. Отклонений в развитии при этом не наблюдается. У великонхов в обеих культурах имеются хорошо сформированные внутренние органы, идет образование ноги. Педивелигеры размером 250 мкм появляются в культурах на 28-е сутки развития. Они передвигаются с помощью хорошо сформированной ноги, однако не утрачивает способности к плаванию. Выживаемость личинок не зависит от метода стимуляции нереста и составляет от I до 2% (Вараксин, Найденко, 1989).

Использование инъекций серотонина для стимуляции нереста у других двустворчатых моллюсков в преднерестовый период дает сходные положительные результаты. Представляет, например, особый интерес выяснение возможности использования серотонина для стимуляции нереста у мидии Грея, у которой долгое время не удавалось получить массового вымета гамет с помощью существующих методов (Дроздов и др., 1983. Биол. мидии Грея. М.: Наука, с. 35-41). В этой работе авторы сообщают, что при использовании 0,5 М раствора хлористого калия или при надрезании гонады они получали небольшое количество гамет, однако при этом образовывалось много отходов в виде незрелых ооцитов и обрывков соединительной ткани. Инъекция 0,25 мл 0,001 М раствора серотонина креатинин-сульфата вызывает массовый вымет гамет как у самцов, так и у самок мидии Грея. Степень оплодотворения полученных гамет высока; развитие эмбрионов и личинок не отличается от описанного ранее. В полученной нами культуре развитие оплодотворенных яйцеклеток прослежено до стадии великонха. При этом отмечается отсутствие отклонений в развитии эмбрионов и личинок и их высокая выживаемость (Найденко, Вараксин, 1983).

Это дает основание считать, что серотонин, подобно I-метиладенину у иглокожих, является природным посредником действия гонадостимулирующего гормона как на созревание гамет, так и нерест у двустворчатых моллюсков.

3.II. Эмбриональное развитие

3.II.I. Регуляторные пептиды участвуют в регуляции эмбрионального и личиночного развития

Очевидно, способность к синтезу регуляторных пептидов, как и некоторых других биологически активных соединений, сохраняется после оплодотворения и проявляется уже на ранних ста-

диях эмбрионального развития. Это предположение основывается на ряде сведений, а именно: 1) регуляторные пептиды продуцируются клетками различных типов, а не только секреторными; 2) регуляторные пептиды возникли на очень ранних стадиях эволюционного развития; 3) они многочисленны и широко распространены в природе; 4) рецепторы к регуляторным пептидам находят на клетках различных типов; 5) один и тот же пептид и его рецепторы могут функционировать на различных этапах жизненного цикла, при этом его функции могут меняться; 6) предимплантационные зародыши млекопитающих способны переживать "in vitro" в простых культуральных средах, но их развитие значительно замедлено по сравнению с этим процессом, протекающим "in vivo". Эти данные априори свидетельствуют в пользу участия гормонов пептидной природы в регуляции ранних стадий эмбрионального развития.

Показано, что эмбрионы на ранних стадиях развития продуцируют инсулин. Предимплантационные зародыши мышей способны к рецепторно опосредованному связыванию инсулина, начиная с восьмиклеточной стадии (Neuner et al., 1989. Dev. Biol., 134: 48-58). Типичные инсулиновые рецепторы широко распространены в эмбрионах различных видов птиц, а у эмбрионов цыплят найдены рецепторы к инсулиноподобному фактору роста. Эндогенные полипептидные стимуляторы роста найдены в зародышах вьюна, а предимплантационные зародыши мышей продуцируют гомологи эпителиального фактора роста и фактора роста фибробластов (Rappolee et al., 1988. Science, 241: 1823-1825).

Клонирование ДНК рецептора фактора роста фибробластов показало наличие мРНК этого рецептора в зародышах амфибий, а недавно рецепторы, специфически связывающие трансформирующий фактор роста, найдены в ранних зародышах вьюна. Авторы отмечают исключительно широкую распространенность трансформирующего фактора роста и его рецепторов в тканях млекопитающих, в том числе и на ранних стадиях эмбрионального развития (Стойка и др., 1993. Онтогенез, 24: 38-42).

В эмбрионах морских ежей идентифицирована мРНК, кодирующая белок, сходный по структуре с эпидермальным фактором роста позвоночных (Yang et al., 1989. Science, 246: 806-808). Ранее нами было показано наличие энкефалиноподобного материала в оогониях и ооцитах двустворчатых моллюсков и морских ежей. Центры

связывания опиатов, предполагаемые эндогенные лиганды и специфическое связывание опиатного антагониста налоксона с мембранами обнаружены в ооцитах амфибий (Бакалкин и др., 1984. Биохимия, 49: 883-888).

