

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

---

---

Євсіков Олексій Вадимович

УДК 575.16  
591

ЧАСОВІ ФАКТОРИ В ПРОЦЕСАХ ДОІМПЛАНТАЦІЙНОГО  
МОРФОГЕНЕЗУ МИШІ

03.00.26 – молекулярна генетика

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

577.21

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00751779 (-)

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук  
О.П. Соломко  
завідуючий відділу біохімічної генетики  
Інституту молекулярної біології і  
генетики НАН України, м. Київ

Офіційні опоненти: доктор медичних наук  
професор І.Р.Варіляк  
директор Українського наукового  
гігієнічного центру МОЗ України, м. Київ

кандидат біологічних наук  
В.Є.Кузнецов  
заступник директора по науковій роботі  
Інституту розведення і генетики  
тварин УААН, м. В. Олександрівка

Провідна установа: Інститут біології розвитку  
ім. М.К. Кольцова РАН, м. Москва

Захист відбудеться 25 жовтня 1997 р. о 10 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.

Автореферат розісланий 23 жовтня 1997 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук

Л.Л.Лукаш

AB - 38, 703

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Починаючи з найперших стадій, розвиток ссавців, на відміну від інших класів, підлягає тільки регуляторним принципам (Davidson, 1990, 1991). Якщо у більшості тварин перші етапи морфогенезу проходять під жорстким контролем материнських факторів ооплазми, то у ссавців продукти, що накопичуються під час оогенезу потрібні для забезпечення нормального запліднення і подальшого дробіння зиготи до самого моменту включення ембріонального геному. Його активація запускає процеси розгортання морфогенетичної програми подальшого розвитку.

Нормальний хід онтогенезу забезпечується, в першу чергу, механізмами диференціальної, - в часі і просторі, - експресії генів. Регуляція активності генів "в часі", що зветься також "біологічним годинником" ембріона, до сьогодні залишається однією з основних невирішених проблем раннього морфогенезу ссавців. Було показано, що механізм "біологічного годинника" не залежить ani від абсолютного часу, що пройшов з моменту запліднення (Smith, McLaren, 1977), ani від кількості циклів реплікації (Alexandre, 1982) чи цитокінезів (Surani et al., 1980), ani від міжклітинних взаємодій (Prather, First, 1986), ani від ядерно-цитоплазматичного співвідношення (Evsikov et al., 1990). В даний момент все більше підтвердження знаходить теорія, згідно якої робота "біологічного годинника" доімплантаційного розвитку діє за принципом "go when ready" (Dardik, Schultz, 1991): згідно цьому погляду, запуск чергової стадії морфогенезу відбувається після того, як було досягнуто певного "критичного" рівня продуктів попереднього етапу. В даний час ця гіпотеза є одним з фундаментів, на якому базується дослідження механізмів регуляції раннього розвитку ссавців.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження проводились в рамках тематичних планів ІМБІГ НАНУ № 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.** Основною метою наших досліджень стало вивчення фактору часу в ранньому розвитку миші. На цих стадіях він має ніби два аспекти. При дозріванні ооциту і в зиготі основну роль грає абсолютний час, що проходить з моменту надходження гормонального сигналу чи запліднення; починаючи з моменту включення ембріонального геному, на перший план виходить власний, "біологічний" годинник ембріона, який значно не залежить від "абсолютного" часу.

Згідно поставленій мети, ми почали шукати можливі підходи до її вирішення. В ранньому розвитку миші суттєву роль відіграють декілька факторів: ядерно-цитоплазматичні взаємодії; "ауторегуляційні" функції цитоплазми; міжклітинні взаємодії, і в меншому ступені, геномний імпрінтинг. Кожний з цих факторів, так чи інакше, спроможний впливати на часові параметри розвитку. Тому ми, намагалися наблизитись до мети, шукали різні підходи до її досягнення, що привело нас до постановки конкретних завдань дослідження:

- 1) провести дослідження полярних тілець, які є результатом двох мейотичних поділів, що проходять на завершальних стадіях дозрівання ооциту;
- 2) на моделі "затримки розвитку" ядра в порівнянні з цитоплазмою виявити принципові причини поганого розвитку ембріонів після мікрохірургічних пересадок ядер;
- 3) на цій ж моделі вивчити механізми, що відповідають за проходження першого клітинного циклу ембріоном миші;
- 4) з'ясувати, як окремі "регуляторні фактори" розвитку впливають на "біологічний годинник" раннього ембріону миші.

**Наукова новизна.** Вперше проведено комплексний морфологічний, цитогенетичний і експериментально-ембріологічний аналіз двох клітин, що утворюються при оогенезі, — першого і другого полярних тілець. Це надало можливість зробити важливі висновки, щодо механізмів дозрівання ооциту і регуляції першого клітинного циклу ембріону миші. Вперше продемонстровано ефект "химерного гетерозису" на самих ранніх стадіях розвитку миші. Проведено комплексний аналіз трансляційної активності доімплантаційних зародків миші, цитокінез яких було пригнічено цитохалазином D, що дозволило зробити деякі висновки щодо механізмів роботи "біологічного годинника" раннього ембріону.

**Практична цінність.** Розроблені методики аналізу полярних тілець дозволяють їх використання при аналізі ооцитів і ембріонів людини в родинах, де високий ризик спадкування тяжких генетичних захворювань. Подальші розробки отриманих результатів по гетерозису химерних ембріонів в перспективі дає можливість використання даних методик в тваринництві.

**Особистий внесок здобувача.** Основні результати, що викладено в роботі, отримані здобувачем самостійно. Автор висловлює подяку к.б.н. С.В. Євсікову за проведення мікрomanipуляцій ембріонів.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень було оприлюднено на 27-му щорічному конгресі Спільки по вивченню репродукції (липень 1994, США), міжнародній конференції "Механізми

розвитку: онтогенетичні і філогенетичні аспекти" (серпень 1994, Москва), міжлабораторному семінарі відділів біології розвитку і молекулярної та клітинної біології в Національному інституті сільськогосподарських досліджень (INRA, Франція; листопад 1994) і міжлабораторному семінарі ІМБіГ НАНУ (червень 1997).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано три статті у вітчизняному і закордонних журналах, а також тези конференції.

