

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

на правах рукопису

УДК 576.858.77

577.218

591

616.15.071

СОЛОМКО Олександр Петрович

ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ВЗАЄМОДІЇ  
ГОМО- ТА ГЕТЕРОЛОГІЧНИХ ГЕНОМІВ В ЕУКАРІОТИЧНИХ СИСТЕМАХ

03.00.26 - молекулярна генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

К И І В - 1994

AB 30.917

дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук Бариляк І.Р.

доктор біологічних наук Ковлов Е.А.

доктор біологічних наук Дружина М.О.

Провідна організація: Київський державний університет імені Т.Г.Шевченка.

Захист відбудеться "25" жовтня 1994 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д. 016.11.01 з захисту докторських дисертацій в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 252143, Київ, вул. акад.Заболотного, 150

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Автореферат розіслано "23" вересня 1994 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради кандидат біологічних наук

ЛНБ ім. П. Стефаніка  
АН України

Л.Л. Лукаш

ЛНБ України ім.В.Стефаніка  
00777904 (Y)



**Актуальність проблеми.** Набуті за останні роки дані про суттєву структурно-функціональну гетерогенність складових геному клітини, що раніше вважалися досить однорідними, ставлять питання про те, що кооперативна поведінка складових клітинного геному будеться на базі їх специфічної взаємодії.

Важливим аспектом цієї проблеми є те, що реалізація спадкової інформації починається з моменту дозрівання статевих клітин і потім, починаючи з першого поділу заплідненої яйцеклітини, відбувається в певних умовах зовнішнього середовища. Це примушує розглядати розвиток організму, як наслідок дії двох основних факторів - взаємодії батьківських геномів в процесі реалізації генетичної програми генотипу і впливу на особину з боку факторів середовища (особливо це стосується стадії ембріогенезу, коли структурно-функціональна організація геному зазнає суттєвих змін).

В зв'язку з тим важливого значення набуває дослідження структурно-функціональної організації геному еукаріот, і зокрема проблема структурно-функціонального взаємовідношення гомологічних і гетерологічних геномів. На початку нашої праці розробка підходів до більш детального дослідження структурно-функціональної організації геному еукаріот знаходилася на початковій стадії розвитку. Одним з підходів було дослідження експресії геномів вірусів еукаріот, які містять ДНК, в модельних системах, що так багато дало для розуміння принципів регуляції експресії геному еукаріот. Одночасно використання цієї модельної системи дозволило розпочати дослідження деяких аспектів проблеми геномною взаємодії. Подальший розвиток ці дослідження одержали за допомогою принципово нових підходів, серед яких особливе значення має розвиток методів мікрomanipу-

ляції, генної інженерії та трансгенозу.

Все це дозволило продовжити дослідження структурно-функціонального аспекту міжгеномних взаємодій, стабільності геному вищих форм еукаріот, ролі ядра і цитоплазми на перших етапах розвитку зародка на модельній системі доімплантаційних зародків миші.

**Мета та завдання досліджень.** Метою цієї роботи є в'ясування принципів структурно-функціональних взаємодій різних геномів в еукаріотичних системах на моделях "вірус-клітина-організм комах", раннього зародка миші.

Відповідно до поставленої мети було сформульовано такі задачі, для вирішення яких використали ряд оригінальних експериментальних підходів і широкий спектр сучасних молекулярно-генетичних методів:

1) вивчити динаміку експресії гетерологічних геномів бакуловірусу та організму хазяїна при їх взаємодії в процесі вірусної інфекції. Визначити рівні регуляції експресії вірусного геному.

2) дослідити структуру екзогенного трансгеному та її успадкування в процесі взаємодії з геномом миші. Вивчити вплив чужерідного геному на функціонування геному хазяїна.

3) оцінити вплив хронічного опромінення мишей в процесі їх неонатального розвитку на ранній ембріогенез в ряді поколінь їх нащадків.

4) розробити сучасні підходи до вивчення проблеми регуляції перших етапів раннього розвитку ссавців.

**Наукова новизна.** Вперше вивчено динаміку синтезу вірусспецифічних РНК при ядерному поліедрозі великої вошиної молі. Показано, що короткоживучі гігантські ядерні вірусспецифічні

РНК є попередниками цитоплазматичних мРНК. Конкурентною гібридизацією встановлено, що біля 10% ядерних вірусспецифічних транскриптів відсутні в складі полісомних РНК, що свідчить на користь припущення про наявність в геномі вірусу ядерного поліедрову (ВЯП) великої вошинної молі (ВВМ) генів, транскрипти яких піддаються процесінгу і сплайсінгу. Встановлено що в ході інфекційного процесу регуляція експресії геному вірусу відбувається як на рівні транскрипції, так і на пост-транскрипційному рівні.

Дослідження взаємодії геномної ДНК вірусу саркоми Рауса птахів з геномом миші у непермісивній системі продемонструвало суттєву модифікацію введеної в зародкові клітини рекомбінантної молекули. Виявлено повну елімінацію вірусспецифічних послідовностей, як у випадку інтеграції векторної молекули в геном миші, так і у ДНК, що автономно реплікуються, і, що аберегли лише послідовності бактеріальної плазміди.

Встановлено суттєве збільшення доімплантаційної смертності ембріонів і глибoku дестабілізацію каріотипічних характеристик клітин кісткового мозку самок експериментальної популяції в результаті хронічного впливу низьких доз іонізуючої радіації. Результати експериментів свідчать про певний внесок у порушення раннього ембріонального розвитку пошкоджень механізмів нормального клітинного поділу.

Показано, що механізм роботи біологічного годинника, який визначає морфогенез раннього розвитку миші, не пов'язаний з клітинними поділами і не залежить від ядерно-цитоплазматичного співвідношення.

За допомогою нової мікрохірургічної техніки встановлено, що в цитоплазмі зигот миші немає прелокалізації інформаційних де-

термінант, і, що індуктивні міжклітинні взаємодії є лише одним механізмом, який відповідає за предетермінацію бластомерів до різних напрямків диференціювання.

**Практична цінність роботи.** Автономна плазміда, яку одержано в дослідах з трансгеноту, може бути використана як модельна для створення неінтегрованого вектора для перенесення чужерідних генів, що автономно реплікується, і має властивість не викликати негативних наслідків, які пов'язані звичайно з інтеграцією в геном, що відкриває нові перспективи в трансгеноті сільськогосподарських тварин.

В результаті досліджень взаємовідносин ядра і цитоплазми у ранньому розвитку встановлено, що цитоплазма зигот ссавців не здатна перепрограмувати диференційований геном, у зв'язку з чим для вирішення проблеми клонування ссавців необхідно залучення інших методів перепрограмування геному.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації доповідалися на Всесоюзній нараді з ветеринарної вірусології (Москва, 1974), на I Міжнародному коллоквіумі з патології безхребетних (Прага, 1978), на Міжнародному симпозиумі "Регуляція росту і експресії генів у клітинах тварин" (Варшава, 1987), на Всесоюзній конференції "Нові напрями біотехнології" (Пушино-на Оці, 1988), на Міжнародному генетичному конгресі (Торонто, 1988), на II міжнародному ембріологічному конгресі (Утрехт, 1989), на науково-практичній конференції "Актуальні проблеми ліквідації медичних наслідків аварії на ЧАЕС" (Київ, 1992), на конференції СНГ "Актуальні проблеми впливу іонізуючого випромінювання на репродуктивну функцію" (Обнінськ, 1992), на Міжнародній конференції "Medical consequences of the Chernobyl accident" (Київ, 1992), на українсько-французькому симпозиумі "Перенесення

генів і регуляція їх експресії в еукаріотів" (Київ, 1993), на Радіобіологічному з'їзді СНГ (Київ, 1993), на Конференції Ради Європи "Potential long-term ecological impact of genetically modified organisms" (Страсбург, Франція, 1993).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 40 робіт.

**Структура та об'єм роботи.** Дисертація складається з вступу, огляду літератури, чотирьох розділів результатів досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку літератури. Роботу викладено на сторінках машинопису. Вона містить таблиць та малюнків. Список літератури включає бібліографічних посилань.

Всі дослідження виконано з ініціативи автора та за його безпосередньою участю в експериментах і аналізі результатів.

## **I. Взаємодія геномів бакуловіруса та комахи**

Взаємодія віруса та клітини призводить до виникнення нової, самостійної системи "вірус-клітина", в якій процеси синтезу та розпаду макромолекул, їх транспорту та функціонування визначаються властивостями двох взаємодіючих геномів.

