

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Вагіна Ірина Миколаївна

УДК 575.16
575.22
591.3

РОЛЬ ГЕНОТИПІВ І ЇХ ВЗАЄМОДІЇ У ПРОЦЕСІ
ІНДИВІДУАЛЬНОГО РОЗВИТКУ МИШІ (*MUS MUSCULUS*)

03.00.26 – молекулярна генетика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 1997

577.27

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00751782 (U)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

Науковий керівник: доктор біологічних наук
Соломко Олександр Петрович
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ
зав. від. біохімічної генетики

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор Малюта Станіслав Станіславович
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ
зав від. молекулярної генетики

кандидат біологічних наук
Лакіза Ольга Вікторівна
Український науковий гігієнічний центр МОЗ України, м. Київ
ст.н.с.

Провідна установа: Інститут розведення і генетики тварин
Української Академії Аграрних Наук,
м. В. Олександрівка

Захист відбудеться 25 листопада 1997 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.86.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 252143, м. Київ-143, вул. академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, 252143, м. Київ-143, вул. академіка Заболотного, 150.

Автореферат розісланий 23 жовтня 1997 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради кандидат біологічних наук

Лукаш Л.Л.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Процес становлення організмів в індивідуальному розвитку вже не перше століття знаходиться в центрі уваги біологів, однак більшість проблем, які стосуються, у першу чергу, механізмів реалізації програми пренатального онтогенезу, все ще далекі від свого вирішення. Ранній розвиток ссавців характеризується подвійним генетичним забезпеченням, а саме: генопродуктами, що накопичилися в організмі, а також генопродуктами, які утворилися в результаті транскрипції і трансляції генів зародків. Контролюючі механізми доімплантаційного розвитку ссавців включають у себе взаємодії між материнською генетичною інформацією, яка реалізується в оогенезі, та генетичною інформацією "ранніх генів" зародків, що реалізується в ході дроблення, а також епігеномними механізмами, у тому числі розташуванням, кількістю і властивостями бластомерів [Дибан, 1987]. Уже на доімплантаційній стадії розвитку суттєве значення мають генетично зумовлені взаємовідносини матері зі своїми майбутніми нащадками. Найменша невідповідність у взаємних реакціях ембріона з матір'ю може призвести або до втрати зародків, або до виникнення серйозних морфологічних аномалій. Сучасний рівень пізнання механізмів пренатального розвитку ссавців не дозволяє відтворити *in vitro* ті складні регуляторні механізми, що беруть участь у розвитку зародків ссавців *in vivo*. Разом з тим мікрomanipуляції з доімплантаційними зародками, у тому числі і з введенням чужорідної ДНК, використовуються для вивчення раннього ембріогенезу. Наслідком згаданих процедур є, як правило, зниження життєздатності ембріонів, що виражається в зменшенні кількості клітин у частини бластоцист у момент імплантації. У свою чергу, подовження доімплантаційного періоду дозволяє таким зародкам збільшити кількість клітин перед імплантацією і в подальшому успішно імплантувати. У зв'язку з вищевикладеним видається важливим оцінити здатність до імплантації та виживання зародків мишей з різною клітинною масою, які розвивалися в експериментально створених умовах затримки імплантації; з'ясувати, яка роль взаємодії генотипів матері та ембріона на ранніх стадіях ембріогенезу; вивчити взаємовплив чужорідного геному та геному хазяїна.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження здійснювалися в рамках тематичних планів ІМБіГ НАНУ № 2.34.1.3 "Дослідження структури та стабільності трансгеномів у системі *in vivo*" (1987-1990); № 2.34.1.3 "Вивчення регуляції експресії геному на ранніх стадіях ембріогенезу миші" (1991-1995) і № 2.28.7.2 "Дослідження ядерно-цитоплазматичних взаємодій в доімплантаційному розвитку миші"

(1996-2000), а також підтримані грантами Державного Фонду Фундаментальних Досліджень України № 5.2/3, № 5.4/172 і грантом МНФ № U47000.

Мета і задачі дослідження. Ціль роботи полягала у з'ясуванні залежності пренатального розвитку мишей від генотипічних і морфологічних відмінностей зародків, а також у визначенні поведінки екзогенної ДНК і фенотипічних ефектів, зумовлених її взаємодією з геномом хазяїна. Виходячи з мети дослідження були поставлені наступні завдання:

1. Вивчити вплив взаємовідносин мати-нащадок на розвиток і виживаність зародків мишей різних генотипів при внутрішньо- та міжлінійних трансплантаціях.

2. Оцінити особливості розвитку ембріонів мишей різних інбредних ліній в оптимізованих умовах культивування *in vitro*.

3. Проаналізувати наслідки взаємодії чужорідної ДНК, мікроін'єктованої у пронуклеуси зигот мишей, з геномом хазяїна.

4. Оцінити вплив затримки імплантації на розвиток бластоцист мишей, які розвивалися *in vivo* та *in vitro*.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлено, що в умовах штучно створеної діпаузи бластоцисти, які розвиваються *in vitro* та мають зменшену кількість клітин на момент кавітації, як правило, наздоганяли за цим показником бластоцисти, що розвивалися *in vivo*. Дані з розвитку зародків, отриманих в результаті мікрomanipуляцій (1/2 ембріонів, тетраплоїди, ембріони з половинним ядерно-цитоплазматичним співвідношенням -ЯЦС), дозволяють з достатньою вірогідністю визначити фактори, що зумовлюють готовність бластоцистів до імплантації. Суттєве збільшення ваги алогенних і сингенних ембріонів, які розвивалися разом, підтверджує уявлення про важливість генетичних розбіжностей у системі мати-плід для сприятливої реалізації генотипічних потенцій ембріонів, які розвиваються. Показано, що успіх розвитку зигот *in vitro* залежить від їх генотипічних особливостей і біологічного віку (часу, що минув з моменту запліднення). Відмічено повну елімінацію вірусоспецифічних послідовностей векторної молекули в результаті взаємодії геному миші з інтегрованою геномною ДНК вірусу саркоми Рауса птахів.

Практичне значення одержаних результатів. Для підвищення успіху трансплантації зародків різних видів тварин необхідно підібрати оптимальні поєднання мати-плід, у тому числі за генотипічною належністю. Розроблена модель затримки імплантації перспективна як система для підвищення життєздатності ембріонів, які піддавалися різним експериментальним маніпуляціям, що призводили до зменшення кількості клітин у бластоцистів. При культивуванні *in vitro* необхідно враховувати, що краще розвиваються зиготи, отримані через 26-28 год. після запліднення,

які мають два чітко видимі пронуклеуси, розташовані близько від центра зиготи.