**Структура і обсяг роботи.** Роботу викладено на 110 стор., вона містить вступ, основну частину, яка складається з 4 розділів, і висновків. Роботу проілюстровано 25 малюнками і 3 таблицями. Список використаних джерел складається з 239 найменувань робіт вітчизняних і закордонних авторів.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

**Об'єкт дослідження.** В роботі використовували мишей ліній C<sub>57</sub>B1/6, BALB/c, а також гібридні B6D2F1 (C<sub>57</sub>B1/6 × DBA/2) і СВ6F1 (BALB/c × C<sub>57</sub>B1/6). Саміць в віці від п'яти тижнів до трьох місяців суперувольовували за стандартною методикою (Hogan et al., 1986). Час ін'єкції hCG приймали за "час ноль". Зиготи, ооцити і двуклітинні ембріони вимивали з яйцепроводів і культивували за стандартними методиками (Hogan et al., 1986).

Для отримання "одноклітинних" і "двуклітинних" ембріонів їх культивували до 75 години після ін'єкції hCG в присутності цитохалазину D (0.6 μг/мл), починаючи зі стадії зиготи чи двох клітин. Химери отримували, агрегуючи по два окремих бластомери зародків двоклітинної стадії, за методикою Mintz et al., 1973.

**Мікроманіпуляції.** В роботі використовували стандартні методи маніпуляції (Tsunoda et al., 1986) з незначними модифікаціями.

**Електрозлиття.** Зародки врівноважували на протязі 10-15 хвилин в середовищі для електрозлиття (0.5 М манітол + 0.5% полівінілпірролідон + 0.1 мМ MgSO<sub>4</sub> + 50 μМ CaCl<sub>2</sub>) при 21-23°C, після чого розміщували між платиновими електродами, розташованими на відстані 330 μм один від іншого. Електростимуляція складалась з двох фаз: 7 с змінного струму (500 кГц, 7 В) орієнтували зародки в полі, після чого ішов один прямокутний імпульс (30-35 В, 400 μс). Ембріони ретельно відмивали в середовищі M16 і переносили в культуральні чашки Петрі.

**Мікроскопія.** Для скануючої електронної мікроскопії препарати готували за стандартним методом (Пратт, 1988). Дослідження проводили на мікроскопі ISI-SS40. Для світової мікроскопії препарати ооцитів і зародків готували по Дибану (Dyban, 1983).

**Аналіз рівня трансляції у ембріонів та двовірний електрофорез білків.** Зародки культивували на протязі 1 чи 3 годин при 37°C в середовищі M16, що містила 55 МБк/мл [<sup>35</sup>S]-метіоніна (Amersham), відмивали і переносили в 20 μл лізуючого буферу (O'Farrell, 1975). 1 μл лізату відбирали для розрахунку поглинутої радіоактивності. Пробу змішували з 200 μл 0.2% БСА, додавали 200 μл 30% ТХУ і центрифугували при 12000 об./хв. Осад промивали ацетоном, розчиняли в 200 μл мурашиної кислоти, і змішували з 2 мл скінтилятору. Двовірний електрофорез проводили в камірі BioRad MiniProtean II 2D cell. Ізофокусування проводили при 500 В дс 6000 В•г і співвідношенні амфолітів BioLyte3.5-10/BioLyte5-7 1:4. Розділення по другому напрямку проводили в 12.5% розділюючому гелі. Флуорографію проводили при -80°C. Комп'ютерний аналіз виконували за допомогою програми ImageMaster 1.0 (Pharmacia).

## РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

### Морфологічні дослідження дозрівання і запліднення ооциту миші

Сенс гаметогенезу полягає в утворенні гаплоїдних гамет з початково диплоїдної клітини. З цієї точки зору оогенез відрізняється від сперматогенезу механізмами розподілення генетичного матеріалу, що міститься в оогоніях. При созріванні ооцитів два поділи мейозу служать не для того, щоб утворювались чотири однакові гаплоїдні клітини, а для елімінації трьох наборів хромосом, причому з мінімальними втратами цитоплазми. В результаті цього процесу формуються дві невеликі клітини, — перше і друге полярні тільца (1ПТ и 2ПТ). Аналіз ПТ може бути джерелом інформації про механізми дозрівання ооциту і запліднення (Modlinski, McLaren, 1980; Dyban et al., 1992). Крім того, сучасні методи дають можливість використання полярних тілец для аналізу ооцитів і доімплантаційних ембріонів людини в родинах, що мають високий ризик спадкування тяжких генетичних захворювань (Verlinsky et al., 1992).



Мал.1. Перше і друге полярні тільца на доімплантаційних стадіях розвитку миші. (1А) 1ПТ (ліворуч) і 2ПТ у зиготи; (1Б) 2ПТ, зв'язане з зиготою "серединним тільцем"; 2ПТ на двоклітинній (1В) і восьмиклітинній (1Г) стадіях. Збільш. 1А, 1В, 1Г —  $\times 1,500$ ; 1Б —  $\times 2,500$ .

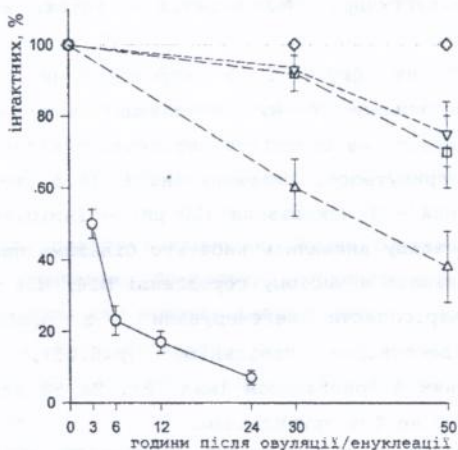
Наші дослідження за допомогою скануючого електронного мікроскопа виявили, що морфологія першого і другого полярних тілец різна: поперше, 2ПТ, на відміну від 1ПТ, залишається зв'язаним з зиготою; подруге, на двоклітинній стадії на поверхні 2ПТ з'являються

мікрворсинки, тоді як мембрана 1ПТ залишається "гладенькою". Ці спостереження знаходяться у відповідності з іншими гістологічними роботами, присвяченими дозріванню ооцита (Johnson et al., 1975; Calarco, 1975; Maro et al., 1986).