Виходячи з вищевказаних міркувань ми обрали для дослідження модельну систему БЯП та його природного хазяїна - велику вошинну міль. Цей вірус є представником великої групи ентомопатогенних вірусів - бакуловірусів. Він містить велику кільцеву ковалентнозв'язану двоспіральну ДНК з молекулярною масою 85,7 мегадальтона, що реплікується в ядрах інфікованих клітин. Для дослідження процесів структурно-функціональної взаємодії двох гетерологічних геномів в пермісивній системі необхідно мати уявлення про динаміку синтезу вірусспецифічних та клітинних РНК в процесі інфекції та деякі їх фізи-

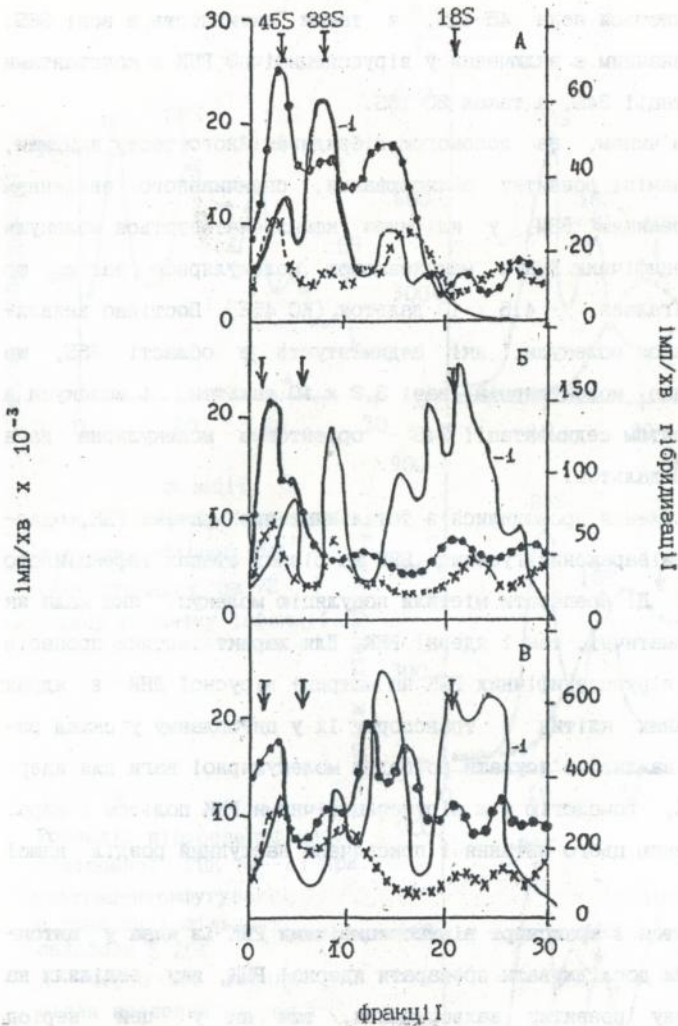
ко-хімічні характеристики.

**1.1. Матеріали і методи.** В роботі було використано адорові та інфіковані ВЯП гусені ВВМ "чеської" лінії, одержаної в Інституту ентомології АН Чехії. Загальну клітинну РНК одержували за методом (Scherrer, Darnell, 1962), модифікованим нами для тканин комах. Ядерну РНК одержували за методом (Георгієв, 1963), полісоми і полісомні РНК виділяли за методом (Martin, Byrne, 1970), гібридаацію РНК-ДНК виконували на фільтрах за методом (Gillespie, Spiegelman, 1965; Oda, Joklik, 1967).

### Результати і обговорення

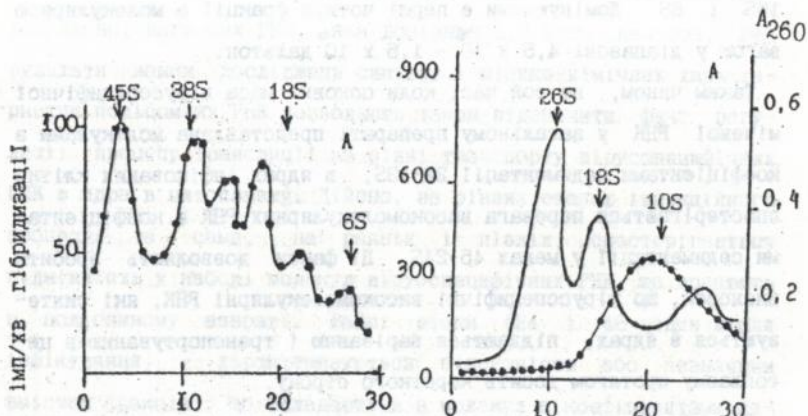
**1.2. Седиментаційний аналіз загальної РНК.** В інфікованих комах включення в область високомолекулярних РНК через добу після введення вірусу є вищим порівняно з контролем майже у два рази (мал.1а), що пов'язано, вірогідно, з активацією синтезу клітинних РНК, в тому числі ядришкових попередників РНК, і одночасним синтезом вірусспецифічних РНК. Необхідно відзначити, що частка вірусспецифічної РНК у загальному синтезі в цей період часу досить незначна, на межі виявлення (0,02%), і представлена вона на цьому етапі в основному молекулами великих розмірів -45-29S, що орієнтовно відповідає молекулам РНК з молекулярною вагою у межах  $4,5 \times 10^6$  -  $2,5 \times 10^6$  дальтон.

Відмічено значну гетерогенність за розмірами молекул вірусспецифічних РНК. На другу добу спостерігаються молекули з досить широким діапазоном коефіцієнтів седиментації (від 22S до 9S з перевагою в зоні 22-13S, мал.1б). Потім зростає процент вірусспецифічних РНК в загальній транскрипції до 1,7% на фоні підвищення рівня синтезу загальної РНК у інфікованих комах. На 72 годину розвитку інфекційного процесу (мал.1в) кількість вірусспецифічних РНК в усіх зонах градієнту зростає.

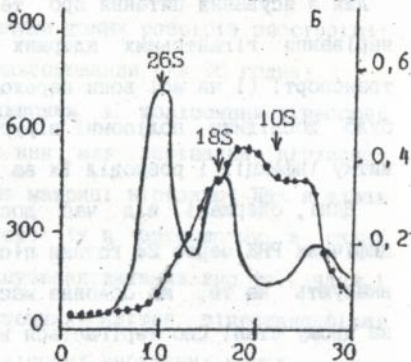


Мал. І. Розподіл вірусспецифічних РНК при центрифугуванні в градієнті щільності сахарози 15-30%. Тотальну імпульсно мічену РНК екстраговано з тканин інфікованих гусениць через: А - 24 години, Б - 48 годин, В - 72 години. РНК екстраговано із здорових (x--x) та інфікованих вірусом (•--•) гусениць



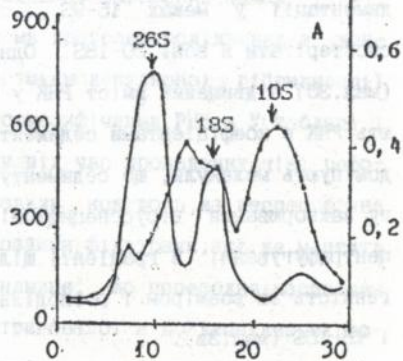


фракції  
 Мал. 2 . Фракції ядерних вірусспецифічних РНК, екстрагованих на 72 годину розвитку інфекції.



Мал. 3 .  
 Розподіл вірусспецифічної полісомної РНК (●-●) при ультрацентрифугуванні в градієнті щільності сахарози 5-20%.

А - через 24 години після введення вірусу,  
 Б - через 48 годин.  
 В - через 72 години



фракції

15S і 6S. Домінуючими є перші чотири фракції з молекулярною вагою у діапазоні  $4,5 \times 10^6$  -  $1,5 \times 10^6$  дальтон.

Таким чином, на той час, коли основна маса вірусспецифічної міченої РНК у загальному препараті представлена молекулами з коефіцієнтами седиментації 22-13S, в ядрах інфікованих клітин спостерігається перевага високомолекулярних РНК з коефіцієнтами седиментації у межах 45-24S. Ці факти дозволяють зробити висновок, що вірусспецифічні високомолекулярні РНК, які синтезуються в ядрах, піддаються нарізанню і транспортуванню в цитоплазму протягом досить короткого строку.

Для з'ясування питання про те, які верхня і нижня межі нарізання гігантських ядерних вірусспецифічних РНК при їх транспорті (і чи всі вони переходять у цитоплазму) необхідно було дослідити полісомні вірусспецифічні РНК у динаміці розвитку інфекції і розподіл їх за розміром.

Дані, одержані під час дослідження полісомних вірусспецифічних РНК через 24 години після введення вірусу (мал.3а) вказують на те, що основна маса вірусспецифічних РНК полісом на цьому етапі спостерігається в зоні РНК з коефіцієнтами седиментації у межах 15-9S і тільки незначну кількість можна спостерігати в зоні 20-18S. Однак через 48 годин відмічено (мал.3б) підвищений вміст РНК у зоні градієнту, де седиментують РНК з коефіцієнтами седиментації у межах 20-18S, при цьому домінують молекули, що седиментують у зоні 16-10S. На 72 години захворювання вірусспецифічні РНК полісом виявляють при центрифугуванні в градієнті щільності сахарози значну гетерогенність за розміром і розподіляються переважно в зонах 28-10S і 18-10S (мал.3в).

Наведені результати дослідження розміру вірусспецифічних

іРНК, включених в полісоми, дають уявлення про верхню межу молекулярної ваги цих РНК, яка дорівнює  $1,8 \times 10$  дальтон. Результати наших досліджень синтезу і фізико-хімічних характеристик полісомних РНК дозволяють також відзначити факт регуляції процесу трансляції на рівні транспорту вірусспецифічних РНК в ядра в цитоплазму. Дійсно, на різних етапах інфекційного процесу, а саме, на ранніх і пізніх, спостерігається відмінність у наборі молекул вірусспецифічних РНК, що працюють в полісомному апараті. Ранні етапи (24 і 48 годин після інфікування) - характеризуються відсутністю або незначним вмістом фракцій, що складаються з молекул з коефіцієнтами седиментації від 29S до 26S. Молекули таких розмірів спостерігаються тільки на пізніх етапах захворювання (72-96 годин).

**1.4. Ступінь гомологічності ядерних і полісомних вірусспецифічних РНК.** Після встановлення меж нарізання вірусспецифічних РНК, які синтезовано на матриці віріонної ДНК в ядрах інфікованих клітин, при транспорті їх в цитоплазму в склад полісом, ми підійшли до з'ясування питання про те, чи всі транскрибовані в ядрах інфікованих клітин вірусспецифічні послідовності представлено в полісомах заражених комах.