Особистий внесок здобувача. Основні результати, викладені в дисертації, одержані автором самостійно.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було оприлюднено на: 5-му Українському біохімічному з'їзді (Івано-Франківськ, вересень 1987 р.); Всесоюзній конференції "Нові напрямки біотехнології" (Пушино, Росія, жовтень 1988 р.); Міжнародному генетичному конгресі (Торонто, Канада, серпень 1988 р.); школі-конференції "Структура і функції біополімерів" (Львів, лютий 1989 р.); 27-му Конгресі Товариства з вивчення репродукції (Мічиган, США, липень 1994 р.); робочій нараді "Консервація генетичних ресурсів" (Пушино, Росія, травень 1996 р.); на міжвіддільському семінарі ІМБіГ НАН України (травень 1997 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 6 статей у наукових журналах і 6 тез доповідей.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, підсумків і висновків. Роботу викладено на 147 сторінках. Ілюстративний матеріал представлений 12 таблицями і 10 рисунками. Список літературних джерел охоплює 283 найменування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі використано 1,5-3-місячних мишей інбредних ліній BALB/c, CBA/Lac, C₅₇Bl/6j, ICR, а також гібридних мишей B6D2F1 (BALB/c×C₅₇Bl/6j).

Отримання зародків і типи пересадок, використані при вивченні розвитку і виживаності зародків мишей при внутрішньо- та міжлінійних трансплантаціях. Для одержання зародків певної стадії розвитку віргінних самок підсаджували до самців тієї ж лінії на ніч. Факт покриття встановлювали за наявністю вагінальних пробок і день їх виявлення вважали нульовим днем вагітності. Триденні зародки вимивали з матки середовищем 199 і пересаджували у лівий ріг матки псевдовагітним самкам. Пересадки зародків здійснювали за методиками, описаними раніше [McLaren, Michie, 1956; Дьбан, 1974; Евсиков, Морозова, 1977], з нашими модифікаціями. Були проведені наступні типи пересадок: міжлінійні; внутрішньолінійні; спільні - в один ріг матки самок-реципієнтів пересаджували однакову кількість зародків однієї стадії розвитку двох фенотипово відмінних ліній; синхронні (3→3) - триденні зародки пересаджували самкам-реципієнтам третього дня псевдовагітності та асинхронні (3→2) - триденні зародки переносили самкам другого дня псевдовагіт-

ності. Контролем слугували зародки тієї ж лінійної належності, отримані при чистолінійному розведенні. На 16-й день вагітності враховували число резорбованих, імплантованих і живих плодів, зважували їх, а лінійну належність визначали за пігментацією очей.

Гормональна стимуляція, виділення та культивування зародків.

Самок гормонально стимулювали, як описано [Hogan et al., 1986]. Були випробувані різні дози ГСЖК (гонадотропін сироватки жеребих кобил) і ХГЛ (хоріонічний гонадотропін людини). Зиготи на стадії двох пронуклеусів вимивали з яйцепроводів розчином культурального середовища через різні проміжки часу після введення ХГЛ. Зародки культивували до стадії бластоцистів при 37°C в пластикових чашках Петрі в мікрокраплях середовища Віттена [Whitten, 1971] з додаванням Na_2 - ЕДТА.

Отримання і аналіз трансгенних тварин. Для здійснення мікроін'єкцій як донорську використовували ДНК плазмиди рАТВ8. Мікроін'єкції проводили у чоловічий пронуклеус зигот за допомогою мікроманіпулятора КМ-2, вводячи по 200-400 копій плазмиди на зиготу та пересаджуючи їх надалі у яйцепроводи псевдовагітних самок. Дот-блот-аналіз здійснювали за методами [Palmiter, 1983; Southern, 1975].

Отримання зародків різних типів в результаті мікроманіпуляцій, їх трансплантація і підрахунок кількості клітин. Як донорів зародків використовували самок гібридних мишей В6D2F1. Було отримано чотири типи ембріонів: контрольні, які розвивалися *in vivo* або *in vitro* з одноклітинної стадії; диплоїдні половинки (1/2 ембріона), отримані внаслідок проколювання плазматичної мембрани одного бластомера двоклітинного зародка; тетраплоїдні, отримані при культивуванні зигот *in vitro* у присутності цитохалазину D (0,5 мг/мл) протягом 20 год.; диплоїдні половинки з подвоєним вмістом цитоплазми (зменшене наполовину ЯЦС), отримані мікрохірургічним видаленням одного з ядер у тетраплоїдних половинках ембріонів. Бластоцисти (не більше 10) перенесли в обидва роги матки або в ампули яйцепроводів [Pease et al., 1989; Монк, 1990] псевдовагітних самок лінії ICR; вагітним самкам-реципієнтам - по 3-5 бластоцистів в один ріг матки або в один яйцепровід. При врахуванні динаміки числа клітин триденні бластоцисти було розділено на дві групи: частину використано для підрахунку кількості клітин, решту перенесли у яйцепровід самок нульового дня псевдовагітності. Через три дні їх вимивали з матки і підраховували кількість клітин за методиком [Dyban, 1983] з наступним фарбуванням Гімза. Статистичну обробку здійснювали з використанням критерію Ст'юдента і аналізу χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

РОЗВИТОК І ВИЖИВАНІСТЬ ЗАРОДКІВ МИШЕЙ ПРИ ВНУТРІШНЬО- І МІЖЛІНІЙНИХ ТРАНСПЛАНТАЦІЯХ

Система відтворення свавців тісно пов'язана з забезпеченням життєздатності потомства, починаючи з самих ранніх стадій вагітності. Суттєву, хоча все ж недостатньо вивчену роль у встановленні життєздатності особин наступного покоління відіграють взаємовідносини мати-нащадок. Одним з найадекватніших підходів до з'ясування ролі генетичної компоненти у предетермінації таких взаємовідносин є метод трансплантацій бластоцист. В багатьох випадках у трансплантованих зародків спостерігався ефект, аналогічний гетерозису: вага ембріонів одного й того ж генотипу в умовах алогенного і сингенного розвитку суттєво відрізнялася.