Приступая к выполнению настоящей работы, мы исходили из предположения, что способность к синтезу опиоидных пептидов сохраняется после созревания и оплодотворения половой клетки и проявляется уже на ранних стадиях эмбрионального развития. Для доказательства этого предположения использовали культуру дробящихся зародышей черного морского ежа, являющуюся удобным и широко применяемым тест-объектом при исследовании биологического действия различных химических соединений на эмбриональное развитие. Через 5 мин после оплодотворения в культуру развивающихся зародышей добавляли блокатор опиатных рецепторов налоксон. На стадиях двух бластомеров, средней бластулы, поздней гастролы и плутеуса учитывали доли нормальных и аномальных зародышей и выявляли наиболее характерные отклонения в развитии. Кроме этого, определяли чувствительность бластулы и гастролы к различным концентрациям налоксона после его добавления в культуру.

Уже на стадии двух бластомеров отмечается дозозависимое торможение развития эмбрионов и увеличение числа аномалий. Среди последних наиболее часто встречаются неразделившиеся оплодотворенные яйцеклетки, зародыши с врезавшейся бороздой дробления и неправильной формой бластомеров (рис. 8). На стадии бластулы число аномальных эмбрионов возрастает, их доля при концентрации налоксона, равной 25 мкг/мл, достигает 100%. Среди аномалий у зародышей, развивающихся в среде с концентрацией налоксона 5 и 25 мкг/мл, преобладают неразделившиеся и разрушающиеся оплодотворенные яйцеклетки, зародыши с неправильной формой и расположением бластомеров, неравномерным дроблением. Эмбрионы, развивающиеся в среде с концентрацией налоксона 0,5 мкг/мл, имеют строение нормальных бластул, однако часть из них лишена оболочки оплодотворения, тогда как в контроле последние на этой стадии имеются (рис. 8; 2, 4, 5, 7-9). Такие аномально развивающиеся зародыши не проходили стадию выдупления, не всплывали и в дальнейшем погибали.

Всплывшие личинки достигают стадии гастролы. При концентрации налоксона 0,5 мкг/мл видимых аномалий не наблюдается,

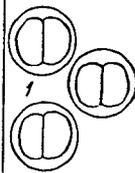
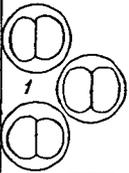
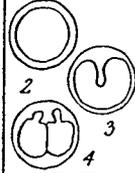
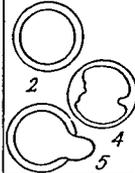
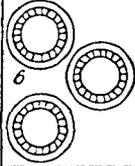
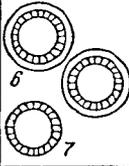
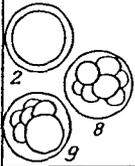
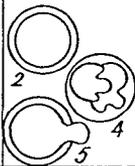
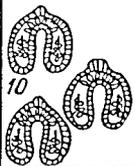
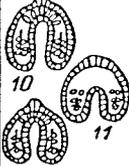
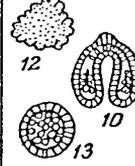
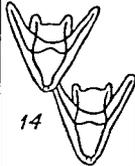
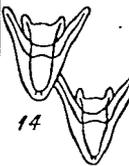
СТАДИЯ РАЗВИТИЯ	КОНЦЕНТРАЦИЯ НАЛОКСОНА В МКГ/МЛ			
	КОНТРОЛЬ	0,5	5	25
2 БЛАСТОМЕРА				
СРЕДНЯЯ БЛАСТУЛА				
ПОЗДНЯЯ ГАСТРУЛА				ГИБЕЛЬ
ПЛУТЕУС			ГИБЕЛЬ	ГИБЕЛЬ

Рис. 8. Развитие морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и характерные аномалии при действии различных концентраций налоксона. I - нормальные двубластомерные зародыши, 2 - недробящиеся оплодотворенные яйцеклетки, 3 - врезакшая борозда дробления, 4 - неправильная форма яйцеклеток и бластомеров, 5 - разрушающиеся оплодотворенные яйцеклетки, 6 - нормальная бластула, 7 - бластула без оболочки оплодотворения, 8 - зародыши с неправильным расположением бластомеров, 9 - зародыши с неравномерным дроблением, 10 - нормальные поздние гастрюлы, 11 - средняя гастрюла, 12 - погибшие зародыши, 13 - паренхималообразные зародыши, 14 - нормальные плутеусы.

однако часть личинок отстает в развитии, их архентерон доходит лишь до середины бластоцеля. Большая часть личинок, развивающихся в среде с концентрацией налоксона 5 мкг/мл, к стадии поздней гаструлы погибает, а меньшая была представлена уродливыми паренхимулообразными зародышами, и лишь единичные особи имеют строение нормальных бластул (рис. 8; 10-13). При концентрации налоксона 25 мкг/мл все личинки к стадии поздней гаструлы погибают. На стадии плутеуса нормальные личинки были обнаружены в контроле и в среде с концентрацией налоксона, равной 0,5 мкг/мл. При концентрации налоксона 5 и 25 мкг/мл личинки до этой стадии не развиваются.

Чувствительность зародышей при добавлении в культуру дробных концентраций налоксона на стадиях бластулы и гаструлы неодинакова (рис. 9). Гаструла почти в два раза более чувствительна к действию блокатора, чем бластула (Вараксин и др., 1990).