Для з'ясування цього питання ми провели дослідження з конкурентного інгібування процесу міжмолекулярної гібридації між ядерними і полісомними вірусспецифічними РНК. У таблиці 1 подано результати, одержані нами під час проведення цієї роботи. В усіх експериментах ставили контроль на неспецифічне зв'язування міченої РНК з целюлозними фільтрами, які не містять ДНК. З поданих результатів випливає, що попереднє насичення ДНК фільтрів неміченою РНК, екстрагованої з полісом хворих комах на 72 годину розвитку інфекції, практично блокує реакцію

Таблиця 1. Конкурентна гібридація між ядерною і цитоплазматичною РНК тканин гусениць, яких заражено вірусом ядерного поліедрозу (ДНК вірусу - 1 мкг на фільтр)

ЗН-РНК додано імп/хв	Неміченої РНК (мкг/фільтр)	імп/хв	% від гібридації	% від контролю
РНК із полісом	РНК із полісом	1200	70	1,6
(4,7 x 10 <sup>6</sup> )		600	130	2,3
		400	200	4,8
		100	1240	30,0
	РНК із ядер	500	67	1,6
		300	83	2,0
		100	92	2,2
	6 x SSC		4130	100,0
	РНК тотальна (65°C)			
	із здорових комах	1200	3980	96,0
РНК ядер	РНК з полісом	1200	93	10,6
(9,2 x 10 <sup>4</sup> )		600	100	11,4
		400	390	44,8
		100	774	89,0
	ядерна РНК	500	9	1,0
		300	11	1,2
		100	35	4,2
		50	288	33,0
	6 x SSC		870	100,0
	ядерна РНК із			
	здорових комах	500	852	98,0

гібридації міченої полісомної РНК, екстрагованої на тому ж етапі, з ДНК вірусу (1,6% контролю). Аналогічні результати одержано і у випадку переднасичення вірусної ДНК неміченою РНК, екстрагованою з ядер інфікованих клітин (2,0-1,6% від контролю). Однак гібридація міченої ядерної РНК хворих комак лише на 90% інгібується попередньою гібридацією вірусної ДНК з неміченою полісомальною РНК - 10,6% контролю, що свідчить про наявність у фракціях ядерної РНК послідовностей, які відсутні у складі полісомних вірусспецифічних РНК. У той самий час конкуренція між міченою і неміченою РНК з ядер інфікованих гусениць становить майже 100% - 1,2-1,0% від рівня контролю.

Ці дані, одержані в результаті ряду експериментів, свідчать про те, що у випадку інфекційного процесу, викликаного введенням гусеницям ВВМ вірусу ядерного поліедрозу, не всі РНК-послідовності, що транскрибуються у ядрі з матриці вірусної ДНК, транспортуються у цитоплазму і включаються у склад вірусспецифічного полісомного комплексу.

Отже, дослідження динаміки зміни набору вірусспецифічних транскриптів в процесі взаємодії гетерологічних геномів в нашій модельній системі вказує на наявність регуляції експресії вірусного геному на рівні транскрипції. Поряд з тим відмічено факт наявності великих вірусспецифічних транскриптів в препаратах тотальної та ядерної РНК при їх відсутності в складі полісом, що дозволяє говорити про регуляцію процесу трансляції вірусспецифічних РНК на рівні процесінгу та транспорту. Вивчення експресії вірусного та клітинного геномів при їх взаємодії в пермісивній системі дозволило виявити суттєве перепрограмування геному клітини під дією продуктів експресії геному віруса.

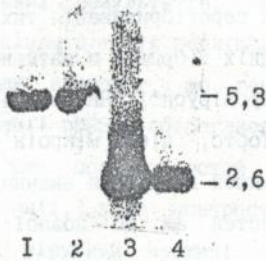
**2. Взаємодія гетерологічних геномів при трансгенезі у мишей**  
Мікроін'єкціювання екаогенних ДНК в пронуклеус запліднених яйцеклітин миші дозволяє створити модельну систему, за допомогою якої можна досліджувати перенесені гени у процесі розвитку організму, стабільність їх інтеграції і успадкування та взаємодію вірусного і мишиного геномів в непермісивній системі.

Донорською ДНК ми обрали плазмиду pATV-8 (похідну від pBR322), яка несе як вставку клоновану кДНК генома вірусу саркоми Рауса птахів, досить схожого за своєю структурою з транспозонами, і, що містить у собі ген src, який стоїть під сильним промотором, яким є LTR цього вірусу.

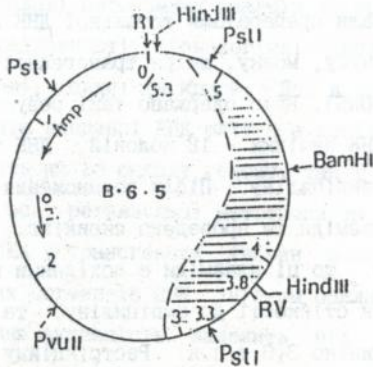
**2.1. Матеріали і методи.** Донорами яйцеклітин для мікроін'єкцій було взято мишей лінії ICR, гормонально стимульованих для одержання синхронізованих яйцеклітин. Мікроін'єкції виконували в чоловічий пронуклеус зигот на стадії двох пронуклеусів за допомогою мікроманіпулятора KM-2, вводили 200-400 копій плазмиди pATV-8 на зиготу, після чого їх трансплантували псевдовагітним самкам ICR, дот-блот-аналіз виконували за методом Palmiter, 1983; Southern, 1975).

### Результати та обговорення

**2.2. Одержання та дослідження трансгенних мишей.** За даними дот-блот-гібридизації міченої ЗРП ДНК плазмид pATV-8 та pBR322 з тотальною високополімерною ДНК з хвостів експериментальних мишей, кількість трансгенних тварин у серії з мікроін'єкціюванням плазмиди pATV-8 була достовірно більшою (24 з 52 досліджених малят). Аналіз тотальної ДНК з хвостів трансгенних мишей Fo показав, що при рестрикції ендонуклеазою EcoR1, яка має на плазмиді pATV-8 чотири сайти рестрикції,



Мал 4 Аналіз тотальної ДНК з трансгенних мишей FO,  
зонд ЗР рATV-8  
миші: I-B1, 2-B6, 3-B9, 4-B14



Мал 5 Фізична карта автономної плазмиди, виділеної  
з миші B6-5.

несподівано виявляється по одному фрагменту, але різного розміру (мал 4).

У той самий час перегібридація тих самих фільтрів (після відмивання попередніх гібридів з нативною рАТV-8), з клонованими фрагментами провірусної ДНК дала негативний результат в усіх випадках. Тобто, після мікроін'єкції плазмиди рАТV-8 у процесі розвитку мишей відбулася значна перебудова її нуклеотидних послідовностей аж до повної втрати послідовностей провірусної ДНК.

Трансгенних мишей Fo було схрещено з інтактними тваринами цієї ж лінії. Аналіз результатів схрещувань свідчив, що в ряді одержаних субліній відсутнє менделєвське успадкування трансгенному: від 80 до 100% нащадків давали позитивний сигнал при гібридації з міченою 32P рBR322. Ці результати свідчать про те, що забудова екзогенної послідовності трапилася, як мінімум, у дві негомологічні хромосоми, або про автономне існування плазмиди. З метою перевірки цього припущення, ми трансформували препаратами тотальної ДНК з печінки, щитовидної залози, тимусу, мозку, шкіри трансгенної миші B6-5 клітини E. coli (штам DNS). Було одержано такі результати: ДНК шкіри - 40 колоній, ДНК печінки - 12 колоній, ДНК тимусу - 135 колоній, стійких до ампіциліну. Після розмноження колоній з них було виділено плазмиди та проведено скринінг. В результаті аналізу встановлено, що ці плазмиди є похідними плазмиди рBR322, що зберегли ген стійкості до ампіциліну, та придбали ділянку ДНК розміром близько 3,0 т.п.н. Рестрикційну карту цієї плазмиди показано на мал.5. Подібну картину було одержано після аналізу плазмиди, "врятованої" з миші B6, що була засновником цієї сублінії. Отже треба відзначити, що плазмідні ДНК, які було

виявлено у F1 мишей, були передані без перебудови і незалежно від статі.

Виходячи з вищенаведених результатів, які свідчать про стабільність автономних плазмід та їх реплікацію в бактеріальних клітинах, ми дійшли висновку, що гени стійкості до ампіциліну та ORI-реплікації pBR322 збереглися повністю - без перебудови. Збереження цих послідовностей, за відсутності будь-якої позитивної селекції, дуже контрастує з виявленою суттєвою перебудовою у вірусній частині вихідної плазміді рATV-8 - повною втратою провірусних послідовностей.

Пошук клітинних послідовностей, можливо, транспозованих до плазмід, було проведено за допомогою блот-аналізу геномних блотів в нормальних мишей та ДНК свині, дрозофіли та криси. Ми виходили з того, що послідовність, яка спостерігається в автономній плазміді, скоріше за все, має геномне походження, або з'являється в результаті рекомбінації з екстрахромосомними кільцевими ДНК (кДНК). Результати наших експериментів свідчать (мал.6) про те, що у складі автономних плазмід в трансгенних мишей виявляються послідовності, гомологічні диспергованим повторам дрозофіли, миші, свині та криси. Це, в свою чергу, свідчить про рекомбінацію введеної ДНК рATV-8 з послідовностями-повторами, які входять як до складу геному, так і еДНК. Таким чином, скоріше за все, регульовані метотична та мейотична сегрегації автономних ДНК у трансгенних тварин залежать від транспозованих клітинних сегментів ДНК. Цілком можливо, що ця специфічна рекомбінаційна активність залежить від наявності вірусних послідовностей але не бактеріальних. Це призводить до транспозиції специфічних послідовностей або в клітинного геному, або зі складу еДНК, що зумовлює виникнення нових генетично

стабільних автономних елементів.