Таблиця 1

Вага 16-денних плодів мишей, отриманих при асинхронних пересадках

Лінійна належність		Кількість		Маса плодів, мг (M±m)
плодів	самок-реципієнтів	самок	плодів	
CBA	BALB	6	12	568,3±22,6**†
	BALB з зародками BALB	10	12	588,1±35,1***†
	CBA	13	24	509,8±12,9
	CBA з зародками BALB	8	9	558,0±39,7
C ₅₇ B1	BALB з зародками BALB	12	15	607,2±27,5***†
	C ₅₇ B1	11	18	511,0±24,9
	BALB	7	13	609,2±20,9***††
BALB	BALB з зародками CBA	7	10	696,6±33,5***
	BALB	7	10	521,9±25,7
	BALB з зародками C ₅₇ B1	9	12	664,4±34,8***†
	CBA з зародками CBA	10	3	574,6
Конт- роль	CBA	6	17	476,4±20,5
	C ₅₇ B1	10	23	493,7±9,5
	BALB	9	28	498,2±19,2

Примітка. Різниця в масі достовірна а)*- по відношенню до контролю; при **P>0,99 і при ***P>0,999; б)†- по відношенню до внутрішньолінійної пересадки при †P>0,95 і ††P>0,99.

Аналіз ваги 16-денних плодів, що розвивалися із синхронно та асинхронно пересаджених зародків, свідчить про відсутність достовірної різниці в масі плодів BALB, CBA і C₅₇B1, отриманих при синхронних та асинхронних пересадках. Крім того, їх вага при асинхронних внутрішньолінійних пересадках не відрізнялася від ваги плодів тієї ж лінійної належності з аналогічних послідів контролю. З'ясувалося, що плоди CBA, які розвивалися у матерів BALB самостійно або спільно з плодами BALB, були достовірно важчі плодів аналогічного генотипу, що розвивалися в матерях CBA (табл. 1). Така ж закономірність спостерігалася при самостійному та спільному з BALB розвитку плодів C₅₇B1 в самках BALB. Вони значно перевищували в вазі плоди генотипу C₅₇B1, отримані в результаті

внутрішньолінійних пересадок і в контролі. Виявлено також збільшення ваги сингенних плодів BALB, які розвивалися з алогенними плодами СВА і С₅В1 після їх спільної пересадки самкам BALB. Подібна тенденція зберігалася для плодів СВА, які виношувалися самками СВА спільно з ембріонами BALB. Скоріш за все, збільшення ваги алогенних плодів не є наслідком відбору на виживання або асинхронності пересадок. Інакше внутрішньолінійні пересадки супроводжувалися б збільшенням ваги плодів, які вижили, чого насправді не спостерігалось. Збільшення ваги алогенних плодів, можливо, зумовлено материнсько-плідними генетичними розбіжностями. Таким чином, при міжлінійних і спільних пересадках зародків мишей використаних ліній знайдено суттєве збільшення ваги алогенних та сингенних ембріонів, що розвивалися сумісно з ними. Це може свідчити про те, що при певному рівні генетичних розбіжностей матері і плоду в організмі матері складаються сприятливі умови для реалізації генотипічних потенцій ембріонів, які розвиваються.

ОПТИМІЗАЦІЯ СИСТЕМИ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ГЕНЕТИКО — ЕМБРІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ НА ІНБРЕДНИХ ЛІНІЯХ МИШЕЙ

Особливості виконання експериментів з вивчення ряду проблем біології розвитку пов'язані з необхідністю створення оптимальних умов для гормональної стимуляції самок, а також для культивування in vitro зародків на доімплантаційній стадії розвитку. Для того щоб проаналізувати розвиток зародків мишей різних генотипів in vitro та підібрати оптимальні умови для введення гетерологічної ДНК у пронуклеус запліднених яйцеклітин, було здійснено оптимізацію системи для генетико-ембріологічних досліджень. Введення екзогенних ДНК у пронуклеус запліднених яйцеклітин миші дозволяє створити модель, за допомогою якої можна досліджувати перенесені гени у процесі розвитку організму та, що особливо важливо, прослідкувати їх подальшу долю, вплив на метаболізм, продуктивність і інші життєво важливі функції.

Створення і вивчення умов успішного підтримання розвитку зародків мишей у системі in vitro

Було підібрано оптимальні дози гормонів для суперовуляції самок мишей інбредних ліній ICR, СВА/Лас, С₅В1/6j і гібридних самок В6D2F1. Результати досліджень з підбору оптимальних доз гонадотропінів підтвердили положення стосовно того, що одним з найважливіших факторів, які контролюють суперовуляцію, є генотип миші [Schmidt et al., 1987; Межевікіна та ін., 1991]. Щоб створити умови для успішного підтримання розвитку зародків мишей у системі in vitro, було випробувано різні ку-

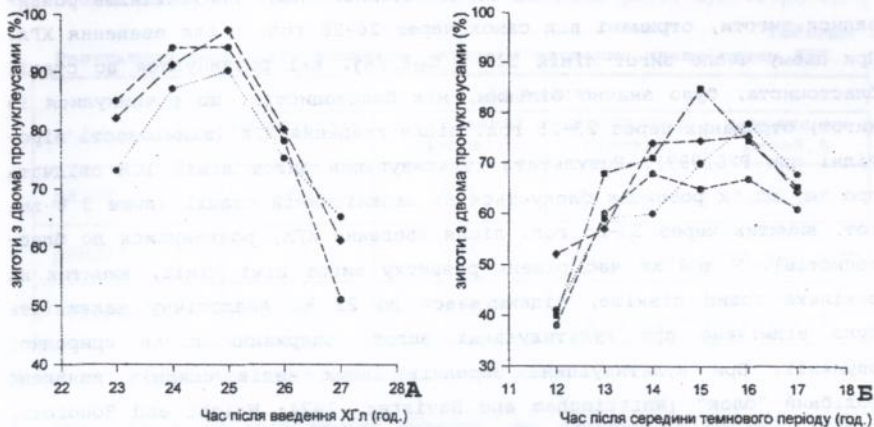


Рис.1. Сезонна динаміка розвитку пронуклеусів у зиготах мишей лінії ICR після суперовуляції (1А) і природної овуляції (1Б)