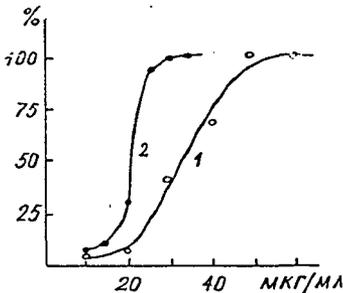


Рис. 9. Изменение чувствительности бластулы (1) и гаструлы (2) к различным концентрациям налоксона.

Абсцисса — концентрация налоксона, ордината — доля зародышей с блокированным и аномальным развитием.

Таким образом, опийный антагонист налоксон уже со стадии двух бластомеров дозозависимо тормозит дробление и развитие зародышей морского ежа и вызывает появление аномалий различных морфологических типов, а чувствительность зародышей к налоксону по мере их развития меняется. Это указывает на участие опиоидных пептидов в регуляции эмбриогенеза. Помимо опиоидных пептидов в ранних эмбрионах животных обнаружены другие биологически активные вещества.

3.11.2. Стероиддегидрогеназы и половые стероидные гормоны локализованы в зародышах и личинках морских ежей

Выше была описана локализация ферментов стероидогенеза и стероидных гормонов в половых и вспомогательных клетках гонады и значение последних в гаметогенезе двустворчатых моллюсков и

морских ежей. Логично допустить, что способность к синтезу стероидных гормонов сохраняется после оплодотворения и проявляется на ранних стадиях эмбрионального развития.

Цитохимическими методами нами показано наличие и локализация 3 β - и 17 β - гидроксистероиддегидрогеназ в оплодотворенных яйцеклетках, эмбрионах на стадиях 2-х и 32-х бластомеров, средней бластулы, личинках на стадиях гастрюлы и плутеуса. В зиготе гранулы диформазана равномерно распределены по цитоплазме, их плотность невысока, но больше чем в неоплодотворенной яйцеклетке. Оболочка оплодотворения не содержит продуктов реакции. У дву- и четырехклеточных эмбрионов активность ферментов повышается. На стадии 32-х бластомеров, после завершения периода синхронных дроблений, отмечается дальнейшее повышение активности ферментов. Гранулы диформазана располагаются в бластомерах и не найдены в микромерах. С началом гастрюляции активность ферментов снижается. 3 β - и 17 β - гидроксистероиддегидрогеназы сосредоточены в области первичной кишки. На стадии плутеуса невысокая активность ферментов найдена на вершине оральной лопасти, в области желудка и, в меньшей степени, на апикальном конце личинки.

Иммуноцитохимическая локализация эстрадиола-17 β подтверждает эти данные. Комплекс эстрадиола с антителами образуется на всех исследуемых стадиях, но уровень люминесценции и локализация комплекса в эмбрионах и личинках неодинаковы. У 4-х и 8-клеточных эмбрионов люминесценция выше, чем в неоплодотворенной яйцеклетке, что, очевидно, обусловлено увеличением внутриклеточного содержания эстрадиола. В бластомерах наблюдается равномерное распределение люминесцирующего комплекса антиген-антитело. Сходная по интенсивности и гомогенная люминесценция клеток выявляется на стадии бластулы. С началом гастрюляции интенсивность свечения возрастает и меняется характер его распределения. Флюоресценция наблюдается в области первичной кишки и в прилегающих участках вегетативного полюса, а на стадии плутеуса - в области желудка, по краю оральной лопасти и, в меньшей степени, на анимальном конце личинки.

О присутствии 3 β - и 17 β - гидроксистероиддегидрогеназ и ряда других ферментов стероидогенеза в предьмплантационных эмбрионах млекопитающих сообщено в отдельных работах (Nimura et al., 1980. Jap. J. Zootech. Sci., 51: 191-196). Активность

ферментов стероидогенеза на ранних стадиях развития довольно высока и возрастает после инъекций хорионического гонадотропина (Tsutsumi et al., *Folia Endocrinol. Jap.*, 58: 1321-1322). Более того, по содержанию серотониноподобных веществ, катехоламинов, ацетилхолина, способных выполнять на этих стадиях онтогенеза ряд функций, а также по уровню чувствительности к антагонистам трансммиттеров и основным характеристикам рецепторных структур, ооциты и ранние зародыши как беспозвоночных так и позвоночных животных сходны между собой.