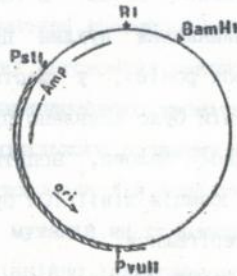
**2.3. Дослідження структури інтегрованого трансгеному.** Для дослідження структури трансгеному та його успадкування ми вивчали тотальну ДНК в миші сублінії В9, у якій було виявлено менделевське успадкування трансгеному, що підтверджувало його інтеграцію. Як позитивний контроль використовували ДНК рBR322 (різні розведення у суміші з ДНК нормальних мишей). Негативним контролем була ДНК трансгенних мишей. У першій серії дослідів після розщеплення ДНК нуклеазою R1 та гібридизацією з міченою ДНК плазміди рBR322 в усіх препаратах ДНК трансгенних мишей різних поколінь (F1-F5) цієї сублінії було виявлено один фрагмент (мал.7). Його розмір - 2,6-2,7 т.п.н. Нами було встановлено, що екаогенна послідовність у геномних ДНК досліджених мишей: а) інтегрована в хромосому; б) інтегрована одна копія на гаплоїдний геном; в) інтегрована неповна копія введеної послідовності (0,5 геному рBR322 або 1/6-1/7 геному рATV-8). Як було в'ясовано раніше, провірусних послідовностей у трансгеномі немає. Детальний аналіз структури інтегрованої послідовності довів, що вона містить сайт для рестриктази PvuII, але не містить сайтів для PstI та BamHI. В результаті сумісного переварювання геномної ДНК ферментами EcoRI та PvuII спостерігається фрагмент меншого (в порівнянні з опрацьованою тільки EcoRI) розміру - біля 2,5 тис.п.н. Оскільки плазміда рUC18, яка дала позитивний сигнал в гібридизації з ДНК, що досліджується, містить послідовності рBR322 від сайта PvuII (2067 - за картою рBR322) до сайта EcoRI (4361) та, оскільки, інтегрована послідовність містить внутрішній сайт розщеплення для PvuII, але не містить сайтів розщеплення PstI, інтегрована чужерідна ДНК повинна бути представлена саме цією частиною мо-



Мал. 6 Влот-гібридізація /5xSSC, 55 С, відмивання в тих же умовах/тотальних клітинних ДНК:  
1-свині, 2-дрозофіли, 3-миші, 4- шура.  
Рестрикція E.coR1, зонд рВ6.



Мал. 7 Розщеплення геномної ДНК трансгенних мишей рестриктазою E.coR1, гібридізація з 32P рBR322  
1-9: трансгенні миші сублінії В9 покоління F0-F5.



Мал. 8 Фрагмент //\\// плазмиди рBR322, що інтегрував до геномної ДНК трансгенних мишей сублінії В9.

лекули pBR322 (мал.8).

Звертає на себе увагу те, що як і у нашому випадку, так і у дослідях з трансгенним шовкопрядом, було використано рекombінантні плазмиди, які містять гетерологічні LTR - довгі кінцеві повтори вірусу саркоми Рауса. Необхідно відзначити, що геномні вірусні послідовності в непермісивній системі підлягають елімінації з підвищеною частотою. Це, можливо, відображає деяку специфіку взаємодії негомологічних геномів вірусу та клітини хааяіна ще на ранньому ембріональному етапі.

**2.4. Біологічні ефекти трансгенозу.** Трансгенних мишей, яких ми одержали на основі плазмиди pATY-8, було схрещено з інтактними тваринами тієї ж лінії. Аналіз результатів схрещувань свідчить про порушення репродуктивних здібностей у ряда трансгенних самок. Самки лінії ICR характеризуються підвищеним рівнем спонтанних пухлин молочної залози, однак при порівнянні однакових вікових груп (від 7 до 12 місяців) виявлено, що частота виникнення пухлин у вихідних трансгенних самок ( $F_0$ ) становить  $73 \pm 12\%$ , в той час як у контрольній групі цей показник становить  $31 \pm 4\%$  (дані достовірні при  $P=0,999$ ). У поколінні  $F_1$  цей показник для трансгенних самок суттєво нижчий, але все ж перевищує контрольний рівень -  $38 \pm 8\%$ . В той час як у самців  $F_0$  ми не спостерігали виникнення пухлин протягом всього строку спостереження (до двох років), у шести самців першого покоління р'аних сублінії було виявлено пухлини печінки, куперової залози, щитовидної залози, асцитні пухлини. Необхідно підкреслити, що у самців лінії ICR будь-які пухлини в нормі раніше нами не спостерігалися.

У сублінії B16 серед нащадків другого покоління виявлено муртвонароджених мишат з недорозвиненими хвостами. Виявлені

нами порушення репродуктивних функцій у ряду вихідних трансгенів та аномалії розвитку їх потомства, що, як правило, виявляються у нащадків другого покоління, гомозиготних за вставкою чужерідної ДНК, відмічали і інші автори. Досить високий рівень виникнення пухлин у трансгенних самок Fo, 1, більш того, у самців, не може бути результатом присутності в трансгені онкогену. Нами було показано елімінацію провірусних послідовностей, в тому числі гена src. Таким чином, аномалії розвитку, підвищений рівень виникнення пухлин - це наслідок інтеграції екаогенної послідовності в геном миші. Найвірогідніше за все забудова відбулася поблизу генів, які відповідають за деякі етапи розвитку зародка, і це впливає на регуляцію їх експресії, що і призводить до негативних наслідків на етапі раннього розвитку зародка або в онтогенезі. Необхідно підкреслити, що забудова чужерідної послідовності в геном мишей викликає, найвірогідніше, суттєву дестабілізацію частини геному, що призводить до виникнення генетичних ефектів, які ми спостерігали у трансгенних мишей. В нашому випадку взаємодія геномів вірусу птахів та миші призводить, скоріше за все на стадії раннього ембріогенезу та диференціювання, до елімінації послідовностей вірусного геному та суттєвої модифікації структури транспортної молекули ДНК з виникненням іноді стабільних автономних рекомбінантів.

### **3. Генотоксична дія низькодозового хронічного опромінення на ранні етапи ембріонального розвитку мишей**

Добре відомо, що генотоксична дія іонізуючого випромінювання реалізується на рівні мутацій як соматичних, так і статевих клітин. Для вивчення радіаційно індукованого мутагенезу в статевих клітинах ссавців найчастіше використовують гамети та

ембріони мишей інбредних ліній. Саме за таких умов стає можливим відділення різноманітних аспектів ініціації мутагенних процесів, таких, як рівень дози, стать, лінійні особливості тварин; дослідження індукції генетичної нестабільності в статевих клітинах та зиготах.

Метою цієї роботи було вивчення генетичних наслідків хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах на репродуктивну функцію ряду поколінь лінійних мишей СС57W/Mv та виявлення специфічних ознак геном-дестабілізуючих радіонуклідних ефектів на рівні статевих і соматичних клітин.

**3.1. Матеріали і методи.** Об'єктами досліджень були миші інбредних ліній С57BL/6, BALB/c, СС57W/Mv. Експериментальна популяція мишей СС57W/Mv утримувалася в спецварії в м.Чернобиль. Сумарна концентрація -активних ізотопів у кормах та тушках тварин з експериментальної популяції перевищувала контроль на 2 порядки і становила  $4.0 \times 10^2$  Бк/кг та  $2.4 \times 10^2$  Бк/кг відповідно. Рівень ембріональних втрат визначали за методикою (Шевченко та ін., 1985). Одноклітинні зародки культивували *in vitro* за Hogan (1986). Препарати клітин кісткового мозку готували за методикою (MacGregor, 1986).

#### Результати та обговорення

**3.2 Аналіз ембріональних втрат в потомстві ряду поколінь мишей лінії СС57W/Mv в чернобильській експериментальній популяції.** З метою отримання порівняльних даних стосовно проходження ембріогенезу у трьох послідовних поколінь мишей лінії СС57W/Mv в чернобильській (Ч) та київській (К) експериментальних популяцій нами було проведено синхронні за часом схрещування тварин 2-3 погонів (відповідно до генерацій) між собою. Отримані результати свідчать (табл.2), що у Ч-мишей доімплантаційна за-

Таблиця 2. Ембріональна загибель потомства самців та самиць

лінії СС57W/Mv при міжпопуляційних схрещуваннях

Покоління	Тип схрещування		Загибель зародків (%)	
	самиця	самець	до імплантації	після імплантації
F1	Ч	Ч	11,6 $\pm$ 2,8*	36,8 $\pm$ 5,7
	Ч	К	12,2 $\pm$ 2,8*	25,6 $\pm$ 4,0
	К	Ч	9,5 $\pm$ 1,0**	29,8 $\pm$ 1,5
	К	К	4,5 $\pm$ 1,3	30,6 $\pm$ 2,9
	Ч	Ч	10,3 $\pm$ 2,3*	41,2 $\pm$ 4,3
F2	Ч	К	12,7 $\pm$ 2,7*	34,3 $\pm$ 1,4
	К	Ч	12,4 $\pm$ 0,9***	32,5 $\pm$ 1,4
	К	К	4,8 $\pm$ 1,5	40,0 $\pm$ 3,7
	Ч	Ч	10,5 $\pm$ 2,4*	43,4 $\pm$ 4,1
	Ч	К	10,3 $\pm$ 2,0*	30,4 $\pm$ 3,2
F3	К	Ч	9,8 $\pm$ 0,9**	34,4 $\pm$ 1,5
	К	К	4,9 $\pm$ 1,2	37,0 $\pm$ 2,8

К - миші з київської експериментальної популяції;

Ч - миші з чорнобильської експериментальної популяції;

\* $p > 0,95$ , \*\* $p > 0,99$ , \*\*\* $p > 0,999$

гибель ембріонів достовірно вища ( $p > 0,95$ ) того ж показника в контрольних схрещуваннях. Цей показник є стабільним в ряді поколінь і становить 4-5% в випадках контрольних схрещувань та 10-12% в схрещуваннях мишей з чорнобильської групи. За показником постімплантаційної загибелі ембріонів результати, отримані в схрещуваннях трьох поколінь тварин з обох експериментальних популяцій, не відрізнялись.