—●— зима —●— літо
—○— весна —■— осінь

льтуральні середовища. Найкращим за результатами випробувань було визнано середовище Віттена [Whitten et al., 1971]. Визначення часових параметрів чіткого виявлення пронуклеусів є одним з найважливіших критеріїв запліднюваності яйцеклітин. Ми відбирали і аналізували зиготи з двома чітко видимими пронуклеусами, розташованими близько від центра зиготи. Так, при індукованій овуляції у самок ICR на 23-тій год. після введення ХГл більше 80 % зигот були з чітко видимими пронуклеусами, протягом наступних 2-3 год. їх кількість сягала максимуму, а далі різко знижувалася на 26-ту год. (рис. 1,А). При цьому обидва пронуклеуси, об'єднавшись, вступали у метафазну стадію розвитку. Після суперовуляції у самок спостерігалася синхронізація у часі розвитку пронуклеусів, а динаміка запліднюваності яйцеклітин була односпрямованою незалежно від пори року. У той же час у самок з природною овуляцією виявлено великий розкид у часі розвитку пронуклеусів (рис. 1,Б), що свідчить про нерівномірність визрівання і овуляції яйцеклітин у статевозрілих самок при природному перебізі цього процесу. Такі ж закономірності було виявлено у самок всіх використаних ліній. Однак у самок C₅₇Bl/6j максимальна кількість зигот з двома чітко видимими пронуклеусами спостерігалася на 1,5-2 год. раніше, ніж у самок ICR і CBA/Lac. При культивуванні зигот мишей трьох ліній знайдено лінійні відмінності у здатності ефективно розвиватися до бластоцистів за умов *in vitro*. При цьому найуспішніше з усіх розвивалися зиготи мишей лінії C₅₇Bl/6j, потім CBA/Lac, а зиготи лінії ICR у переважній більшості зупинялися на двоклітинній стадії. Цілком вірогідно, що відмічені розбіжності у розвитку зигот в системі

in vitro зумовлені їх генотипічними особливостями. Найуспішніше розвивалися зиготи, отримані від самок через 26-28 год. після введення ХГл. При цьому число зигот ліній ICR і C₅₇Bl/6j, які розвинулися до стадії бластоциста, було значно більшим, ніж бластоцистів, що розвинулися із зигот, отриманих через 23-25 год. після введення ХГл (відмінності вірогідні при P>0,999). Результати культивування зигот лінії ICR свідчать про те, що їх розвиток блокується на двоклітинній стадії (лише 5 % зигот, вимитих через 23-25 год. після введення ХГл, розвинулися до бластоцистів). У той же час рівень розвитку зигот цієї лінії, вимитих на декілька годин пізніше, підвищувався до 22 %. Аналогічну залежність було відмічено при культивуванні зигот, одержаних після природної овуляції. При культивуванні зародків інших видів ссавців виявлено подібний "блок" [Whittingham and Bavister, 1974; Wright and Bondioli, 1981] на різних стадіях дроблення, які відповідають переключенню контролю ембріогенезу з материнського геному (на посттранскрипційному рівні) на ембріональний [Telford et al., 1990]. Результати наших експериментів з культивування зигот мишей свідчать про те, що успіх розвитку *in vitro* залежить від їх генотипічних особливостей та біологічного віку. Блокування розвитку зародків лінії ICR з певною часткою вірогідності вдається подолати при культивуванні зигот, отриманих через 26-28 год. після введення ХГл.

Трансгенні миші, отримані мікроін'єкуванням плазмід рATV8 і рBR322

Для мікроін'єкування як донорську було використано ДНК плазмиди рATV8, створеної на основі плазмиди рBR322 і провірусної ДНК вірусу саркоми Рауса курей [Katz et al., 1992]. Головним завданням нашого дослідження було з'ясування впливу ефекту мікроін'єкування чужорідної ДНК на виживаність і життєздатність зародків мишей, а також прослідкувати наслідування вбудованого трансгеному та його дію на життєздатність і плодючість наступних поколінь. Було встановлено (табл. 2), що успіх виживання самками зародків, ін'єкованих плазмідною рATV8, нижчий порівняно з контрольною групою, де пересаджували зародки, які піддавалися усім маніпуляціям, крім ін'єкцій. Аналогічна закономірність спостерігалася і для самок при трансплантації їм зародків, мікроін'єкованих плазмідною рBR322. З'ясувалося, що виживаність зародків в разі ін'єкції плазмиди рATV8 була нижчою, ніж при введенні плазмиди рBR322 (розбіжності вірогідні при P>0,999). Можна припустити, що особливості структури плазмиди рATV8 та її досить великий розмір (14 тис.п.н.) є основними чинниками підвищеної частоти летальних пошкоджень зародків порівняно з плазмідною рBR322. За даними дот-блот-гібридизації міченої ³²P ДНК плазмид рATV8 і рBR322 з тотальною високополімерною ДНК мишей, кількість

трансгенних тварин у серії з введенням плазмиди рАТV8 була вірогідно

Таблиця 2

Результати пересадки зародків, мікроін'єкованих плазмідними ДНК

Ін'єкована ДНК	Кількість			
	реципієнтів	ін'єкованих зародків	народивших самок, %	народжених мишей, %
рАТV8	80	821	31 (38,8±5,5)	84 (10,2±1,0)
рВR322	25	294	14 (56,0±9,9)	60 (20,4±2,3)***
Контроль	39	496	27 (69,2±7,4)***	83 (16,7±1,7)***

Примітка. Розбіжності вірогідні при *** $P > 0,999$.

більшою (24 з 52 досліджених мишенят, що складає 46,2±6,9%), ніж в серії з введенням плазмиди рВR322 (8 з 40, що становить 20,0±6,3%).

Інтеграція ДНК плазмиди рАТV8 і модифікація її структури у трансгенних мишей

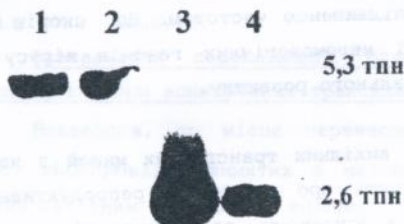


Рис. 2. Аналіз тотальної ДНК трансгенних мишей покоління F0, зонд ^{32}P рАТV-8. Миші: 1-В1, 2-В6, 3-В9, 4-В14.

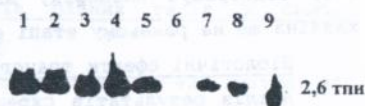


Рис.3. Блот-аналіз геномної ДНК трансгенних мишей сублінії В9, рестрикція EcoRI, зонд ^{32}P рВR-322. 1-9 трансгенні миші покоління F0-F5.