В ооцитах жабы и вьюна описано наличие высокоаффинного связывания лигандов опиатных рецепторов и эндогенные опиоидные вещества, способные реагировать с каппа-опиатными рецепторами (Бакалкин и др., 1984. *Биохимия*, 49: 883-888 ; Яковлев и др., 1986. *Докл. АН СССР*, 286: 1718-1721). Эти сведения подтверждаются иммуноцитохимическим выявлением лей- и метэнкефалинов в оогониях, ооцитах и сперматогенных клетках двустворчатых моллюсков, морских ежей и некоторых других беспозвоночных. Мет- и лейэнкефалины без различий в их локализации обнаружены в первичных и вторичных сперматогониях и сперматоцитах I у крыс (Engelhardt et al., 1986. *Arch. Androl.*, 17: 49-56). Опиатные сигма-рецепторы найдены также на ранних стадиях развития зародышей вьюна и, очевидно, вовлечены в регуляцию морфогенеза (Калужный и др., 1986. *Докл. АН СССР*, 290: 974-978 ; Калужный и др., 1987. *Биохимия*, 52:335-341; Калужный и др., 1989. *Бюл. экспер. биол. мед.*, 108: 622-624). Таким образом, в наличии медиаторных веществ, опиоидных пептидов, стероидных гормонов, соответствующих им рецепторных центров и их характеристиках в половых клетках и ранних зародышах имеется ряд общих признаков.

Результаты наших исследований наличия и локализации ферментов стероидогенеза и половых стероидных гормонов в яйцеклетках, эмбрионах и личинках морских ежей укладываются в отмеченную закономерность. Известно, что как у беспозвоночных, так и позвоночных животных существует тесная взаимосвязь между обменом биогенных аминов, стероидных и пептидных гормонов (Venturini et al., 1986. *Handbook Comp. Opioid Relat. Neuropeptide Mechanisms*, V. 1, p. 245-254; Бузников, 1987. *Нейротрансмиттеры ...*, М.: Наука. 232 с.). Предполагается, что стероидные гормоны и регуляторные пептиды, выявленные в половых клетках и на ранних стадиях эмбрионального развития, взаимодействуя с други-

ми биологически активными веществами, играют важную роль в росте и созревании ооцитов, оплодотворении, дроблении и эмбриональном развитии.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что исследованные животные обладают развитой пептидергической нейросекреторной системой. Получены цитологические доказательства связи нейросекреции с половой активностью, которые основываются на наблюдении сочетанных во времени гистофизиологических процессов в гонаде и нервных ганглиях, положительной корреляции между секреторной активностью нейронов и гонадогенезом и пептидергической иннервации гонады двустворчатых моллюсков и морских ежей, то есть наличия прямых путей доставки пептидных гормонов к месту их действия. Иммуноцитохимическими методами в нервной системе двустворчатых моллюсков локализованы энкефалин-, вещество Р-, ФМР-амид- и морфогениммунореактивные нейроны, а в нейропиле, комиссурах и коннективах - мелкие нервные волокна, иммунореактивные к тем же пептидам. Найдено, что содержание некоторых из идентифицированных регуляторных пептидов подвержено сезонным изменениям и они оказывают влияние на размножение. Так, пептидный морфоген при введении животным ускоряет пролиферацию гониев, созревание ооцитов I начала профазы мейоза и образование ооцитов малого роста.

Выявлено, что влияние регуляторных пептидов на пролиферацию гониев опосредуется простагландинами. Известно, что у позвоночных животных простагландины угнетают пролиферацию клеток при действии пептидных митогенов. Введение двустворчатым моллюскам индометацина увеличивает плотность сперматогониев в ацинусах. Арахидоновая кислота угнетает пролиферацию, а совместное введение с ней индометацина устраняет этот эффект. Наиболее выраженное ингибирующее влияние характерно для простагландина E_2 . Очевидно, свойство простагландинов угнетать пролиферацию клеток проявляется у двустворчатых моллюсков и их следует рассматривать как гормоны аутокринного или паракринного действия.

При исследовании механизмов действия пептидного морфогена было найдено, что он повышает обмен половых стероидных гормонов. В период пролиферации гониев пептидный морфоген в значительной степени увеличивает активность 5α -редуктазы. По мере завершения

пролиферации уровень превращения тестостерона в 5 α -восстановленные метаболиты под влиянием пептидного морфогена снижается. Это дает основание полагать, что влияние регуляторных пептидов на оо- и сперматогенез связано со стероидными гормонами.

Нами обнаружена активность ферментов обмена половых стероидных гормонов 3 β - и 17 β -гидроксистероиддегидрогеназ в гранулярных амебоцитах и вспомогательных клетках гонады исследованных животных. Эти сведения, а также характерные ультраструктурные особенности этих клеток и тесная взаимосвязь с половыми элементами позволяет рассматривать их в качестве соматических стероидергических элементов, гомологичных специализированным стероидогенным клеткам позвоночных животных.

Помимо соматических стероидергических элементов, ферменты стероидогенеза обнаружены в клетках сперматогенного ряда и ооцитах. В процессе роста ооцита активность ферментов меняется. Она значительно выше в растущих ооцитах, чем в ооцитах, заканчивающих трофоплазматический рост. Известно, что ооциты млекопитающих содержат и другие ферменты стероидогенеза (Tsutsumi et al., 1982. *Folia Endocrinol. Jap.*, 39: 683-689). В ооцитах человека найдены прогестерон и эстрадиол и доказана их эндогенная природа (Suzuli et al., 1983. *Fertil. Steril.*, 39: 683-689). Нами в половых клетках морских ежей обнаружен эстрадиол. Таким образом, половая клетка исследованных животных способна к эндогенному синтезу стероидных гормонов, что с учетом имеющихся сведений, позволяет рассматривать ее как стероидцептивную-стероидергическую систему. Это заключение послужило основой для детальных экспериментальных исследований значения половых стероидных гормонов в размножении двустворчатых моллюсков и морских ежей.