Таким чином, зміни в показнику доімплантаційних втрат вия-

вилися в нашому випадку "індикатором" впливу малих доз поєднаної дії зовнішнього опромінення та інкорпорованих радіонуклідів на репродуктивну функцію мишей лінії СС57W/Mv. Подібний ефект може зумовлюватися втратою здатності до запліднення частиною статевих клітин внаслідок дестабілізації геномів гамет. Для відокремлення внеску гамет самців та самиць в рівень ембріональних втрат було здійснено синхронні міжпопуляційні схрещування (відповідно до поколінь). Виявлено, що зниження плідності та продуктивності мишей генотипу СС57W/Mv в чорнобильській експериментальній популяції обумовлено зростанням в 2-3 рази рівня доімплантаційних втрат. Збереження подібного рівня при міжпопуляційних схрещуваннях є свідченням того, що генотоксичній дії хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах піддаються протягом виживання та росту як ооцити, так і сперматозоїди. Але на рівень доімплантаційних втрат в потомстві опромінених тварин можуть впливати як пошкодження в генетичному апараті статевих клітин та бластомірів ембріонів, так і фізіологічні, біохімічні та генетичні порушення в системі материнського організму.

Таким чином, для пояснення збільшення доімплантаційних втрат в потомстві опромінених мишей лінії СС57W/Mv в чорнобильській експериментальній популяції ймовірними стають дві гіпотези: - доімплантаційні втрати є наслідком цитотоксичної дії радіоізотопів, накопичених у материнському організмі; - генотоксичний ефект низькодозового хронічного опромінення реалізується на рівні порушень або дестабілізації генетичного апарату статевих клітин та доімплантаційних ембріонів.

Вирішення цієї проблеми можливе при проведенні культивування зигот СС57W/Mv різної популяційної належності до пізніх доімплантаційних стадій поза материнським організмом в

дослідженням динаміки клітинних поділів та формування бластоцист.

**3.3. Аналіз культивування зигот, отриманих у схрещуваннях мишей лінії CC57W/Mv з різних експериментальних популяцій.** В результаті аналізу ембріональних втрат в потомстві трьох поколінь мишей лінії CC57W/Mv з чорнобильської та київської експериментальних популяцій нами було знайдено, що рівень доімплантаційної смертності був практично однаковим в потомстві від схрещування мишей, хронічно опромінованих, і від мишей, де одним із партнерів був представник київської експериментальної популяції. Тобто, доімплантаційна смертність не залежала від статі опроміненого партнера.

З метою виявлення найбільш чутливих до радіонуклідних впливів етапів доімплантаційного розвитку ембріонів було проведено порівняльний аналіз ефективності культивування ембріонів, одержаних в різних варіантах схрещувань (табл.3). Отримані дані свідчать про те, що ембріони контрольної групи успішно розвиваються до стадії бластоцисти за досліджуваній період часу інкубації і зупиняються у своєму розвитку на двоклітинній стадії достовірно частіше, ніж на одноклітинній. Така сама закономірність відмічається й для ембріонів, отриманих від схрещення хронічно опромінованої самиці з контрольним самцем. А для зародків, отриманих від схрещування Ч-самця і К-самиці характерна інша тенденція - дроблення достовірно частіше зупиняється на стадії зиготи, ніж на двоклітинній стадії. Участь у схрещуванні Ч-самиці з К-самцем призводить до більш глибоких пошкоджень процесів дроблення. Так само, як і у випадку участі Ч-самця - різко зростає кількість зупинок розвитку на стадії зиготи, відмічається істотне збільшення відсотка ембріонів, які зупиняються у розвитку на двоклітинній стадії.

Таблиця 3. Аналіз розвитку in vitro зигот мишей лінії  
CC57W/Mv до стадії бластоцисти в залежності  
від популяційної приналежності батьків

Типи гамет за популяційною приналежністю донорів		Кількість зигот 2-кл. бластоцист			Кількість зародків, загиблих на стадіях (%)		
о	о	зи-гот	заро-дків	сто-цист	зиготи	2-кл. зародку	сумарна кількість
К	К	100	97	88	3,0 $\pm$ 1,7	9,3 $\pm$ 2,9	12,0 $\pm$ 3,2
К	Ч	113	98	93	13,3 $\pm$ 3,1**	5,1 $\pm$ 2,2	17,7 $\pm$ 3,6
Ч	К	109	97	77	11,0 $\pm$ 3,0*	20,6 $\pm$ 4,1*	29,4 $\pm$ 4,4**
Ч	Ч	148	118	98	20,3 $\pm$ 3,3***	16,9 $\pm$ 3,1*	33,8 $\pm$ 3,9***

\*p>0,95, \*\*p>0,99, \*\*\*p>0,999

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що хронічне (протягом неонатального розвитку) опромінювання мишей обох статей дає свій внесок у порушення проходження стадій доімплантаційного ембріогенезу нащадків. Очевидно, ефекти хронічного опромінювання самців і самиць на перший поділ ембріонів, отриманих від схрещування опромінених тварин з мишами контрольної групи, реалізуються через різні механізми.

Однією з можливих причин дефектів процесів дроблення ембріонів можуть бути різноманітні цитогенетичні пошкодження, які адатні призводити до дестабілізації геному генеративних та соматичних клітин. Відомо що проліферуючі клітини ембріонів, пухлин та кісткового мозку мають більшу адатність до репарації, ніж диференційовані непроліферуючі клітини. І.Є.Воробцовою було сформульовано робочу гіпотезу про універсальність

феноменології радіаційних ефектів в соматичних, ембріональних та статевих клітинах і генетичних пошкоджень, що їх обумовлюють.

**3.4. Аналіз каріотипічної стабільності соматичних клітин мишей СС57W/Mv з чорнобильської та київської експериментальних популяцій.** Для з'ясування впливу хронічного опромінювання на каріотипічну стабільність мишей лінії СС57W/Mv нами спільно зі старшим науковим співробітником Інституту генетики та розведення сільськогосподарських тварин УААН Т.Т.Глазко було здійснено порівняльний аналіз параметрів цитогенетичної мінливості в клітинах кісткового мозку тварин в контрольній та дослідній груп. Отримані дані наведені в табл.4. Результати аналізу свідчать про те, що хронічне опромінювання призводить до глибокої дестабілізації генетичного матеріалу. В наших дослідженнях в клітинах кісткового мозку контрольної групи мишей феномен асинхронного розщеплення центромерів хроматид (АРЦХ) так само, як і в роботах, виконаних на дрозофілі, зустрічався в середньому не більше, ніж у 1% метафазних пластинок. В клітинах кісткового мозку тварин, яких хронічно опромінювали, частота стрічання метафаз з АРЦХ істотно вища. Варто очікувати, що саме ця характеристика цитогенетичної нестабільності піддається менш жорсткому добору на передмейотичних і мейотичних стадіях поділу генеративних клітин і вносить більший внесок в патологію клітинного поділу ембріонів на ранніх стадіях розвитку, ніж такі параметри, як анеуплоїдія і міжхромосомні асоціації. Зростання частоти стрічання анеуплоїдних та поліплоїдних клітин може свідчити не тільки про дефекти проходження клітинних поділів, але й про активацію міжклітинних аліттів. Очевидно, що збільшення частоти поліплоїдізації клітин за будь-яким механізмом також може

Таблиця 4.  
Характеристики каріотипічної мінливості в клітинах кісткового мозку мишей лінії СС57W/Mv з чорнобильської (Ч) та київської (К) експериментальних популяцій.

Каріоти- пичні характе- ристики	Число метафаз 2n=40		Число метафаз з		Число полі- плоїдів		Число метафаз (%)			Всього метафаз	
	A-1 (%)	A-2	A-1 (%)	A-2	A-1 (%)	A-2	з асоці- аціями Хр	з АРЦХ	з абerra- ціями Хр		
(Ч)	1	50	65	36	17	14	18	13	9	4	103
	2	62	76	25	11	11	13	10	6	5	100
	3	59	71	30	15	11	13	12	13	7	104
	4	44	54	40	27	16	19	19	16	5	37
	5	60	73	25	8	15	19	17	19	5	84
	6	60	65	27	20	13	14	11	11	8	75
	7	51	51	36	24	14	16	9	6	7	101
	8	56	61	24	15	20	23	10	7	3	72
	9	51	66	37	18	12	16	16	14	8	49
середнє	55 $\pm$ 2	65 $\pm$ 3	31 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1	17 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1,6	5,8 $\pm$ 0,7		
(К)	1	64	77	27	12	9	11	6	2	2	100
	2	72	78	15	8	13	14	13	0	0	39
	3	65	76	27	14	9	10	11	1	0	84
	4	72	82	20	9	8	9	10	0	0	51
	5	72	83	22	9	7	8	7	0	2	134
	6	74	89	24	8	2	2	11	0	0	100
	7	67	81	28	12	5	6	13	2	2	130
середнє	69 $\pm$ 1	81 $\pm$ 2	23 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	0,7	0,9		

призводити до появи дефектних гамет та порушень проходження ранніх етапів ембріогенезу.