Аналіз тотальної ДНК з хвостів мишей F0 показав, що при рестрикції ендонуклеазою EcoRI, яка має на плазмиді рАТV8 чотири сайти рестрикції, у різних сублініях виявляється по одному фрагменту різного розміру (рис. 2). Молекулярна маса фрагментів знаходилася в межах від 2,6 до 5,3 тис.п.н., що суттєво менше, ніж у ін'єкованої плазмиди рАТV8 -14 тис.п.н. Після внутрішньолінійного схрещування вихідних трансгенних мишей ICR з нормальними особинами було виявлено кількісні відмінності в успадкуванні чужорідної ДНК. У сублініях В9 і В14 її успадкувало біля половини нащадків, а в сублініях В1 і В6 - більше 80%. Для дослідження структури інтегрованої послідовності ми вивчали тотальну ДНК мишей, похідних від В9. Як позитивний контроль використано ДНК плазмиди ВR322

(різні розведення в суміші з ДНК нормальних мишей). У першій серії експериментів після розщеплення ДНК нуклеазою EcoRI і гібридизації з міченою ДНК pBR322 в усіх препаратах ДНК трансгенних мишей різних поколінь (F0-F5) цієї сублінії був виявлений один фрагмент (рис.3). Гібридизація з провірусною ДНК вірусу саркоми Рауса і її клонованими фрагментами дала від'ємний результат, що свідчить про селективну елімінацію провірусних послідовностей із структури інтегрованого трансгеному. Розмір виявленого фрагмента дорівнював 2,6-2,7 тис.п.н. Було також встановлено, що екзогенна послідовність інтегрована у геному ДНК трансгенних мишей сублінії B9-5 у кількості однієї неповної копії введеної послідовності (0,5 геному pBR322 або 1/6-1/7 геному pATV8). Таким чином, в разі інтеграції плазмиди pATV8 ми виявили елімінацію практично усіх провірусних послідовностей і більшої частини послідовностей бактеріальної векторної плазмиди pBR322. Подібну селективну елімінацію послідовностей вірусного Tk-гена відмічено в роботах [Газарян та ін., 1984; Газарян, 1985; Кузнецова та ін., 1989]. Механізм селективної елімінації специфічних вірусних послідовностей поки що невідомий, однак необхідно зазначити, що геномі вірусні послідовності у непермісивній для вірусу системі елімуються з підвищеною частотою. Це, скоріш за все, відображує специфіку взаємодії негомологічних геномів вірусу і хазяїна ще на ранньому етапі ембріонального розвитку.

Біологічні ефекти трансгенозу

Аналіз результатів схрещування вихідних трансгенних мишей з нормальними мишами цієї ж лінії свідчить про порушення репродуктивної функції у деяких трансгенних самок, в основному, за рахунок підвищення ембріональної смертності. Суттєве порушення репродуктивної здатності відмічено також і в поколінні F1 трансгенних самок. У сублінії B6 серед нащадків другого і третього поколінь виявлено мертвонароджених мишенят з різним ступенем недорозвиненості хвостів. При вивченні впливу чужорідної ДНК на частоту виникнення новоутворень у трансгенних мишей здійснювали порівняння з контрольними тваринами цієї ж лінії ICR, яка характеризується підвищеним рівнем спонтанних пухлин молочної залози. Внутрішньовіковий аналіз показав, що частота виникнення новоутворень у вихідних трансгенних самок (F0) складає 73 ± 12 %, тоді як у контрольній групі цей показник становить 31 ± 4 % (дані достовірні при $p=0,999$). У поколінні F1 трансгенних самок виявлено аналогічну закономірність. При порівняльному аналізі частоти виникнення новоутворень у трансгенних самців певної закономірності не виявлено. Трансгенні миші обох статей у віці від 6 місяців мали дефекти шкіри, випадіння шерсті, виразки на тілі та вухах, а також порушення координації руху - нейропатії. У нас-

тупних поколіннях рівень прояву цих порушень змінювався, однак вони постійно виявлялися і, більш того, у поколіннях F3-F5 з'явилися миші з феноменом "мокрої шерсті" з дефіцитом ваги. Таким чином, аномалії розвитку та підвищений рівень новоутворень, очевидно, є наслідком інтеграції у геном миші екзогенної послідовності. Найвірогідніше, що інтеграція відбулася поблизу генів, які відповідають за ранні етапи розвитку зародків. Це могло вплинути на регуляцію їх експресії і призвести до виявлених нами негативних наслідків онтогенезу.

ФАКТОРИ, ЯКІ ВИЗНАЧАЮТЬ ГОТОВНІСТЬ БЛАСТОЦИСТ МИШЕЙ ДО ІМПЛАНТАЦІЇ

Для з'ясування закономірностей регуляції розмірів доімплантаційних зародків було створено експериментальну модель затримки імплантації. Стан діпаузи моделювали за допомогою високоасинхронних переносів бластоцист до яйцепроводів самок нульового дня псевдовагітності. Знижена життєздатність зародків, культивованих *in vitro* або таких, що піддавалися мікроманіпуляціям, зумовлена зменшенням кількості клітин у бластоцистів на момент імплантації. Подовження доімплантаційного періоду дозволяє таким зародкам збільшувати кількість клітин перед входженням у стан діпаузи.

Вживаність пересаджених бластоцистів різних типів у самок-реципієнтів при асинхронних трансплантаціях

Виявилось, що місце перенесення бластоцистів (3→2, матка або 3→0, яйцепровід), вимитих з матки мишей на третій день вагітності, псевдовагітним самкам не впливало на рівень їх виживаності (табл.3). При цьому для повністю життєздатних бластоцистів ні число імплантацій, ні виживаність на постімплантаційній стадії не підвищувалися за допомогою високоасинхронного перенесення. Після перенесення бластоцистів, які розвивалися *in vitro*, у яйцепроводи самок нульового дня псевдовагітності частка живих ембріонів на 16-й день розвитку була такою ж, як і після перенесення бластоцистів, що розвивалися *in vivo* (табл.3). Половинки ембріонів мали такий же відсоток імплантацій, як контрольні зародки, після перенесення у протилежний яйцепровід - 62 і 74 % відповідно. Однак частка зародків, які вижили була значно ($P > 0,999$) нижчою для половинок ембріонів (15 %), ніж для контрольних (52%). Очевидно, знижена життєздатність половинок зародків викликана невідповідною реакцією сприйнятливої матки псевдовагітних самок-реципієнтів. Найвищий відсоток виживаності ($P > 0,95$) було відмічено при переносі бластоцист, які розвивалися *in vivo*, вагітним самкам-реципієнтам (табл. 3). Підвищення рівня виживаності на постімплантаційній стадії спостерігалось

також при перенесенні половинок зародків (29 % плодів, які вижили у вагітних самок і 15 % - у псевдовагітних).