Эстрогены, андрогены и прогестерон у самцов двустворчатых моллюсков и морских ежей ускоряют пролиферацию гониев, созревание сперматоцитов II, формирование сперматид и сперматозоидов, а у самок - пролиферацию гониев, цито- и трофоплазматический рост ооцитов. Исследование динамики синтетических процессов показало, что эстрадиол активизирует синтез белка в яичнике. Изменения синтетической активности сопряжены с эффективным включением ³H-лейцина в белки при постоянном пуле свободной аминокислоты и не зависят от скорости поступления предшественника в клетку. Блокаторы белкового синтеза пуромицин и актиномицин Д

достоверно снижают скорость синтеза белка. Авторадиографические данные указывают на повышение включения ^3H -лейцина в ооциты после введения эстрадиола экспериментальным животным. Это свидетельствует о усилении белоксинтезирующей активности клетки и подтверждает цитологические наблюдения участия половых стероидных гормонов в гаметогенезе.

Известно, что ведущим фактором, вызывающим овуляцию и нерест у позвоночных, является гонадотропный гормон. У иглокожих подобную функцию выполняет гонадостимулирующее вещество. Мы отмечаем интенсивное выведение пептидергического нейросекреторного материала из нейросекреторных клеток перед нерестом у двустворчатых моллюсков. Нейросекреторный материал в этот период легко обнаруживается в пептидергических нервах гонады. Серотонин индуцирует нерест у двустворчатых моллюсков. Простагландин $\text{F}_{2\alpha}$ ускоряет нерест, а индометацин блокирует его. Сравнение некоторых характеристик нереста, стимулированного инъекцией серотонина и таким наиболее часто применяемым индуктором нереста, как повышение температуры воды, а также наблюдения над развитием эмбрионов и личинок, показали, что серотонин вызывает у двустворчатых моллюсков полноценный физиологический нерест. Эти наблюдения и имеющиеся сведения о наличии у двустворчатых моллюсков регуляторного пептида с гонадостимулирующей функцией, вызывающего нерест у этих животных (Fang et al., 1985. Acta Oceanol. Sin., 4: 107-112), указывают, что механизмы нереста у двустворчатых моллюсков сходны с таковыми других животных.

Показано, что реинициация мейоза в ооците у двустворчатых моллюсков индуцируется серотонином. Известно, что серотонин содержится в нервной системе, половой железе и целомической жидкости этих животных (Деридович, Хотимченко, 1988. Биол. моря, 6: 3-16). Нами выявлены локализация серотонинергических нейронов и иннервация серотонинергическими нервами оболочки, стенки акцинусов и протоков половой железы двустворчатых моллюсков. Исследование механизмов реинициации мейоза показало, что серотонин действует через специфические рецепторы на цитоплазматической мембране ооцита. Передача сигнала с серотонинового рецептора в клетку происходит по Ca^{2+} -фосфоинозитидзависимому пути. Одновременно в ооците повышается Na^+/H^+ -обмен, что приводит к изменению pH цитозоля клетки. Активными участниками усиления рецепторзависимых внутриклеточных сигналов являются арахидоновая

кислота и ее липоксигеназный метаболит - 5-гидроксиэйкозатетра-еновая кислота. Другие производные полиненасыщенных жирных кислот не оказывают такого действия, а ингибиторы липоксигеназного окисления полиненасыщенных жирных кислот блокируют разрушение зародышевого пузырька после действия арахидоновой кислоты, серотонина или кальциевого ионофора A23187. Эти сведения дают основание считать, что серотонин у двусторчатых моллюсков, подобно I-метиладенину у иглокожих и прогестерону у рыб и амфибий, является эндогенным мейозиндуцирующим фактором.

Анализ полученных нами и имеющихся литературных данных показывает, что пептидергическая и стероидергическая системы начинают формироваться на ранних стадиях развития половой клетки. Метэнкефалин, нейропептид U, холецистокинин, половые стероидные гормоны и ферменты их обмена выявляются в гониях, сперматоцитах и растущих ооцитах. Закончившие рост ооциты, сперматиды и сперматозоиды содержат преимущественно предшественники регуляторных пептидов, в малой степени подвергающиеся процессингу. Сходным образом в половой клетке формируется моноаминергическая система, рецепторные структуры и системы внутриклеточных мессенджеров (Мотавкин и др., 1990. Регуляция ..., М.: Наука; Хотимченко и др., 1993. Биология ..., М.: Наука). Таким образом, сформировавшаяся половая клетка обладает основными регуляторными системами. Более того, по содержанию серотониноподобных веществ, катехоламинов, ацетилхолина, а также по уровню чувствительности к антагонистам этих веществ и основным характеристикам рецепторных структур, ооциты и ранние зародыши как беспозвоночных, так и позвоночных сходны между собой. Результаты наших исследований пептидергической и стероидергической систем укладываются в отмеченную закономерность.