Таким чином, в проведених дослідженнях в'ясовано, що хронічне іонізуюче опромінювання в малих дозах призводить до істотної дестабілізації геному клітин кісткового мозку мишей ірбредної лінії CC57W/Mv за різними каріотипічними характеристиками. Виходячи з цього можна припустити, що певний внесок у порушення раннього ембріонального розвитку вносить пошкодження механізмів нормального поділу клітин, яке спостерігається в клітинах кісткового мозку мишей під впливом хронічного опромінювання.

#### 4. Дослідження програми регуляції раннього розвитку мишиних ембріонів

Взаємодія головних клітинних компонентів, що постійно перебудовуються - ядра та цитоплазми - є основним змістом етапів доімплантаційного розвитку ссавців. У зв'язку з тим в'ясування питання про рівень цих взаємовідносин, які відбуваються на найперших етапах цитодиференціювання та морфогенезу, може бути одним з підходів до вирішення питання про те, через які механізми програма, що записана в геномі зиготи, реалізує себе в процесі онтогенезу.

На останній час не було відомо якихось експериментів, що остаточно відкидають або підтверджують ідею про наявність в цитоплазмі зиготи морфогенетичних градієнтів. Також нечисленими та суперечливими є дані про механізм біологічного годинника розвитку. Суть проблеми полягає в тому, що ні один з факторів клітинного циклу не є ключовим в індукції перших морфогенетичних процесів у ссавців. Виходячи з вищенаведеного, ми спробували дослідити системи регуляції, що використовуються ранніми зародками ссавців, в першу чергу, роль ядерно-цитоп-

лазматичного співвідношення в індукції процесу кавітації.

**4.1. Матеріали і методи.** В дослідгах було використано мишей С57В1/6. Зародки культивували в середовищі Віттена при підвищеному вмісті  $\text{CO}_2$  (7.5%) у повітрі. Кількість клітин у морулта бластоцист визначали за методом (Tarkowski, 1966). Цитоплазму з клітин видаляли за методикою (McGrath, Solter, 1983). Перемішування цитоплазмами виконували за методом, розробленим Євсіковим (1991).

#### Результати і обговорення

**4.2. Оплазматична сегрегація.** Вважається, що деякий заданий тип дроблення зародка є тим механізмом, за допомогою якого цитоплазматичні інформаційні детермінанти сегрегують по певним бластомерам. Якщо у зиготи миші як і у видів, що стоять філогенетично нижче, є площина білатеральної симетрії або, на крайній випадок, анімальний і вегетативний полюси, то площина першого поділу дроблення повинна орієнтуватися відносно вже існуючої осі анізотропії якимось визначеним чином. При цьому, оскільки друге полярне тіло залишається пов'язаним із зиготою через середнє тіло воно може виконувати роль маркера осі анізотропії оцита.

Морфологічні спостереження були виконані нами на зародках, які розвивалися *in vitro* після ферментативного видалення прозорої оболонки. З'ясувалося, що за відсутності зовнішньої дії з боку прозорої оболонки друге полярне тіло розташовується на поверхні одного з бластомерів де зазвичай, незалежно від взаєморозташування бластомерів. Таким чином, зв'язок між проходженням площини першого поділу дроблення зиготи та гіпотетичним полюсом симетрії зиготи нами знайдено не було. Отже, нами показано, що на ранніх етапах ембріогенезу миші не існує якогось заданого типу дроблення. Незважаючи на наявність неп-

рямих даних, які вказують на те, що ооплазматична сегрегація не відіграє ролі в розвитку ссавців, ніяких експериментів, які остаточно відкидають або підтверджують ідею про наявність в цитоплазмі зиготи морфогенетичних градієнтів, на цей час не було виконано. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є вивчення розвитку зародків, просторова організація цитоплазми яких була порушена. У нашому відділі було розроблено метод, який дозволяє перемішати цитоплазму ооцита, не порушуючи цілісність ні плазматичної ні ядерної мембрани. При цьому просторові градієнти, якщо їх було прелокалізовано в оогенезі або при заплідненні, будуть зруйновані.

Для візуалізації ступеня зруйнування цитоплазми ми використали краплі сіліконової олії, як маркери кортекса яйцеклітини. Після перемішування цитоплазми всі краплини змінили своє розташування. Це свідчить про те, що всілякі прелокалізовані градієнти, які було задано в процесі оогенезу або під час запліднення, були зруйновані перемішуванням. Після перемішування цитоплазми 85% зигот (77 з 91) розвинулися в культурі *in vitro* до морул і бластоцист, та за швидкістю дроблення, морфогенезу та стадії початку кавітації були подібні контрольним зародкам. У трьох випадках через 24 години після перемішування цитоплазми, двоклітинні зародки трансплантували до яйцепроводу самок першого дня псевдовагітності. З дванадцяти трансплантованих зародків три розвинулися до нормальних мишенят.

Ці результати підтверджують висновок про те, що міжклітинна взаємодія є основним механізмом специфікації клітинних ліній, та вісь симетрії (радіальна) з'являється у ембріона миші на стадії морули. Ми вважаємо, що одержаний результат є достатнім доказом того, що у цитоплазмі зигот миші відсутня прелокалізація інформаційних детермінант, та, що індуктивні

міжклітинні взаємодії виявляються єдиним механізмом, що відповідає за предетермінацію бластомерів до різних напрямків диференціювання.

**4.3. Розвиток зигот зі зменшеною кількістю цитоплазми.** На перших етапах розвитку зародка кожний поділ дроблення зменшує обсяг цитоплазми, яка припадає на диплоїдний геном, удвічі. А саме паралельно реплікації ДНК і цитогенезу збільшується і ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС). Якщо механізм "онтогенетичного годинника" містить у собі системи взаємодії ядра і цитоплазми, то ЯЦС цілком може виявитися фактором, який впливає на програму розвитку зародка. З'ясування ролі цитоплазми і ЯЦС у ранньому ембріогенезі свавців можливе при аналізі розвитку зародків, у яких експериментальна зміна цього співвідношення не пов'язана зі зміною на рівні генома. Такої зміни можна досягти шляхом мікрохірургічного видалення частини цитоплазми зиготи.

Розвиток преімплантаційних зародків у культурі йде повільніше, ніж *in vivo*. Це робить можливим вивчення часових параметрів реалізації програми розвитку, порівнюючи швидкості клітинних поділів і морфогенезу зародків, що розвиваються *in vivo* та *in vitro*. Всю подальшу роботу ми вели в основному на зародках мишей лінії C57BL/6. У табл.5 наведено результати підрахунку клітин у зародків на третій день розвитку. Середня кількість клітин, яку обрахували по всім зародкам даного типу, відображує швидкість дроблення. У культурі швидкість клітинних поділів уповільнюється. Зародки, які розвиваються *in vitro* в 1-клітинній стадії, мають на 20% менше клітин, ніж зародки, що розвиваються *in vivo*. А саме в культурі приблизно половина клітин зародка на 90-ту год розвитку ще не проходить п'ятого

Таблиця 5. Розвиток зародків мишей лінії С57BL/6J на 90-ту год (in vivo - на 80-ту год) після овуляції

Умови розвитку зародків; стадія початку культивування	Середня кількість клітин морули і цисти (швидкість поділу)	Бластоцисти, % рання бластоцисти (стадія початку каві-тації)	Бластоцисти, % (швидкість морфогенезу)
In vivo	32,0±0,5(211)	33,6±0,5(116)	65±3
In vitro			
2-клітинні	29,8±0,7(127)	30,0±0,5(78)	71±4
1-клітинні оперовані зиготи	26,1±0,4(326)	28,2±0,2(198)	72±2
зиготи	21,1±0,6(131)	23,0±0,6(72)	59±4

Примітка. У дужках наведено кількість зародків.

поділу. Із табл. 5 видно, що при розвитку in vitro кількість клітин у раних бластоцист помітно зменшується ( $P > 0,999$ ). Результати підтверджують гіпотезу про те, що зменшення кількості клітин негативно впливає на постімплантаційний розвиток зародків. Але при цьому потрібно мати на увазі, що нормальний розвиток мишенят можливий навіть із бластоцист, що розвинулися з окремих бластомерів 2-клітинних зародків, 1, які містять клітин у два рази менше норми.

Після мікрохірургічного видалення частини цитоплазми 93% зигот (236 із 253) розвинулися в культурі до морфологічно нормальних морул і бластоцист. Результати підрахунку клітин подано у табл.5. Швидкість дроблення ембріонів зі зменшеним на

третину об'ємом цитоплазми достовірно нижча, ніж контрольних ( $P > 0,999$ ). Показано, що зиготи зі зменшеним об'ємом цитоплазми проходять перший поділ одночасно з контрольними, очевидно, уповільнення розвитку відбувається на другому - четвертому поділах дроблення.

Результати нашого експерименту по видаленню частини цитоплазми припускають інтерпретацію з точки зору регуляторної ролі цитоплазми. Насправді, ЯЦС, що відповідає стадії запуску кавітації, при зменшенні об'єму цитоплазми буде досягтися після меншої кількості клітинних поділів. Діючи за принципом *reduction ad absurdum*, ми збільшили ЯЦС до максимуму, залишивши на культивування каріопласт зиготи. Деякі каріопласти через добу були двоклітинними, але далі розвиток не пішов. Цей експеримент особливо наочно показує, що основна роль цитоплазми - це підтримка життєдатності ядра.