Таблиця 3

Вживаність пересаджених бластоцистів у самок-реципієнтів

Реципієнти, місце пересадки	Типи ембріонів, умови розвитку	Число вагітностей до числа реципієнтів, %	Кількість ембріонів (лише у вагітних самок)		
			Пересаджених	Імплантуваних, %	Живих на 16-ту добу, %
Псевдовагітні, матка	Бластоцисти, <i>in vivo</i>	94	171	132 (77)	91 (53)
Псевдовагітні, ПЯ и ЛЯ	Бластоцисти, <i>in vivo</i>	86	120	80 (67)	57 (48)
Псевдовагітні ♦	ПЯ Бластоцисти, <i>in vitro</i>	100	102	75 (74)	53 (52)
	ЛЯ Бластоцистів, <i>in vitro</i>		111	69 (62)	17 (15)
Вагітні, ЛЯ	Бластоцисти, <i>in vivo</i>	68	47	НВ	31 (66)
Вагітні, ЛЯ	Бластоцистів, <i>in vitro</i>	50	35	НВ	10 (29)

Примітки: 1. Пересадки в матку здійснювали на 2-й день, в правий (ПЯ) або лівий (ЛЯ) яйцепроводи - в нульовий день. 2. ♦ - як інтактні, так и 1/2 бластоцистів пересажували одним и тим же самкам-реципієнтам. 3. НВ - неможливо визначити.

Розвиток різних типів бластоцистів мишей в експериментально створених умовах затримки імплантації

Для з'ясування закономірностей регуляції розмірів бластоцистів визначали кількість клітин у них у той час, коли бластоцисти могли б за норми починати імплантацію, і через три дні після високоасинхронного перенесення, коли насправді спостерігалася доімплантаційна стадія. В умовах культивування *in vitro* значно сповільнювався розвиток та зменшувалася кількість клітин у бластоцистів через 96 год. після введення ХГл (табл. 4). При культивуванні зигот у середовищі без ЕДТА кількість клітин у бластоцистів зменшувалася наполовину ($28,2 \pm 0,7$ порівняно з $60,5 \pm 1,4$ клітин у контролі). Однак бластоцисти, які розвивалися як *in vivo*, так і культивовані *in vitro*, через три дні після перенесення у яйцепровід вирівнювалися в розвитку, досягаючи однакової кількості клітин - 110. Зародки, що розвивалися з одиничних бластомерів двоклітинних ембріонів, на кожній стадії розвитку мали половинний набір клітин порівняно з інтактними зародками. З іншого боку, протягом трьох днів затримки імплантації кількість клітин у половинках бластоцистів також збільшувалася і складала у середньому $49,9 \pm 2,0$, що вже є порівняним з кількістю клітин в інтактних бластоцистах на день імплантації - $60,5 \pm 1,4$. Для виявлення факторів, які визначають стан спокою бластоцистів, було отримано тетраплоїдні зародки і половинки зародків

Кількість клітин у бластоцистів до і через 3 дні після пересадки в яйцепроводи псевдовагітних самок

Умови культивування, типи ембріонів	ЯЦС на 2-кл. стадії	Кількість бластоцист на 96-ту год після введення ХГЛ, %	Кількість клітин у бластоцист на 96-ту год після введення ХГЛ	Кількість клітин у бластоцист на 190-ту год після введення ХГЛ
<i>In vivo</i>	[2N/C]x2	90 [151/164]	60,5 ± 1,4 °	111,0 ± 3,7 °
<i>In vitro</i>	[2N/C]x2	75 [223/298]	38,7 ± 0,9 °	109,3 ± 2,5 °
<i>In vitro</i> , без ЕДТА	[2N/C]x2	82 [145/177]	28,2 ± 0,7 °	107,2 ± 3,5 °
<i>In vitro</i> , ЧемБріонів	[2N/C]	73 [288/395]	17,8 ± 0,8 °	49,9 ± 2,0 °
<i>In vitro</i> , тетраплоїди	[4N/2C]	85 [67/79]	16,8 ± 0,9 °	51,9 ± 3,8 °
<i>In vitro</i> , ЧемБріонів із зменшеним ЯЦС	[2N/2C]	27 [64/238]	17,7 ± 1,1 °	70,5 ± 2,4 °

Примітки: 1. ЯЦС – ядерно-цитоплазматичне співвідношення. 2. 2N – диплоїдне ядро. 3. С – об'єм цитоплазми одного бластомера двоклітинного зародка. 4. У кожній колонці групи із статистично вірогідними (P>0,999) розбіжностями по числу клітин відмічено різними буквами.

із зменшеним наполовину ЯЦС. Після перенесення бластоцистів у яйцепроводи самок нульового дня псевдовагітності та їх наступного вимивання на 3-й день отримували бластоцисти шестиденного віку, синхронізовані під час затримки імплантації і реактивовані у матці на день вимивання. Під час затримки імплантації розвиток бластоцистів не зупинявся раптово, перед вступом у стан спокою бластоцисти збільшували кількість клітин (табл. 4). Високоасинхронне перенесення 3→0 бластоцистів показало, що життєздатність зародків мишей, які первинно відставали у розвитку, частково відновлюється протягом затримки імплантації. Це підтверджується даними [Kaufman et al., 1977; Tsunoda and McLaren, 1983]. Результати з перенесення зародків вагітним і псевдовагітним реципієнтам (табл.3) дозволяють припустити, що низька життєздатність половинок зародків викликана певним ендогенним фактором, а не відсутністю адекватної відповіді з боку сприйнятливої матки (відсоток імплантованих половинок зародків такий же високий, як і у контрольних ембріонів). Можливо, збільшення кількості клітин у половинках бластоцистів з затриманою імплантацією є найможливішим поясненням зростання рівня виживаності зародків під час високоасинхронних перенесень. Бластоцисти, у яких кількість клітин була наполовину меншою при культивуванні в

умовах *in vitro*, у наступні три дні затримки імплантації наздоганяли за числом клітин контрольні бластоцисти, що розвивалися *in vivo* (табл. 4).