#### Чи "запрограмована" загибель першого полярного тільця в оогенезі миші?

Після завершення першого мейотичного поділу хромосоми як 1ПТ, так і ооцита залишаються сконденсованими. Виявлено, що "хроматинконденсуючі" властивості цитоплазми 1ПТ, як і ооцита, викликані високим рівнем фактору дозрівання (MPF; Szollosi et al., 1991). Через це в 1ПТ ніколи не формується інтерфазне ядро; найцікавіше полягає в тому, що ця клітина починає дегенерувати буквально з моменту виділення.

Нами виявлено, що до моменту овуляції 1ПТ виділяється у 80% морфологічно нормальних ооцитів, що знаходяться до цього моменту на стадії МІІ, інші 20% знаходяться на різних фазах мейотичного поділу. Через 3 г після овуляції, коли всі ооцити вже знаходяться на стадії МІІ, тільки у половини з них 1ПТ ще не розпадаються. Через 24 г після овуляції 1ПТ залишаються тільки у 7% МІІ-ооцитів (мал. 2).

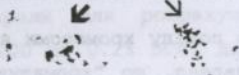


Мал.2. Швидкість дегенерації першого полярного тільця і каріопластів МІІ-ооцитів *in vitro*. Позначення:

- Перше полярне тільце
- МІІ-каріопласти в М16
- ◇— МІІ-каріопласти в М16 з нокодазолом
- ▽— МІІ-каріопласти в М16 з нокодазолом і цитохалазином D
- ◇— Контроль: цитопласти

Дегенерація 1ПТ ооцита миші іде шляхом, в загальних рисах нагадуючи загибель клітин при некрозі. Відбувається "розмивання" хроматину (мал. 3) і фрагментація (мал. 4), що супроводжується повним руйнуванням клітини. Руйнування 1ПТ не залежив від будь-якого впливу з боку ооциту, також йому не запобігали ні інгібітори цитоскелету цитохалазин D і

нокодазол, ні циклогексимид (інгібітор синтезу білка, ні інгібітори протеаз; як *in vivo*, так і *in vitro* перші полярні тільця розпадались з однаковок швидкістю.



3

Мал.3. Хромосоми ооциту (V) і першого полярного тільця (V). 3 години після овуляції. Фарбування за Гимзою. Збільшення -  $\times 900$ .



Мал.4. Ооцит на стадії MII і фрагментуюче перше полярне тільце. Збільшення -  $\times 750$ .

Спроби зрозуміти механізми, що лежать в основі такої швидкої загибелі цієї клітини, привели нас до ідеї вивчення не безпосередньо ІПТ, а структури, яка б змогла відобразити по меншій мірі деякі з його властивостей. Енуклеюючи MII-ооцити, ми стримували каріопласти, які за об'ємом приблизно дорівнювали ІПТ і містили веретено метафази II. Вони і були "моделлю" ІПТ. Контролем до каріопластів служили цитопласти, які стримували мікросхірургічно з MII-ооцитів і також, вони мали розмір, рівний ІПТ.

Хромосоми ІПТ не скупчені в веретині як у MII-ооциту, а розташовуються по всьому об'єму цитоплазми; тому ми вивчали вплив інгібіторів цитоскелету на швидкість дегенерації MII-каріопластів. Вони культивувались в присутності цитохалазина D (0.5  $\mu\text{g}/\text{мл}$ ) - інгібітора полімеризації актина - і нокодазола (10  $\mu\text{M}$ ) - інгібітора полімеризації тубуліна. Темпи розпаду виявились набагато більшими при культивуванні в присутності нокодазола: в чистому середовищі M16, M16 з цитохалазином D і нокодазолом каріопласти дегенерували з приблизно однаковими швидкостями і достовірно повільніше ( $p < 0.05$ ), ніж у випадку культивування тільки з нокодазолом (мал. 2). За 50 годин спостереження жоден з цитопластів не був зруйнованим.

Таким чином, швидче за все дегенерація каріопластів відбувалась при руйнуванні веретена MII нокодазолом, іншими словами, в випадку диспергування хромосом по всьому об'єму цитоплазми каріопласта. Руйнування актинових мікрофіламентів цитохалазином D, як видно, навіть "нормалізувало" ефект, що викликає нокодазол. Таким чином, причиною загибелі MII-каріопластів може бути нестабільність при взаємодії актинового цитоскелету, хроматину і плазматичної мембрани.

Вибрана нами модель ІПТ - каріопласти ооцитів - все ж таки недостатньо відображує процес загибелі цієї клітини (рис. 2). Це може бути пов'язано з меншими енергетичними ресурсами ІПТ в порівнянні з каріопластами внаслідок практично повної відсутності у ІПТ мітохондрій

(Calarco, 1995). Підтвердженням даному припущенню є те, що при загальному пригніченні метаболізму азидом натрію (5mM) швидкість розпаду каріопластів була набагато вищою, ніж у контрольних цитопластів і ооцитів, і наближалось до швидкості загибелі 1ПТ (наше спостереження). Ми вважаємо, що принципові механізми загибелі 1ПТ обумовлені тими ж причинами, що й руйнування каріопластів МІІ-ооцитів.

Не виключаючи можливості, що 1ПТ швидко руйнуються просто тому, що в ньому надто багато хроматину і надто мало цитоплазми, бажано відмітити, що в принципі, швидка деградація 1ПТ виключає можливість його випадкового запліднення, і таким чином, є своєрідним механізмом, що захищає ооцит від наслідків такої події.

#### ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ДОІМПЛАНТАЦІЙНОГО РОЗВИТКУ ЗИГОТ ПІСЛЯ ЇХ ЗЛИТТЯ З ДРУГИМИ ПОЛЯРНИМИ ТІЛЬЦЯМИ

Одним з питань, що цікавило нас при вивченні полярних тілець, це здібність їх хромосом підтримувати нормальний розвиток. Як ми побачили в попередньому розділі, хроматин 1ПТ дуже швидко починає деградувати. З іншого боку, є достатні докази вважати, що хромосоми гаплоїдного другого полярного тільця мають такий же "потенціал розвитку", як і їх сестринські хроматиди, що залишаються в яйцеклітині і формують жіночий пронуклеус. Так, нормальне проходження доімплантаційних стадій розвитку диплоїдними гиногенотами і партеногенотами, а також триплоїдами, отриманими внаслідку стримання виділення 2ПТ (Дыбан, Баранов, 1978; Cuthbertson, 1983; Surani, Barton, 1983; Speirs, Kaufman, 1989), свідчать на користь такого заключення. Друге полярне тільце цікавило нас ще по деяких причинах. По-перше, цитогенетичний аналіз 2ПТ може виявляти практично будь-яку можливу анеуплоїдію в жіночому пронуклеусі. По-друге, злиття другого полярного тільця з зиготою дає можливість вивчити ефект "часової затримки" ядра у порівнянні з цитоплазмою, а також його наслідки.

Результати наших досліджень представлені в таблиці 1. До 97-ої години після введення hCG практично всі контрольні зиготи розвинулись *in vitro* до морфологічно нормальних морул і бластоцист (таблиця 1), а до 120-ої години більше 70% ембріонів вилупились з зола *pellucida*. Розвиток зигот після їх злиття на 21-й-24-й години після введення hCG з другими полярними тільцями значно погіршувалось. До 97-ої години тільки 51% таких триплоїдів (ЧПН + ЖПН + 2ПТ; ЧПН - чоловічий пронуклеус; ЖПН - жіночий пронуклеус; 2ПТ - ядро другого полярного тільця) досягли стадії морули і бластоцисти, крім того, швидкість їх морфогенезу була знижена (29% бластоцист в зрівнянні з 69% у нормальних ембріонів). Ще б в'ясувати, чи пов'язано погіршення розвитку цих ембріонів із змінок

плідності, ми отримали триплоїди з двома жіночими пронуклеусами (каріотип ЧПН + ЖПН + ЖПН). Усі такі зародки досягли стадії морули і бластоцисти, однак в них спостерігалася така ж затримка розвитку, як і у зародків з каріотипом ЧПН + ЖПН + 2ПТ (таблиця 1). Ці результати знаходяться в повній відповідності з даними по доімплантаційному розвитку триплоїдних ембріонів, отриманими іншими дослідниками (Дьбан, Баранов, 1978; Witkowska, 1981; Henery, Kaufman, 1992, 1993). Таким чином, низька життєздатність зигот після злиття з 2ПТ викликана не триплоїдністю ембріонів, а якимись іншими факторами.

Таблиця 1

Доімплантаційний розвиток зародків миші *in vitro*

Плоідність ембріонів	Каріотип ембріонів	24 г. 1-кл.	36 г. 2-кл.	54 г. 4-кл.	97 г.		
					Морули і бластоцисти	З них бластоцистів	Середня кількість клітин в зародках
ди-плоїди	ЧПН+ЖПН	1031	1003 (97%)	-	984 (95%)	679 (69±1)†	33.5±0.5
	ЧПН+2ПТ	81	78 (96%)	37 (46%)	26 (32%)	9 (35±9%)	21±2
три-плоїди	ЧПН+ЖПН+ЖПН	38	38 (100%)	38 (100%)	38 (100%)	12 (32±8%)	22±1
	ЧПН+ЖПН+2ПТ	111	97 (87%)	79 (71%)	57 (51%)	16 (28±6%)	22±2
га-плоїди	ЧПН	110	108 (98%)	44 (40%)	32 (29%)	0 (0%)	12±2
	2ПТ	28	27 (96%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-

Час вказано в годинах після введення hCG. Позначення: ЧПН – чоловічий пронуклеус; ЖПН – жіночий пронуклеус; 2ПТ – ядро другого полярного тільця. Сірим фоном позначено контроль.

Цитогенетичний аналіз зародків з каріотипом ЧПН + ЖПН + 2ПТ виявив причини поганого їх розвитку. Запліднення і виділення другого полярного тільця запускають процеси формування чоловічого і жіночого пронуклеусів. Але ядро 2ПТ ніколи не збільшується до розмірів пронуклеусів, а реплікація в ньому ніколи не проходить повністю (Howlett, Bolton, 1985). Отже, починаючи з моменту виділення 2ПТ, його ядро починає неухильно “відставати” від пронуклеусів. Таким чином, чим більше часу проходить після запліднення, тим менше шансів на те, що ядро 2ПТ після попадання в зиготу “дожене” ЧПН і ЖПН. В нашому дослідженні другі полярні тільця зливались з зиготами через 4-7 годин після виділення (мал. 5А). Це значить, що реплікація в пронуклеусах

завершувалась раніше, ніж в інкорпорованому ядрі 2ПТ. Тому до моменту вступу зиготи в М-фазу виникала передчасна конденсація хромосом 2ПТ (мал. 5Б, 5В). Предчасно сконденсований хроматин 2ПТ, певно, випадковим чином розподілювався між бластомерами двуклітинних зародків (мал. 5Г), що призводило до дисбалансу числа хромосом. В 13% випадків передчасна конденсація хромосом приводила до того, що зиготи взагалі не ділились (таблиця 1).