Показано, что в эмбрионах, начиная со стадии 2-х бластомеров, личинках на стадиях гастрюлы и плутеуса содержатся ферменты стероидогенеза и свободный эстрадиол. В сравнении с неоплодотворенной яйцеклеткой активность стероидогенеза значительно возрастает, начиная со стадии 4-8-ми бластомеров и сохраняется на стадиях бластулы, гастрюлы и плутеуса. Специфический опиатный антагонист налоксон уже со стадии 2-х бластомеров дозозависимо тормозит дробление и вызывает появление аномалий различных морфологических типов, а чувствительность разных стадий развития зародышей к налоксону неодинакова. Значение биогенных ами-

нов и ацетилхолина в раннем эмбриональном развитии описано достаточно подробно (Бузников, 1987. Нейротрансмиттеры ..., М.: Наука). Известно, что как у позвоночных, так и беспозвоночных животных существует тесная взаимосвязь между обменом биогенных аминов, ацетилхолина, стероидных и пептидных гормонов. Таким образом, регуляторные пептиды и половые стероидные гормоны включаются в физиологические механизмы на ранних стадиях эмбрионального развития.

На основе полученных сведений об эндогенных регуляторах и механизмах регуляции размножения исследованных животных разработан способ стимуляции нереста двустворчатых моллюсков (Вараксин и др., 1986. Авт. св-во № I2I4040) и способ определения гонадотропной активности химических соединений (Вараксин и др., 1992. Авт. св-во № I74I687).

5. В Ы В О Д Ы

1. Пептидергическая секреция претерпевает динамичные изменения, связанные с половой активностью исследованных животных. Об этом свидетельствуют:

- сочетанные во времени гистофизиологические процессы в гонаде и нервных ганглиях;
- положительная корреляция между морфометрическими показателями нейронов, отражающих их секреторную активность, и ростом и развитием половых клеток;
- наличие в гонаде пептидергических аксонов, то есть прямых путей поступления нейрогормонов к месту их действия.

2. Иммуноцитохимическими методами в нервной системе и гонаде установлено наличие:

- нейронов, содержащих энкефалин-, вещество Р-, ФМР-амид- и морфогениммунореактивный материал;
- в нейроне, комиссурах и коннективах аксонов, иммунореактивных к тем же регуляторным пептидам;
- в гониях, растущих ооцитах и сперматоцитах I энкефалиниммунореактивного вещества.

3. В гонаде двустворчатых моллюсков и морских ежей:

- имеются стероидпродуцирующие соматические элементы, представленные вспомогательными клетками и гранулярными амебоцитами;

- гонии, ооциты и сперматогенные клетки способны к рецепции половых стероидных гормонов и содержат ферменты стероидогенеза и половые стероидные гормоны эндогенного происхождения;
- половая клетка функционирует как стероидцептивная-стероидергическая система.

4. При эндогенном введении пептидного морфогена повышается активность ферментов обмена половых стероидных гормонов, усиливается пролиферация гониев, ускоряется созревание сперматоцитов I начала профазы мейоза и образование ооцитов малого роста.

5. Половые стероидные гормоны при введении их экспериментальным животным ускоряют у самцов пролиферацию гониев, созревание сперматоцитов II, формирование сперматид и сперматозоидов, а у самок - пролиферацию гониев, цито- и трофоплазматический рост за счет активации синтетических процессов как в половой железе, так и в самом ооците.

6. Мейоз в ооците двустворчатых моллюсков инициируется серотонином. Передача сигнала с рецептора в клетку происходит по Ca^{2+} -фосфоинозитидзависимому пути. Активными участниками механизмов усиления внутриклеточных сигналов являются арахидоновая кислота и ее липоксигеназный метаболит - 5-гидроксиэйкозатетраеновая кислота.

7. Регуляция оо- и сперматогенеза у двустворчатых моллюсков и морских ежей совершается по единой для этих филетических групп схеме: секреция регуляторного пептида → синтез половых стероидных гормонов → активация гаметогенеза.

8. Нерест запускается гонадотропным регуляторным пептидом, действие которого опосредовано у двустворчатых моллюсков серотонином. Простагландин $F_{2\alpha}$ ускоряет нерест, не влияя на созревание ооцита.

9. Формирующиеся в ооците пептидергическая и стероидергическая системы сохраняются после его созревания и начинают функционировать в раннем эмбриогенезе, осуществляя регуляцию развития.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ
В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

Монографии

1. Мотавкин П.А., Вараксин А.А. Гистофизиология нервной системы и регуляция размножения у двустворчатых моллюсков. М.: Наука. 1983. 208 с.

2. Motavkine P.A., Varaksine A.A. La Reproduction chez les Mollusques Bivalves. Role du Système Nerveux et Régulation. Brest: IFREMER. 1989. 250 p.