Однак абсолютна кількість клітин не є критичним фактором для входження бластоцистів у стан спокою, оскільки бластоцисти, які розвинулися як з диплоїдних, так і з тетраплоїдних половинок зародків, мали у стані спокою менше клітин, ніж контрольні бластоцисти ($49,9 \pm 2,0$ і $51,9 \pm 3,8$ порівняно з $109,3 \pm 2,5$, табл.4). Подібний результат було отримано у роботі [Smith, McLaren, 1977] при визначенні параметрів, що характеризують початок утворення бластоцистів. Такі результати виключають роль кількості цитокінезів як найвірогіднішого фактора, що запускає початок імплантації, однак можливими кандидатами на неї залиша-

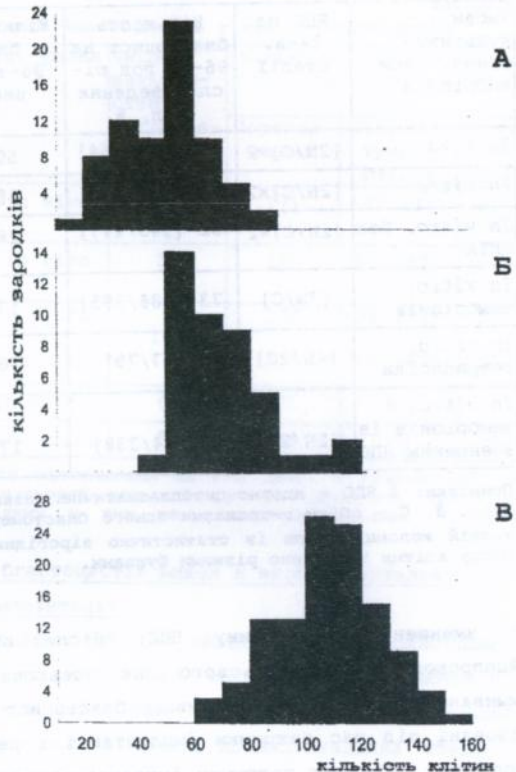


Рис.4 Розподіл кількості клітин у бластоцистів в умовах затримки імплантації через 190 год після введення ХГл. (А) $\frac{1}{2}$ бластоцистів; (Б) $\frac{1}{2}$ бластоцистів з подвійним об'ємом цитоплазми; (В) контроль.

ються число циклів реплікації ДНК або досягнення певного рівня ЯЦС. Для вибору між цими двома можливими варіантами були отримані половинки зародків з подвоєним об'ємом цитоплазми (зменшене у два рази ЯЦС). В умовах затримки імплантації більша частина бластоцистів із зменшеним ЯЦС мала ту ж кількість клітин, що і контрольні половинки бластоцистів (рис. 4). Можливо, первинний механізм стану спокою бластоцистів запускається не лише визначеним ЯЦС, але й якимось іншим фактором, характерним для восьмого клітинного циклу. З іншого боку, збільшене число клітин у таких бластоцистах ($70,5 \pm 2,4$; табл.4) і той факт, що розподіл зародків за кількістю клітин не підпорядковується нормальному розподілу (рис. 4,В), підтверджують, що і початок восьмого циклу, і зменшене ЯЦС відповідальні за входження у стан спокою бластоцистів. Доімплантаційний розвиток зародків плацентарних ссавців підтримується,

в основному, енергетичними запасами ооплазми. Як наслідок, загальний об'єм зародків на доімплантаційній стадії не піддається значним змінам і при кожному наступному поділі кількість цитоплазми у бластомерах зменшується удвічі. На стадії 120 клітин ЯЦС сягає рівня соматичних клітин [Smith, Johnson, 1986] і тому зародки більше не можуть розвиватися за рахунок внутрішніх енергетичних запасів. В інтактних бластоцистах восьмий клітинний цикл збігається зі стадією 120 клітин, тобто з моментом виснаження внутрішніх джерел енергії. Цим пояснюється, чому загальна кількість клітин у бластоцистів, які розвивалися в умовах затримки імплантації, не перевищує таку порівняно з бластоцистами, що розвивалися за нормальних умов безпосередньо перед імплантацією [Copp, 1982]. Отримуючи зародки з подвоєним об'ємом цитоплазми, ми зняли обмеження, викликані високим ЯЦС, і показали, що можливо отримати бластоцисти в умовах затримки імплантації з більшою кількістю клітин на дев'ятому клітинному циклі. Грунтуючись на отриманих даних, можна зробити висновок стосовно того, що стан спокою бластоцистів запускається якимось фактором, характерним для восьмого клітинного циклу, і за нормальних умов стан спокою бластоцистів забезпечується зниженням метаболічної активності у той час, коли зародки мають біля 120 клітин і ядерно-цитоплазматичне співвідношення сягає рівня соматичних клітин.

ВИСНОВКИ

1. При міжлінійних і спільних пересадках мишей ліній BALB/c, CBA/Lac і C₅₇Bl/6j виявлено суттєве збільшення ваги алогенних і сингенних ембріонів, які розвивалися спільно, порівняно з зародками тієї ж лінійної належності у контролі і при внутрішньолінійних пересадках. Це може свідчити про те, що при певних генетичних розбіжностях матері і плода в організмі матері складаються сприятливіші умови для реалізації генотипічних потенцій ембріонів, що розвиваються.
2. Встановлено, що успіх культивування зародків у системі *in vitro* суттєво залежить від їх генотипічних особливостей, а також від часу, який минув з моменту введення ХГл до вимивання зигот. Найуспішніше розвиваються зиготи, вимиті через 26-28 год після введення ХГл, які мають два чітко видимих пронуклеуси, що розташовані близько від центра зиготи.
3. Особливістю розвитку зигот мишей лінії ICR *in vitro* є наявність "блока" на 2-бластомерній стадії. Блокування розвитку з певною вірогідністю (22% зигот розвиваються до бластоцистів) вдається подолати при культивуванні *in vitro* пізніх зигот, отриманих через 26-28 год після введення ХГл.
4. Наявність екзогенної ДНК у клітинах трансгенних мишей впливає на функціонування геному хазяїна, що характеризується появою летальних

мутаций, зниженням плодючості, зростанням частоти новоутворень. У випадку інтеграції чужорідної ДНК відмічено повну втрату послідовностей провірусної ДНК вірусу саркоми Рауса і частини структури бактеріальної векторної плазмиди.