Наші результати дозволяють зробити припущення, що морфогенез преімплантаційних ембріонів ссавців залежить як від абсолютного часу, який пройшов з початку розвитку, так і від ЯЦС. Той факт, що зародки, які розвиваються *in vitro*, починають утворювати бластоцель при меншій кількості клітин, ніж *in vivo*, вказує на те, що запуск кавітації не залежить ні від кількості циклів реплікації ДНК, ні від ЯЦС. А саме механізми морфогенезу і цитокінезу відносно незалежні один від одного. Результати, одержані при вивченні розвитку зародків зі збільшеним ЯЦС, не спростовують цю гіпотезу.

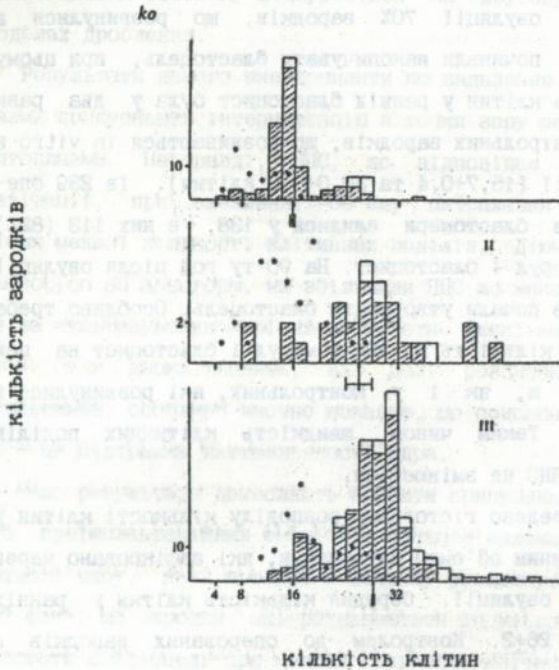
Для перевірки гіпотези про незалежність морфогенезу від ЯЦС ми вивчали розвиток зародків з подвійним об'ємом цитоплазми.

**4.4. Розвиток зародків з подвоєним об'ємом цитоплазми.** Нас цікавило, як впливає експериментальна зміна ЯЦС на процес утворення бластоцелі. При цьому ми вважали, що найбільш коректні

результати можна одержати при вивченні розвитку зародків, у яких зменшення ЯЦС пов'язане не зі зміною плідності, а зі збільшенням об'єму цитоплазми зародка. За нашими даними, на 90-ту год після овуляції 70% зародків, що розвинулися з 1/2-бластомерів, починали накопичувати бластоцель, при цьому середня кількість клітин у ранніх бластоцист була у два рази меншою, ніж у контрольних зародків, що розвиваються *in vitro* з 2-клітинної стадії (15,7±0,4 та 30,0±0,5 клітин). Із 239 оперованих зародків бластомери злилися у 138, з них 113 (82%) розвинулися до морул і бластоцист. На 90-ту год після овуляції лише 6% зародків почали утворювати бластоцель. Особливо треба підкреслити, що кількість клітин у морул і бластоцист на цей час була такою ж, як і у контрольних, які розвинулися з 1/2-бластомерів. Таким чином, швидкість клітинних поділів після зменшення ЯЦС не змінюється.

На мал. 9 наведено гістограму розподілу кількості клітин у зародків з подвоєним об'ємом цитоплазми, які зафіксовано через 90-105 год після овуляції. Середня кількість клітин у ранніх бластоцист - 26±2. Контролем до оперованих зародків є 1/2-бластомери, хоч за ЯЦС бластомер з подвоєним об'ємом цитоплазми відповідає зиготі. Якщо у 1/2-бластомерів 70% бластоцист розвинулися через 50 год культивування, у зигот - через 75 год, то оперовані зародки розвивалися до цієї стадії 60-65 год. За стадією початку кавітації зародки, які розвинулися з бластомерів з подвоєним об'ємом цитоплазми, близькі до зародків, що культивуються з 1-клітинної стадії, для яких середня кількість клітин у ранніх бластоцист 28,2±0,2 (мал.9).

На підставі даних, які маємо, окреслюється такий принцип дії молекулярних механізмів розгортання програми розвитку. Після початку транскрипції першого комплексу генів кожна



Мал. 9 . Розподіл кількості клітин у морулі (●), ранніх бластоцист (■) та бластоцист (○), що розвинулися із: I - 1/2 бластомерів; II - 1/2 бластомерів з подвоєним об'ємом цитоплазми; III - зигот на стадії двох пронуклеусів.

наступна клітинна програма може бути запущена лише після того, як учинена якась морфогенетична дія, наприклад, досягнуто певної концентрації білків - продуктів реалізації попередньої програми. При зменшенні об'єму цитоплазми уповільнюється швидкість посттранскрипційного біосинтезу, але одночасно зменшується і кількість кожного білка, необхідна для досягнення його певної концентрації у цитоплазмі.

Ми вважаємо малоімовірною наявність у цитоплазмі зиготи регуляторних факторів, які, титруючись при дробленні зародка, після певної кількості клітинних поділів дозволяють включитися наступній клітинній програмі. Справедливість цієї гіпотези для риб і земноводних ні в якому разі не доводить можливості її застосування до ссавців, оскільки роль і функції цитоплазми на перших етапах розвитку у цих класів помітно відрізняються.

Вважаємо за потрібне підкреслити, що незалежно від вірності міркувань, наведених вище, результат, одержаний при вивченні розвитку бластомерів з подвоєним об'ємом цитоплазми, потрібно враховувати при інтерпретації результатів клонування ссавців. Справа в тому, що затримка у часі запуску кавітації для ядер, пересаджених у цитоплазму зиготи, наводиться як доказ "перепрограмування" генома. Адже коли ми подвоюємо об'єм цитоплазми у ядра 2-клітинного зародка, утворення бластоцелі затримується майже на 12 год, хоч теоретично передумов для того, щоб говорити про перепрограмування, немає. Очевидно, докази зміни програми розвитку в результаті експерименту треба шукати насамперед на молекулярному рівні.

#### ВИСНОВКИ

1. В результаті взаємодії геному бакуловірусу з геномом клітин комах-хааяїна відмічено суттєве збільшення гетерогенності клітинних і вірусспецифічних РНК, які синтезуються в

процесі розвитку інфекції, що свідчить про значне перепрограмування геному клітин комахи під дією продуктів експресії генному вірусу.

2. Аналіз кількісних і якісних змін у сумарних популяціях ядерних і цитоплазматичних віруспецифічних РНК показав, що в ході репродукції вірусу регуляція експресії його геному відбувається як на транскрипційному, так і на посттранскрипційному рівнях.

3. Взаємодія геному вірусу саркоми Рауса птахів з геномом миші призводить до суттєвої модифікації векторної молекули, яка вводиться. Виявлено дві форми існування стабільних генетичних структур на основі трансгеному: кільцева екстрахромосомна ДНК та інтегрована до геному. В обох випадках відзначено селективну елімінацію послідовностей вірусного геному і консервативність частини структури бактеріальної векторної плазмиди. Регулярна мейотична та мітотична сегрегація автономного трансгеному забезпечується транспозованим сегментом клітинного геному.

4. Наявність екаогенної ДНК, що пройшла зародковим шляхом, у клітинах трансгенних тварин глибоко впливає на функціонування геному реципієнта, що характеризується підвищеною частотою пухлиноутворень, зниженням плодючості, появою летальної мутації і ряду фенотипічних ознак. Індуковані трансгеномом генетичні та фізіологічні зміни є результатом його безпосередньої взаємодії з генетичним матеріалом клітин багатоклітинного організму і свідчить про структурно-функціональну дестабілізацію геному миші.

5. Показано, що хронічний вплив генотоксичного фактору - низькодозового радіоактивного опромінення мишей в процесі онтогенезу призводить до суттєвого зростання

доімплантаційної загибелі ембріонів і глибокої дестабілізації каріотипічних характеристик клітин кісткового мозку мишей. Виявлене порушення перших етапів поділу дроблення зигот, вірогідніше за все, пов'язано з пошкодженням механізмів нормального клітинного поділу на рівні взаємодії геномів опромінених батьківських гамет.

6. Встановлено, що у цитоплазмі зигот миші немає предлокалізації морфогенетичних детермінант, що відповідають за перші етапи цитодиференціювання. За уповільненої швидкості дроблення зародку утворення бластоцелі починається після меншого числа клітинних поділів, що свідчить про відсутність вирішальної ролі ядерно-цитоплазматичного співвідношення у запуску перших морфогенетичних процесів.

7. Вивчення розвитку мікрохірургічно модифікованих ранніх зародків миші дозволило зробити припущення про те, що в ранньому розвитку ссавців беруть участь два типи регуляції основних циклів розвитку: на рівні цитоплазми відбувається регуляція тривалості клітинних циклів, ядро відповідальне за процеси цитодиференціювання і запуску морфогенетичних процесів.

Основні роботи, надруковані за темою дисертації:

1. Соломко А.П., Чистякова А.В., Пономаренко Л.И., Кок И.П. Отделение активной фракции РНК из зараженных вирусом ядерного полиедроза шелкопрядов при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы // ДАН УССР. - 1968. - N 11. - С.1042-1044.
2. Маняков В.Ф., Гудзь-Горбань А.П., Соломко А.П. Димеры вируса ядерного полиедроза // Вопросы вирусологии. - 1971. - N 4. - С. 464-466.
3. Соломко О.П. Вивчення гомології між ядерними та полісомними вірусспецифічними РНК при ядерному поліедрозі великої во-

щинної молі // Мікробіологічний журнал. 1975. - Т.37. - N 1. - С. 113-114.