Статьи, тезисы докладов, авторские свидетельства

3. Вараксин А.А. Развитие половой железы и дифференцировка пола у морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Зоол. ж. 1980. Т. 59, № 12. С. 1895-1898.

4. Вараксин А.А. Медиаторы нервной системы морского двустворчатого моллюска *Patinopecten yessoensis* (Jay) // Физиология и биохимия медиаторных процессов: Тез. докл. М.: Наука. 1980. С. 42.

5. Вараксин А.А. Иннервация стенки половой железы приморского гребешка *Patinopecten yessoensis* (Jay) // Гистофизиология эффекторных и рецепторных механизмов нервной системы морских организмов. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1980. С. 21-26.

6. Мотавкин П.А., Вараксин А.А. Типы аксонов и синапсы в нейропиле висцерального ганглия приморского гребешка *Patinopecten yessoensis* (Jay) // Там же. С. 27-32.

7. Мотавкин П.А., Вараксин А.А. Регуляция и пути управления гаметогенезом у иглокожих и двустворчатых моллюсков // VI Всесоюз. совещание эмбриологов: Тез. докл. М.: Наука. 1981. С. 27.

8. Хотимченко Е.С., Вараксин А.А., Мотавкин П.А. Механизмы и пути регуляции репродуктивных процессов у иглокожих и двустворчатых моллюсков // Второй Всесоюз. съезд океанологов: Тез. докл. Севастополь. 1982. С. III-112.

9. Вараксин А.А., Деридович И.И., Вараксина Г.С. Эндокринология размножения у двустворчатых моллюсков // Биология шельфовых зон Мирового океана: Тез. докл. Ч. 2. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1982. С. 61-62.

10. Варакин А.А. Нервная система мидии Грея // Биология мидии Грея. М.: Наука. 1985. С. 15-22.

11. Бородулин Ю.Г., Варакин А.А. К вопросу о механизме формирования биоэлектрической активности висцерального ганглия приморского гребешка, вызванной раздражением механорецепторов гонады // XIV съезд Всесоюз. физиол. об-ва им. И.П.Павлова. Л.: Наука. 1983. С. 132.

12. Варакин А.А., Деридович И.И., Швалева Н.И. Иннервация половой железы двустворчатых моллюсков // Архив анатомии, гистол. и эмбриол. 1983. Т. 84, № 1. С. 43-49.

13. Варакин А.А., Деридович И.И. Морфофункциональная характеристика стенки половой железы приморского гребешка // Биол. моря. 1984. № 3. С. 60-66.

14. Мотавкин П.А., Варакин А.А. Мелкие гранулосодержащие клетки центральной нервной системы двустворчатого моллюска *Patinopecten yessoensis* (Jay) // Архив анатомии, гистол. и эмбриол. 1985. Т. 88, № 6. С. 13-16.

15. Варакин А.А., Мотавкин П.А., Бородулин Ю.Г. Способ стимуляции нереста морского гребешка. Авторское свидетельство № 1214040 СССР. Заявл. 20.06.84; опубл. 28.02.86. Бюл. № 12.

16. Варакин А.А. Нервная система // Приморский гребешок. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1986. С. 36-47.

17. Варакина Г.С., Варакин А.А. Влияние эстрадиола дипропионата на оогенез морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Биол. моря. 1987. № 4. С. 47-52.

18. Варакина Г.С., Виноградов В.А., Варакин А.А. Действие даларгина на развитие зародышей морского ежа // Бюл. экспер. биол. и медицины. 1987. Т. 103, № 3. С. 384.

19. Варакин А.А., Виноградов В.А., Мотавкин П.А., Зверков И.В., Тищенко В.А. Локализация пептидного "морфогена гидры" в нейронах моста головного мозга у человека // Архив анатомии, гистол. и эмбриол. 1987. Т. 93, № 9. С. 34-36

20. Найденко Т.Х., Варакин А.А. Стимуляция нереста у моллюсков и оценка жизнеспособности эмбрионов и личинок // Моллюски. Результаты и перспективы их исследования: Тез. докл. Л., 1987. С. 349-351.

21. Варакина Г.С., Варакин А.А. Половые стероидные гормоны у морских ежей // Медико-социальные аспекты проблемы "Человек-океан": Тез. докл. Владивосток, 1988. С. 270.

22. Вараксина Г.С., Вараксин А.А. Локализация 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы в гонадах двустворчатых моллюсков приморского гребешка и мидии Грея // Архив анатомии, гистол. и эмбриол. 1988. Т. 95, № II. С. 79-82.

23. Мотавкин П.А., Вараксин А.А., Низяева Е.П., Реунова О.В. Типы нейронов центральной нервной системы приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay) // Архив анатомии, гистол. и эмбриол. 1988. Т. 95, № I2. С. I4-20.

24. Найденко Т.Х., Вараксин А.А. Нерест и развитие мидии Грея в лабораторной культуре // Биол. моря. 1988. № 3. С. 58-62.