5. Показано, що бластоцисти, які розвивалися *in vitro* та мали на момент кавітації зменшену кількість клітин, як правило, в умовах експериментально створеної діпаузи наздоганяють за цим показником зародки, що розвивалися *in vivo*.

6. Стан спокою бластоцистів досягається у той час, коли зародок має біля 120 клітин, а їх ядерно-цитоплазматичне співвідношення знаходиться на рівні, характерному для соматичних клітин. Готовність бластоцистів до імплантації визначається, скоріш за все, двома факторами: кількістю завершених клітинних циклів та ядерно-цитоплазматичним співвідношенням.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Титок Т.Г., Морозова Л.М., Малювик І.Н., Маренич Т.П., Евсиков В.И. Развитие и выживаемость зародышей мышей при внутри- и межлинейных трансплантациях// Цитология и генетика.- 1984.- №3.- С.433-437.
2. Соломко А.П., Рынлич А.В., Титок Т.Г., Морозова Л.М., Вагина И.Н., Чашина Л.И., Евсиков С.В., Кириченко И.В., Сарапина Н.А. Трансгенные мыши получение на основе плазмид рATV-8 и рBR-322// Биополимеры и клетка.- 1988.- Т.4, №5.- С.267-269.
3. Evsikov S.V., Vagina I.N., Solomko A.P. Mechanisms of cell number regulation in the peri-implantation mouse blastocyst// J. Exp. Zool.- 1996.- V.276, №3.- P.201-208.
4. Вагина И.Н., Евсиков С.В., Соломко А.П. факторы, определяющие готовность бластоцист мышей к имплантации// Биополимеры и клетка.- 1997.- Т.13, №2.- С.161-167.
5. Вагина И.Н., Титок Т.Г., Сарапина Н.А., Кириченко И.В., Евсиков С.В., Соломко А.П. Оптимизация системы для проведения генетико-эмбриологических исследований на инбредных линиях мышей.3.Условия гормональной стимуляции самок и культивирования *in vitro* зародышей на доимплантационной стадии развития у мышей инбредных линий ICR, SWA/Lac и C57Bl/6j// Биополимеры и клетка.- 1997.- 13, №3.- С.232-238.
6. Чашина Л.И., Петренко А.И., Вагина И.Н., Крисан К.В., Соломко А.П. Модификации структуры ДНК плазмиды рATV-8 у трансгенных мышей. 1.Исследование структуры интегрированного трансгена и биологические эффекты трансгеноза// Биополимеры и клетка.- 1997.- Т.13, №4.- С.323-327.

Вагина І.М. Роль генотипів і їх взаємодії у процесі індивідуального розвитку миші. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.26 — молекулярна генетика. — Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 1997.

Дисертацію присвячено проблемі генетичного контролю індивідуального розвитку миші. Показано, що генетичні розбіжності у системі мати←плід сприяють реалізації генотипових потенцій ембріонів, які розвиваються, це виражається у суттєвому збільшенні ваги аллогенних і сингенних ембріонів, що розвивалися разом. Відмічено, що успіх розвитку зигот *in vitro* залежить від їх генотипових особливостей і біологічного віку. Виявлено повну елімінацію вірусспецифічних послідовностей векторної молекули в результаті взаємодії геному миші з інтегрованою ДНК вірусу саркоми Рауса птахів. Встановлено, що в умовах штучно створеної діпаузи бластоцисти, які розвиваються *in vitro* та мають зменшену кількість клітин наздоганяли за цим показником бластоцисти, що розвивалися *in vivo*. Аналіз розвитку зародків після мікрomanipуляцій дозволяє з достатньою вірогідністю визначити фактори, що зумовлюють готовність бластоцист до імплантації.

Ключові слова: зигота, бластоциста, ембріон, трансплантація зародків, трансенгенні миші, діпауза, імплантація.

Вагина И.Н. Роль генотипов и их взаимодействия в индивидуальном развитии мыши. — Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.26 — молекулярная генетика. — Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1997.

Диссертация посвящена проблеме генетического контроля индивидуального развития мыши. Показано, что генетические различия в системе мать←плод способствуют реализации генотипических потенций развивающихся эмбрионов, это выражается в существенном увеличении веса аллогенных и сингенных эмбрионов, развивающихся совместно. Отмечено, что успех развития зигот *in vitro* зависит от их генотипических особенностей и биологического возраста. Обнаружена полная элиминация вирусспецифических последовательностей векторной молекулы в результате взаимодействия генома мыши с интегрированной ДНК вируса саркомы Рауса птиц. Установлено, что в условиях искусственно созданной дипаузы бластоцисты, развивающиеся *in vitro* и имеющие уменьшенное количество клеток догоняли по этому показателю бластоцисты, развивающиеся *in vivo*. Анализ развития зародышей после микроomanipуляций позволяет с большой определенностью указать на факторы, определяющие готовность бластоцист к имплантации.

Ключевые слова: зигота, бластоциста, эмбрион, трансплантация зародышей, трансенгенные мыши, дипауза, имплантация.

Vagina I.N. Role of Genotypes And Their Interactions In Mouse Ontogenesis. — Manuscript.

Thesis for a candidate's degree on speciality 03.00.26 — molecular genetics. — Institute of Molecular Biology and Genetics, Ukrainian NAS, Kiev, 1997.

Dissertation is devoted to the problem of genetic control of mouse development. It was shown that genetic differences in mother←foetus system endure the realisation of genotypical potentialities of developing embryos, since the weights of concurrently developing allogenic and syngenic embryos significantly increase. It was noted that the rate of succes of *in vitro* development of zygotes depends on their genotypical peculiarities and biological age. As a result of interactions between mouse genome and integrated Rauss avian sarcoma virus DNA, complete elimination of virus-specific DNA sequences from the vector molecule was detected. It was found out that during experimentally produced implantation delay, blastocysts developing *in vitro* and having fewer cells than *in vivo* developing blastocysts, gained the cell number of the controls. Analysis of development of manipulated embryos made us suggest the factors responding for the blastocyst readiness for implantation.

Key Words: Zygote, Blastocyst, Embryo, Embryo Transplantation, Transgenic Mice, Diapause, Implantation.

АВ 38.704

Підписано до друку 20.10.97р. Формат 60х90/16.
Ум. друк. арк.1,0 Обл.-вид. арк. 0,8.
Наклад 100. Зам. 272

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86