4. Соломко О.П., Курлянд В.А., Кок І.П. Седиментаційні властивості вірусспецифічних РНК при ядерному поліедрові великої вошинної молі // Мікробіологічний журнал. - 1975. - Т. 37. - N 3. - С. 351-355.

5. Морозова Л.М., Соломко А.П. Микроинъецирование генов. Проблемы их экспрессии и регуляции // Биополимеры и клетка. - 1985. - Т. 1. - N 3. - С. 135-140.

6. Морозова Л.М., Соломко А.П. Взаимодействие клеточных и ретровирусных геномов в онтогенезе мышей // Биополимеры и клетка. - 1985. - Т. 2. - N 2. - С. 59-68.

7. Solomko A.P. Introduction of a new genetic information into mouse embryos // Animal Science Papers and Reports. - 1988. - N 3. - P. 79-81.

8. Соломко А.П., Рындыч А.В., Титок Т.Г., Морозова Л.М., Вагина И.Н., Чащина Л.И., Евсиков С.В., Кириченко И.В., Сарапина Н.А. Трансгенные мыши, полученные на основе плазмид рАТV-8 и рВР322 // Биополимеры и клетка. - 1988. - Т. 4. - N 5. - С. 267-269.

9. Евсиков С.В., Морозова Л.М., Соломко А.П. Роль ядерно-цитоплазматического соотношения в регуляции развития млекопитающих // Биополимеры и клетка. - 1989. - Т. 5. - N 5. - С. 87-93.

10. Строковская Л.И., Петренко А.И., ..., Соломко А.П. Экспрессивный бакуловирусный вектор на основе вируса ядерного полиэдроа кольчатого шелкопряда *Malacosoma Neustria* // Биополимеры и клетка. - 1990. - Т. 6. - N 3. - С. 84-89.

11. Евсиков С.В., Морозова Л.М., Соломко А.П. Роль ядерно-цитоплазматического соотношения в регуляции развития млеко-

питающих. Развитие зародышей с удвоенным объемом цитоплазмы // Биополимеры и клетка. - 1990. - Т. 6. - N 3. - С. 70-74.

12. Evsikov S.V., Morozova L.M., Solomko A.P. The role of the nucleocytoplasmic ratio in development regulation of the early mouse embryo // Development. - 1990. - V. 109. - N 2. - P. 323-328.

13. Столина М.Р., Морозова Л.М., Соломко А.П. Оптимизация системы для проведения генетико-эмбриологических исследований на инбредных линиях мышей. 1. Сравнительная оценка сезонной плодовитости самок мышей линий BALB/cLac, C57BL/6J и ICR // Биополимеры и клетка. - 1992. - Т. 8. - N 2. - С. 49-52.

14. Морозова Л.М., Столина М.Р., Соломко А.П. Оптимизация системы для проведения генетико-эмбриологических исследований на инбредных линиях мышей. 2. Сравнение способности к оплодотворению *in vitro* у инбредных линий мышей C57BL/6J и BALB/cLac // Биополимеры и клетка. - 1992. - Т. 8. - N 3. - С. 33-36.

15. Столина М.Р., Глазко Т.Т., Соломко А.П., Малюта С.С., Глазко В.И. Влияние малых доз хронического ионизирующего излучения на ранние этапы эмбриогенеза у мышей // ДАН Украины. - 1993. - N 6. - С. 171-176.

16. Solomko A.P. Transfer of genetic information in mammalian cells and living organisms // "Gene transfer and regulation of their expression in eukaryots". Ukraine-France advanced school. - Kiev. - 1993. - P. 17-21.

17. Евсиков С.В., Соломко А.П. Влияние пространственной организации цитоплазмы зигот на процессы клеточной дифференцировки в эмбриогенезе мышей // ДАН России. - 1993. - Т. 332. - N 2. - С. 254-256.

18. Evsikov S.V., Morozova L.M., Solomko A.P. Role of ooplasmic segregation in mammalian development // Roux's

Arch.Develop. Biol. - 1994. - N 203. - P. 199-204.

19. Kok I.P., Chistiakova A.V., Gudz-Gorban A.P., Solomko A.P. Infectivity and structure of DNA of the virus of nuclear polyhedrosis of the silkworm // In. XIII Int. Congr. Entomol. - Abstr. papers - Moscow. - 1968. - p. 127.

20. Соломко А.П., Кок И.П., Машковский Н.Н., Добровольская Г.Н. Количественное содержание и синтез РНК и ДНК при ядерном полиэдрозе большой вошинной моли // Тез. Всесоюзного совещания по ветеринарной вирусологии. - Москва, 1974. - С. 30-31.

21. Соломко А.П., Машковский Н.Н., Добровольская Г.Н., Кок И.П. Содержание и кинетика синтеза РНК у большой вошинной моли // I Киевская конференция по патологии членистоногих. Тез. докл. - Киев. - С. 157.

22. Solomko A.P., Tielitchuk S.P., Landau S.M., Kok I.P. Changes of translation apparatus caused by nuclear polyhedrosis virus infecting Galleria Mellonella // In. Int. Collog. Inverfebr. Pathol. - Praque. - 1978. - p. 104.

23. Соломко А.П., Чашина Л.И., Вагина И.Н., Калинина Н.О. Автономные плаамиды у трансгенных мышей // Всесоюзная конференция "Новые направления биотехнологии". Труды. - Пушкино. - 1988. - С. 53.

24. Соломко А.П., Евсиков С.В., Морозова Л.М. Разработка подходов к клонированию млекопитающих // Всесоюзная конференция "Новые направления биотехнологии". - Пушкино. - 1988. - С. 41.

25. Строковская Л.И., Скуратовская И.Н., Веселовский О.В., Мирюта Н.Ю., Соломко А.П. Рекомбинантный вирус КШ в культуре клеток табачной совки // Всесоюзная конференция "Новые направления биотехнологии". Труды. - Пушкино. - 1988. - С. 53.

26. Solomko A.P., Morozova L.M., Vagina I.N., Evsikov S.V., Chashchina L.I. Transgenic mice with integrated sequences of

RSV provirus DNA // Genome. - 1988. - V. 30. - Suppl.

27. Evsikov S.V., Morozova L.M., Solomko A.P. Role of the nucleocytoplasmic ratio in the mouse blastocyst formation // Cell Differentiation Develop. - 1989. - V. 27. - Suppl.

28. Соломко А.П., Столина М.Р. Влияние малых доз хронического ионизирующего излучения и инкорпорированных радионуклидов на плодовитость мышей // Актуальные проблемы ликвидации медицинских последствий аварии на ЧАЭС. - Тез. докл. - Киев, 1992. - С. 214.

29. Столина М.Р., Соломко А.П. Генетические эффекты у самцов черновильской популяции лабораторных мышей СС57W/Mv, индуцированные малыми дозами сочетанного излучения // Конф. СНГ "Актуальные проблемы влияния ионизирующих излучений на репродуктивную функцию". Тез. докл. - Обнинск, 1992. - С. 67.

30. Соломко А.П., Столина М.Р. Анализ репродуктивной функции самок лабораторных мышей СС57W/Mv из черновильской и киевской популяций // Конф. СНГ "Актуальные проблемы влияния ионизирующих излучений на репродуктивную функцию". Тез. докл. - Обнинск, 1992. - С. 69-70.

31. Грабченко Н.И., Столина М.Р., Ильченко О.А., Индык В.М., Соломко А.П. Нарушение активности естественных клеток-киллеров под воздействием малых доз радиации у мышей // Радиобиологический съезд СНГ. Тез. докл. - Киев, 1993. - Ч. 1. - С. 262.

32. Столина М.Р., Соломко А.П. Влияние малых доз сочетанного ионизирующего излучения на доимплантационную гибель зародышей мышей СС57W // Радиобиологический съезд СНГ. Тез. докл. - Киев, 1993. - Ч. III. - С. 964-965.

33. Solomko A.P., Stolina M.R. Effect of low doses of Radiation on fertility of СС57W mice // 1-th Cont. "Medical consequences of Chernobyl accident (Kiev, 1992). Proc. KOLISKA Found. - 1993. - N 1. - P. 19.

Соломко А.П. Исследование структурно-функционального взаимодействия гомо- и гетерологичных геномов в эукариотических системах.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.26 - молекулярная генетика, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1994.

Защищается 33 научных работы, которые содержат материалы экспериментальных исследований межгеномных взаимодействий на моделях вирус-клетка, трансгенные мыши, ранние зародыши линейных мышей. Установлено, что индуцируемые трансгеномом генетические и физиологические изменения являются результатом его непосредственного взаимодействия с геномом клетки и свидетельствуют о структурно-функциональной дестабилизации генома мыши.

Ключевые слова: вирус, геном, трансгеном, зигота мыши.

Solomko A.P. Study of the Structural and Functional Interactions of the Homo- and Heterological Genomes in Eucaryotic Systems.

Doctor of Sciences Dissertation, specialization 03.00.26 - Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1994.

The materials of 33 scientific publications on the studies of the intergenomic interactions on such models, as cell-virus, transgenic mice and early mouse embryos, are defended. It has been established that transgenome-induced genetical and physiological alterations are the result of direct interactions between the cell genome and transgenome, and lead to the structural and functional destabilization of mouse genome.

Key words: Virus, Genome, Transgenesis, Mouse Zygote.

Підписано до друку 19.09.94р формат 60x84/16  
Папір друк. Умов. друк. л. 2,0. Тираж 100 примірник. Заказ МІЗ40  
Надруковано ЦУОП ДНПП "Плодвинконсерв" м. Київ , Сахсаганського ,1

459517

AB 30.911