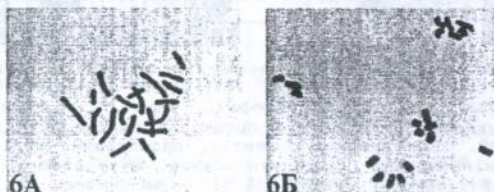


Мал.5. Аномальний розвиток зигот після їх злиття з другими полярними тільцями. (5А) Пронуклеуси і ядро 2ПТ після його злиття з зиготою. Збільш.  $\times 125$ . (5Б) Пронуклеуси в профазі, ядро 2ПТ в інтерфазі. Збільш.  $\times 250$ . (5В) Пронуклеуси в метафазі, предчасна конденсація хроматину ядра 2ПТ. Збільш.  $\times 250$ . (5Г) Зупинка розвитку, аномальний 4-клітинний ембріон з множинними мікроядрами і анеуплоїдною метафазою. Збільш.  $\times 125$ . Забарвлення: (5А) - Hoechst 33258, (5Б-5Г) - за Гимзою.

Припущення про те, що саме асинхронність між ядром 2ПТ і цитоплазмою зиготи є причиною зупинки розвитку триплоїдів "ЧПН + ЖПН + 2ПТ" підтвердилось в наступному експерименті. В результаті електрозлиття зигот з їх власними полярними тільцями на 27-й-29-й годині після введення hCG нами не було отримано жодної триплоїдної морули чи бластоцисти. В основному такі зародки на двуклітинній стадії були анеуплоїдними, а їх розвиток блокувався. Ті ж ембріони, які досягали стадій морули і бластоцисти, були диплоїдними і до 97-ої години містили  $14.2 \pm 1.4$  клітин. Це свідчить про те, що під час першого поділу весь хроматин 2ПТ попадав тільки в один бластомер, розвиток якого зупинявся; інший же дробився далі.

Після злиття 2ПТ з інтактними зиготами 51% триплоїдних зародків досягав стадії морули і бластоцисти. Однак при цьому хромосоми другого полярного тільця цілком могли залишатись транскрипційно пасивними. Щоб перевірити, чи здібно ядро 2ПТ підтримувати ранній розвиток, ми вилучали у зигот жіночі пронуклеуси і зливали їх потім з власними полярними тільцями. До 97-ої години 32% таких ембріонів досягало стадії морули і бластоцисти, з них бластоцистами було біля третини (таблиця 1). Гаплоїдні ж андрогенетичні ембріони, отримані видаленням ЖПН, розвивались дуже погано: жоден з них не пійшов далі стадії морули (таблиця 1). Таким чином, ядро 2ПТ спроможно активно підтримувати доімплантаційний розвиток. Майже двократна різниця за кількістю клітин у гаплоїдних андрогенотів і реконструйованих диплоїдів (ЧПН + 2ПТ) є додатковим тому підтвердженням (таблиця 1).

Після злиття 2ПТ з енукліюваними зиготами розвиток не йшов далі двоклітинної стадії (таблиця 1); причинами такої зупинки розвитку на нашу думку можуть бути, по-перше, гаплоїдність отриманих ембріонів (Дыбан, Баранов, 1978), по-друге, часова невідповідність ядра цитоплазми, і по-третє, деяка травматичність процедури енуклеації. Проте, саме такий спосіб є оптимальним для цитогенетичного аналізу 2ПТ: при відсутності власних хромосом зиготи її цитоплазма якимось чином "підстрожується" під "відставше" ядро 2ПТ, і ймовірність передчасної конденсації хроматину, мабуть, зводиться до нуля; нам вдалось отримати метафазні пластинки для 14 з 15 полярних тілець (мал. 6а, б), злитих з енукліюваною зиготою.



Мал.6. Метафазні пластинки 2ПТ після їх злиття з енукліюваними зиготами. Збільшення  $\times 625$ . Фарбування за Гімзою.

Отримані нами дані з розвитку триплоїдних зародків, які були отримані злиттям жіночого пронуклеопласта чи 2ПТ з зиготою, свідчать про те, що поміж пересаджуваним ядром і реципієнтною цитоплазмой повинна бути деяка "синхронність". Необхідність в цьому визнавалась і іншими дослідниками (Mann, Lowell-Badge, 1987; Smith et al., 1988, 1990; Solter, 1996). В цілому, наші дані знаходяться в повній згоді з іншими експериментами по пересадкам ядер. При заміні одного з пронуклеусів зиготи на ядра 4-8-клітинних гаплоїдних андро- чи гиногенотів розвиток може проходити повністю (Surani et al., 1986); пересадки ядер бластомерів морули чи ВКМ в зиготи також давали високий відсоток тетраплоїдних бластоцистів (Modlinski, 1978, 1981). Крім того, наші результати непрямо підтримують спостереження, що пересадки ядер більш ефективні, якщо реципієнтним цитопластом є енукліюваний ооцит, а не зигота (Solter, 1996), що, певно, пов'язано з тим, що "привести до відповідності" пересаджане ядро з "заблокованою" в М-фазі цитоплазмой ооцита є більш легким завданням, ніж синхронизувати фази клітинних циклів зиготи і донорного ядра.

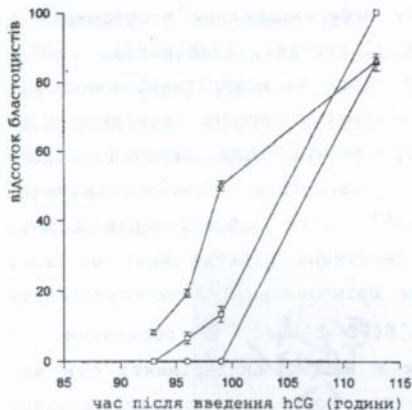
## Зміна часу запуску кавітації у химерних зародків [CB6]B6F2↔BALB/c

Бажливу роль в доімплантаційному розвитку ссавців відіграють міжклітинні взаємодії. В морулі і ранній бластоцисті розташування клітин є ключовим регулятором напрямку диференціювання бластомерів в трофобластулу чи недиференційовану ВКМ (Tarkowski, Wroblewska, 1967). Оглядом з кращих моделей для розуміння того, як міжклітинні взаємодії впливають на ранній онтогенез ссавців, є химерні зародки, оскільки з їх допомогою можна, наприклад, легко простежити долю окремих клітин (Pedersen et al., 1986), вивчити взаємодію "гетерохронічних" бластомерів (Prather, First, 1986, 1987, 1988), бластомерів різної плідності (Everett, West, 1996) чи генетично різних (West et al., 1998). Наша робота мала мету дослідити доімплантаційну життєздатність "змішаних" химерних ембріонів [CB6]B6F2↔BALB/c в порівнянні з інтактними зародками. Критерієм оцінки в нашому експерименті був час початку утворення бластоцелю. В цілому по ньому можна робити висновок про взаємний вплив бластомерів різної генетичної конституції.