25. Вараксин А.А., Найденко Т.Х. Сравнительная характеристика различных методов стимуляции нереста у приморского гребешка // Биол. моря. 1989. № 2. С. 66-69.

26. Вараксин А.А. Наличие эстрадиола в зародышах и личинках морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Ж.эвол. биох. и физиол. 1989. Т. 25, № I. С. I28-I29.

27. Мотавкин П.А. Вараксин А.А., Масленникова Л.А., Вараксина Г.С. Сперматогенез приморского гребешка как модель для оценки гонадотропной активности химических соединений // Препринт. Владивосток: ДВО АН СССР, 1989. 47 с.

28. Вараксин А.А., Вараксина Г.С., Латышев Н.А., Реунова О.В. Действие простагландина F_{2 α} на эмбриональное и личиночное развитие морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Механизмы действия медиаторов и гормонов на эффекторные клетки: Тез. докл. Суздаль, 1989. С. 33.

29. Вараксина Г.С., Вараксин А.А. Половая клетка двустворчатых моллюсков и морских ежей как стероидцептивная-стероидергическая система // Там же. С. 34.

30. Вараксин А.А., Вараксина Г.С., Малахов В.В. Действие опиатного антагониста налоксона на эмбриональное и личиночное развитие морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Докл. АН СССР. 1990. Т. 311, № I. С. 224-227.

31. Вараксин А.А., Масленникова Л.А., Вараксина Г.С. Способ оценки гониальной пролиферативной активности фармакологических препаратов // Цитология, биохимия и физиология морских организмов. Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. С. 91-95.

32. Вараксина Г.С., Вараксин А.А. Локализация 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы в яичниках и семенниках приморского гребешка и мидии Грея // Цитология. 1990. Т. 32, № 2. С. I28-I31.

33. Вараксина Г.С., Вараксин А.А. Влияние эстрадиола и тестостерона на сперматогенез морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Биол. моря. 1990. № 2. С. 47-51.
34. Вараксин А.А., Ушева Л.Н., Зверков И.В. Локализация иммунореактивного лейэнкефалина в пищеварительной железе приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay) // Архив анатомии, гистол. и эмбриол. 1990. Т. 98, № 1. С. 71-74.
35. Вараксин А.А. Вараксина Г.С. Локализация эстрадиола в яйцеклетках, зародышах и личинках морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Онтогенез. 1990. Т. 21, № 3. С. 303-306.
36. Вараксина Г.С., Вараксин А.А. Действие эстрадиола, прогестерона и тестостерона на оогенез приморского гребешка // Биол. моря. 1991. № 3. С. 61-68.
37. Вараксина Г.С., Вараксин А.А. Локализация стероиддегидрогеназ в семенниках и яичниках морского ежа // Биол. моря. 1991. № 2. С. 77-82.
38. Varaksin A.A., Latyshev N.A., Varaksina G.S., Karaseva E.M., Reunova O.V., Khotimchenko Yu.S. Involvement of arachidonic acid and its metabolites in regulation of germ cells of marine bivalve molluscs and echinoderms // Онтогенез. 1991. Т. 22, № 4. С. 428-429. (Abst. Soviet-Finnish Symp. "Signal Molecules and Cell Differentiation". Suzdal, 1991.
39. Varaksin A.A., Varaksina G.S., Reunova O.V., Latyshev N.A. Significance of serotonin and fatty acids for stimulation of spawning and meiosis reinitiation in oocytes of bivalve molluscs // Reg. Meet. Intern. Soc. Invert. Neurobiology. Minsk, 1991. P. 103.
40. Вараксин А.А., Масленникова Л.А., Вараксина Г.С. Способ определения гонадотропной активности химических соединений. Авторское свидетельство SU 1741687 А ОI К 6I/00. Заявл. 01.06.89; опубл. 23.06.92. Бюл. № 23.
41. Varaksin A.A., Varaksina G.S., Reunova O.V., Latyshev N.A. Effect of serotonin, some fatty acids and their metabolites on reinitiation of meiotic maturation in oocytes of bivalve *Spisula sachalinensis* (Schrenk) // Comp. Biochem. and Physiol. 1992. V. 101C, N 3. P. 627-630.
42. Вараксина Г.С., Вараксин А.А., Масленникова Л.А. Значение половых стероидных гормонов в сперматогенезе приморского гребешка // Биол. моря. 1992. № 1-2. С. 77-83.

43. Мотавкин П.А., Коцюба Е.П., Варакин А.А. Нейроны холинергической синаптической передачи двустворчатых моллюсков // Цитология. 1992. Т. 34, № 5. С. 58-64.

44. Варакин А.А., Реунова О.В. Влияние индометацина, арахидоновой кислоты и некоторых ее метаболитов на пролиферацию сперматогониев у приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* // Ж. эвол. биох. и физиол. 1993. Т. 29, № 3. С. 330-334.

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to the author of the cited works, A. Varygin.