Химерні зародки [CB6]B6F2↔BALB/c [(CB6]B6F2 = [BALB/c × C<sub>2</sub>-B1/6] × C<sub>2</sub>-B1/6, в подальшому, - F2] отримували шляхом агрегації окремих бластомерів двоклітинних зародків. Для даного експерименту необхідно було знайти адекватний контроль: вже операція по видаленню зона реліквіда проназок значно впливала на час запуску кавітації. Крім того, ймовірність, що бластомери, які агрегують, знаходяться на одній і тій же стадії клітинного циклу, практично дорівнює нулю, і їх асинхронність може впливати на розвиток химерних ембріонів. Тому контролем до химерів F2↔BALB/c були не інтактні, а в деякому роді "химерні" ембріони, які отримували, агрегуючи по два бластомери одного типу. Іншими словами, ми проводили порівняння розвитку трьох типів химер, - F2↔BALB/c, F2↔F2 і BALB/c↔BALB/c.

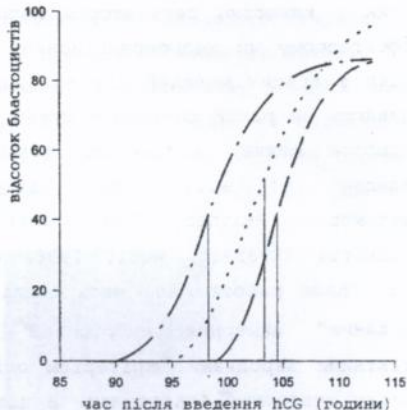
До 90 години після введення hCG зародки уявляли з себе морфологічно нормальні морули. До цього моменту серед ембріонів F2↔BALB/c 8%, а серед BALB/c↔BALB/c 7% деградували повністю чи наполовину (тобто один з бластомерів розвивався, а інший - ні). Такі зародки розглядалися як мертві і далі не враховувались. Утворювати бластоцель першими почали зародки F2↔BALB/c, до 95-ої години після hCG 8% з них були ранніми бластоцистами. Серед ембріонів F2↔F2 бластоцисти почали з'являтися між 95-ю і 100-ю годинами, а серед BALB/c↔BALB/c, - вже після 100-ої (мал.7). Припускаючи середнім часом початку кавітації той момент, коли половина всіх ставших бластоцистами зародків вже мали чи починали

утворювати бластоцель, а також використовуючи процедуру оптимізації функції статистичної програми *SigmaPlot*, ми з'ясували, що зародки  $F2 \leftrightarrow BALB/c$  почали кавітацію на  $8 \pm 2$  години раніше, ніж контрольні  $F2 \leftrightarrow F2$  і  $BALB/c \leftrightarrow BALB/c$  (мал.8).



Мал.7. Час запуску кавітації у ембріонів  $F2 \leftrightarrow BALB/c$ ,  $F2 \leftrightarrow F2$  і  $BALB/c \leftrightarrow BALB/c$ . Позначення:

- химери  $BALB/c \leftrightarrow BALB/c$
- химери  $F2 \leftrightarrow F2$
- △— химери  $F2 \leftrightarrow BALB/c$



Мал.8. Розрахункові криві часу запуску кавітації у ембріонів  $F2 \leftrightarrow BALB/c$ ,  $F2 \leftrightarrow F2$  і  $BALB/c \leftrightarrow BALB/c$ . Позначення:

- — — химери  $BALB/c \leftrightarrow BALB/c$
- - - химери  $F2 \leftrightarrow F2$
- - - химери  $F2 \leftrightarrow BALB/c$

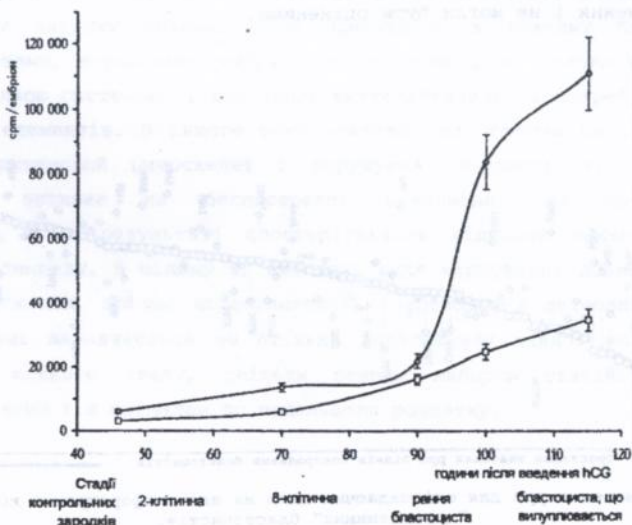
Цей факт виявився для нас достатньо неочікуваним: скоріше можна було б припустити, що "F2-частина" химери, як більш життєздатна *in vitro* в порівнянні з "BALB/c-частиною", буде сприятливо впливати на розвиток останньої, і що за темпами морфогенезу химери  $F2 \leftrightarrow BALB/c$  займуть проміжне положення між F2- і BALB/c-контролями. Непрямо на користь такого припущення свідчили і результати того, що зародки від матерів BALB/c вносять відносно малий внесок до органів і тканин химер, які розвиваються після агрегації з ембріонами  $(C57Bl \times CBA)F_2$  (West et al., 1995). Отримані нами результати свідчать про наявність "химерного" гетерозиса, передбаченого ще МакЛарен (1979) і далі підтвердженого, наприклад, в роботах по вивченню репродуктивних функцій і масі тіла химерних мишей  $C57Bl/6 \leftrightarrow BALB/c$  (Micami, Onishi, 1985; Onishi, Micami, 1986). Для ранніх стадій онтогенеза подібний "гетерозис" показаний вперше нами. В майбутньому необхідно буде провести більш детальне вивчення даного феномену вже на молекулярно-генетичному рівні. В даний момент ми можемо тільки запропонувати гіпотезу, що якісь-то (ростові?) фактори, що забезпечують "взаємовідносини" бластомерів ембріону, в химерних зародках, певно, вмикають "позитивний зворотній зв'язок" во взаємодіях генетично відмінних частин химери.

## Рівні і характер трансляції у доімплантаційних зародків миші з пригніченим цитокінезом

Важливе значення для розуміння механізму роботи "біологічного годинника" ембріона миші мають дослідження змін, що відбуваються в зародку на транскрипційному і трансляційному рівнях і є відображенням програми розвитку, що розгортається в просторі і часі. В ранньому ембріоні транскрипція часто проходить "на крок попереду", тоді як зміни характеру трансляції пов'язані безпосередньо з морфогенетичними переходами (Kidder, 1992).

Ми вивчали трансляційну активність у доімплантаційних зародків миші, цитокінез яких був пригнічений цитохалазином D. Такі зародки залишались одно- і двоклітинними на протязі всього доімплантаційного періоду. Запуск кавітації, а потім і вилуплювання з *zona pellucida* в них починались одночасно з контрольними.

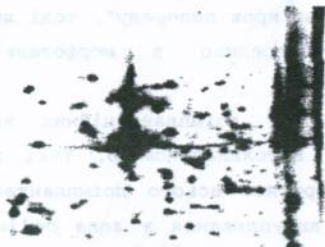
Ми провели кількісний аналіз загального білкового синтезу у цих ембріонів (мал. 9). Починаючи з двоклітинної стадії, включення [ $^{35}\text{S}$ ]-метіонину "одноклітинними" зародками, що культивувались в присутності цитохалазина D, було значно нижче, ніж у контрольних ембріонів. Після формування бластоцистів у контрольних зародків спостерігався різкий сплеск рівня включення [ $^{35}\text{S}$ ]-метіонину, а у "одноклітинних" продовжувалось повільне, майже лінійне зростання трансляційної активності.



Мал. 9. Рівень включення  $^{35}\text{S}$ -метіонину в новосинтезовані білки контрольних ембріонів і зародків з пригніченим цитокінезом. Позначення:

- контрольні ембріони
- "одноклітинні" ембріони

Нами не було знайдено відмінностей в наборах білків, що синтезуються у контрольних і експериментальних зародків на жодній стадії, що узгоджується з іншими роботами (Petzoldt et al., 1983). Для проведення кількісного вимірювання відміни в синтезі окремих білків ми порівнювали електрофореграми контрольних і експериментальних бластоцистів, що вилуплюються (мал. 10, 11).

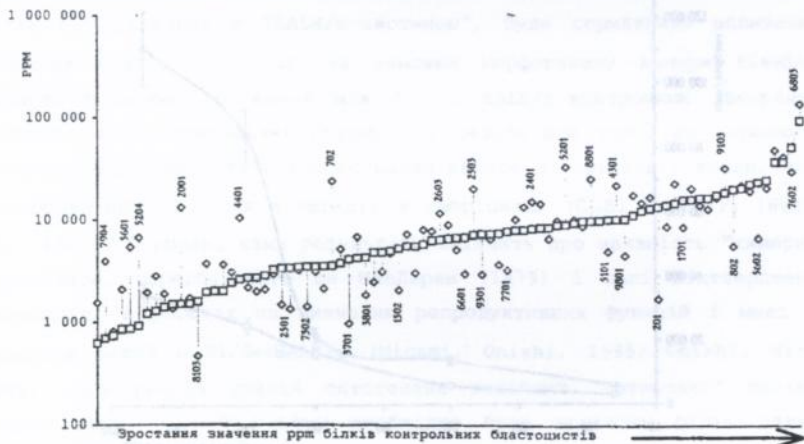


Мал. 10. Білки, що синтезуються контрольними бластоцистами.



Мал. 11. Білки, що синтезуються "двоклітинними" бластоцистами.

На цій стадії спектр синтезованих білків є максимальним, і нам вдалось провести порівняння одразу ж по декільках десятків плям. Ми використовували "двоклітинні" бластоцисти, тому як "одноклітинні" ембріони гинули одразу ж після утворення бластоцелю. Комп'ютерний аналіз двомірних електрофореграм дозволив виявити 98 співпадаючих плям, для 85 з яких було обчислено значення  $r_{pm}$  (частин на мільйон). З 13 інших 10 не було враховано внаслідок їх малої інтенсивності, а 3 дали 100% насичення і не могли бути оцінені.



Мал. 12. Значення  $r_{pm}$  для співпадаючих плям на електрофореграмах контрольних і "двоклітинних" бластоцистів.

На мал. 12 надані співпадаючі пари поліпептидів в порядку зростання значення  $r_{pm}$  контрольних бластоцистів. З цього малюнку видно, що у "двоклітинних" і "одноклітинних" зародків відбувається не тільки

зниження загального рівня трансляційної активності, але й різко змінюється її характер: для багатьох білків спостерігається 3-х і більше кратна зміна ррп в зрівнянні з контролем. На малюнку такі білки відмічено номерами, які надані їм програмою.

Здатність "одноклітинних" зародків до формування бластоцелю дозволяє припустити, що перші морфогенетичні трансформації в онтогенезі миші підлягають принципу "автономної спеціалізації" (Davidson, 1991), іншими словами, в ембріоні первісно є деякий "механізм розгортання програми раннього морфогенезу", яка не залежить від взаємодії бластомерів і механізмів "умовної спеціалізації". Однак у ссавців подібна "ауторегуляція" раннього розвитку не може відбуватись за рахунок прелокалізації деяких материнських факторів (Evsikov et al., 1994); певно, "автоматизм" раннього морфогенезу закладений в визначеному механізмі "go when ready", тобто фактори ооплазми визначають набір генів, які експресуються в момент включення ембріонального геному, які, в свою чергу, будуть визначати експресію наступного набору генів, і так далі.

З одного боку, отримані дані можна пояснити тим, що регуляція синтезу білку "підстроюється" під одноклітинний стан доімплантаційного зародка. В цьому випадку зменшення загального рівня трансляції було б викликано тим, що для функціонування і регуляції "одноклітинного" ембріону необхідно синтезувати істотно меншу кількість білків, які в нормальному зародку повинні бути присутніми в кожному бластомірі. Іншими словами, нормальний ембріон, в порівнянні з "одноклітинним", є більш складною системою, і для свого життєзабезпечення потребує більшої кількості елементів. З іншого боку можливо, що обробка цитохалазином, руйнуючи актиновий цитоскелет і порушуючи ультраструктуру клітини, негативно впливає на безпосередні механізми, що забезпечують трансляцію, і в результаті спостерігається відносно зниження рівня білкового синтезу. В цілому ж, наведені вище міркування дозволяють нам зробити висновок, що час морфогенетичних переходів в доімплантаційному зародку миші визначається не стільки досягненням певної концентрації продуктів кожного етапу, скільки певним набором стадійспецифічних факторів, який і є сигналом до подальшого розвитку.

## ВИСНОВКИ

1. Швидке руйнування першого полярного тільця після виділення, яке певно є своєрідним механізмом, що захищає яйцеклітину від небажаних наслідків його запліднення, викликано нестабільністю во взаємодіях сконденсованого хроматину, актинового цитоскелету і плазматичної мембрани.
2. Розвиток *in vitro* зигот після заміни жіночого пронуклеуса на ядро другого полярного тільця підтверджує, що хромосоми останнього здатні до участі в доімплантаційному морфогенезі миші.
3. Пересадки ядра другого полярного тільця до зиготи свідчать про те, що асинхронність між пересаджуванім ядром і реципієнтною цитоплазмою є головною причиною ранньої зупинки розвитку реконструйованих ембріонів.
4. Успішне проходження першого поділу дроблення енукліюваними зиготами, що злиті з другим полярним тільцем свідчать про те, що робота "цитоплазматичного годинника" першого клітинного циклу частково регулюється станом присутнього в зиготі хроматину. Крім того, таке злиття дає змогу проводити цитогенетичний аналіз хромосомів другого полярного тільця.
5. Зміщення в часі початку утворення бластоцилю у химерних зародків [CB6]B6F2↔BALB/c в порівнянні з контрольними є прикладом прояву "химерного гетерозису", що реалізується при взаємодіях гетерологічних бластомерів химер.
6. Час морфогенетичних переходів в доімплантаційному зародку миші визначається не стільки досягненням певної концентрації продуктів кожного етапу, скільки певним набором стадієспецифічних факторів, який і є сигналом до подальшого розвитку.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Evsikov S.V., Evsikov A.V. Preimplantation development of manipulated mouse zygotes fused with the second polar bodies: a cytogenetic study// *Int J Dev Biol.*— 1994.— V.38.— P.725-730.
2. Евсиков А.В., Евсиков С.В. Изучение первого и второго полярных телец в оогенезе мыши// *Онтогенез.*— 1995.— Т.26, № 3.— С.196-200.
3. Евсиков А.В. Регуляторные механизмы доимплантационного морфогенеза мыши// *Биополимеры и клетка.*— 1997.— Т.13, № 2.— С.93-99.

Евсіков О.В. Часові фактори в процесах доімплантаційного морфогенезу 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 проблемам регуляції завершальних стадій оогенезу і раннього ембріогенезу миші. Виявлено причини швидкої деградації першого полярного тільця. Продемонстровано принципову можливість використання других полярних тілець для виявлення анеуплоїдій жіночого пронуклеусу, а також здібність їх хромосом до підтримки розвитку. Продемонстровано феномен "химерного гетерозису" на доімплантаційних стадіях. На основі вивчення ембріонів, які розвиваються в умовах стримання цитокінезу, розроблено гіпотезу про механізми регуляції доімплантаційного морфогенезу миші.

Ключові слова: ооцит, полярні тільця, ембріон, доімплантаційний морфогенез, химера, регуляція розвитку, миша.

Евсіков А.В. Временные факторы в процессах доимплантационного морфогенеза мыши.- Рукопись.

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

Дисертація посвящена проблемам регуляции завершающих стадий оогенеза и раннего эмбриогенеза мыши. Выявлены причины быстрой деградации первого полярного тельца. Показана принципиальная возможность использования вторых полярных телец для выявления анеуплоидий женского пронуклеуса, а также способность их хромосом к поддержанию развития. Продемонстрирован феномен "химерного гетерозиса" на доимплантационных стадиях. На основе изучения эмбрионов, развивающихся в условиях подавления цитокінеза, разработана гипотеза о механизмах регуляции доимплантационного морфогенеза мыши.

Ключевые слова: ооцит, полярные тельца, эмбрион, доимплантационный морфогенез, химера, регуляция развития, мышь.

Evsikov A.V. Timing Factors In The Processes Of Mouse Preimplantation Morphogenesis.- 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 problems of regulation of oocyte maturation and early embryogenesis in mice. The causes of first polar body degradation were uncovered. Possibility of second polar bodies use for aneuploidy assay of female pronuclei, and the ability of their chromosomes to support early development were demonstrated. Phenomenon of "chimeric heterosis" on preimplantation stages was discovered. On the basis of the study of embryos which developed in the conditions of cytokinesis repression, hypothesis on the mechanisms of regulation of mouse preimplantation morphogenesis was elaborated.

Key Words: Oocyte, Polar Bodies, Embryo, Preimplantation Morphogenesis, Chimera, Regulation Of Development; Mouse.

---

Підписано до друку 14.10.97р. Формат 60х90/16.  
Ум. друк. арк.1,0 Обл.-вид. арк. 0,8.  
Наклад 100. Зам. 266.

---

Відділ оперативної поліграфії  
Центру Міжнародної освіти  
27-12-75. 227-37-86

434738

AB 38.705

**AB 38.705**