



УДК 591

© С. В. Евсиков, Л. М. Морозова, А. П. Соломко, 1990

РОЛЬ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО СООТНОШЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕЙ С УДВОЕННЫМ ОБЪЕМОМ ЦИТОПЛАЗМЫ

Сравнивалось развитие отдельных бластомеров 2-клеточных зародышей мышей и бластомеров с удвоенным объемом цитоплазмы. На скорость дробления уменьшение ядерно-цитоплазматического соотношения (ЯЦС) не повлияло, но образование бластоцели начиналось на 10 ч позже (при большем числе клеток), чем у контрольных зародышей. Приводится гипотеза, согласно которой смена клеточных программ морфогенеза происходит по достижении в клетке определенной концентрации веществ — продуктов реализации предшествующей программы.

Введение. Результаты нашей предыдущей работы [1] позволили предположить, что биологические часы, определяющие преплантационный морфогенез мыши, работают на уровне генома. Их механизм не связан с клеточными делениями и соответственно не зависит от ЯЦС. Первоначально вывод о независимости морфогенеза от ЯЦС был сделан при изучении развития эмбрионов, обработанных ингибиторами синтеза полиаминов, репликации ДНК [2—5].

Но вместе с тем ряд фактов указывает на то, что ЯЦС играет существенную роль на первых этапах развития. Показано, что экспериментальное уменьшение ЯЦС отрицательно сказывается на развитии доимплантационных зародышей мышей. Ни гаплоиды [6, 7], ни зародыши, полученные в результате слияния ядра 8-клеточного с двумя энуклеированными бластомерами 2-клеточного эмбриона [8], не проходят даже первых этапов морфогенеза. Нормализация ЯЦС (при уменьшении объема цитоплазмы у гаплоидов, трансплантации ядра 8-клеточного в энуклеированный бластомер 2-клеточного зародыша) приводит к тому, что значительная часть гаплоидов развивается до бластоцелей [8—10], а реконструированные зародыши проходят полное развитие [8]. Но эти результаты дают мало информации относительно роли ЯЦС в регуляции развития интактного эмбриона. Сообщение о том, что гаплоиды начинают образовывать бластоцель на одно деление позже контрольных [11], по нашему мнению, требует подтверждения. Кроме того, при интерпретации подобных результатов следует учитывать, что уменьшение ЯЦС производилось за счет изменения генома зародыша. Данное обстоятельство само по себе не могло не сказаться на программе развития.

Нас интересовало, как влияет экспериментальное изменение ЯЦС на процесс образования бластоцели. При этом мы полагали, что наиболее корректные результаты могут быть получены при изучении развития зародышей, у которых уменьшение ЯЦС связано не с изменением плоидности, а с увеличением объема цитоплазмы зародыша.

Материалы и методы. Методика работы с доимплантационными зародышами мышей линии C57BL/6J приведена в предыдущей работе [1].

Поскольку один бластомер 2-клеточного зародыша мыши (1/2-бластомер) может развиваться до нормального мышонка [12—14], можно считать его вполне жизнеспособным эмбрионом. Отдельные бластомеры 2-клеточных зародышей получали, разру-

шая второй бластомер прокалыванием его плазматической мембраны. В некоторых случаях остатки разрушенного бластомера удаляли из-под прозрачной оболочки; на последующем развитии это никак не сказывалось. Бластомеры, полученные в результате ферментативного удаления прозрачной оболочки и разделения клеток в бескальциевой среде [15], развивались несколько быстрее, причины этого остаются невыясненными.

Бластомеры с удвоенным объемом цитоплазмы получали следующим образом. У одного бластомера методом МакГрата—Солтера [16] удаляли ядро (рис. 1). После этого в иглу из трубки, закупоренной канлей масла (на снимке сверху), набирали суспензию инактивированного вируса Сендай и впрыскивали ее под прозрачную оболочку. Через 2 ч культивирования слившиеся бластомеры пересаживали в отдельную каплю. Зародышам, у которых бластомеры не слились, в некоторых случаях повторно инициировали вирус Сендай, но это редко приводило к слиянию. Число клеток у зародышей подсчитывали через 50—65 ч культивирования (90—105 ч после овуляции).

Вirus Сендай парабатовали в Ин-те эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л. В. Громашевского МЗ УССР. Концентрирование, инактивацию вируса ультрафиолетом вели согласно методике [17, 18]. Для опытов использовали вирус с титром не менее 2000 ГАЕ/мл.

Результаты и обсуждение. По нашим данным, к 90-му ч после овуляции 70 % зародышей, развившихся из 1/2-бластомеров, начинали паканировать бластоцель, при этом среднее число клеток у ранних бластоцист было ровно в два раза меньше, чем у контрольных зародышей, развивающихся *in vitro* с 2-клеточной стадии ($15,7 \pm 0,4$ и $30,0 \pm 0,5$ клеток). Эти результаты подтверждают данные об отсутствии влияния на развитие бластомера 2-клеточного зародыша того, что он остался один [19, 20].

Из 239 оперированных зародышей бластомеры слились у 138, из них 113 (82 %) развились до морул и бластоцист. К 90-му ч после овуляции лишь 6 % зародышей начали образовывать бластоцель. Особо следует подчеркнуть, что число клеток у морул и бластоцист

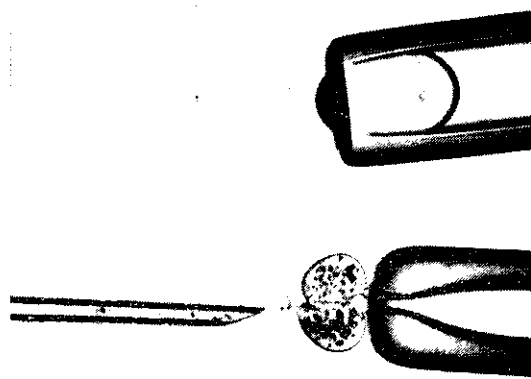


Рис. 1. Получение 1/2-бластомеров с удвоенным объемом цитоплазмы. Энуклеация одного бластомера

Fig. 1. Production of the 1/2-blastomeres with the doubled cytoplasm volume. Enucleation of a blastomere

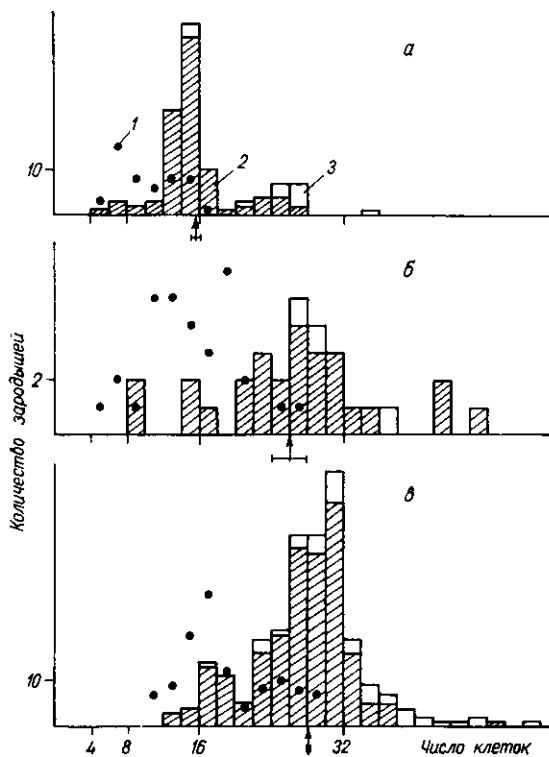
к этому сроку было таким же, как и у контрольных, развившихся из 1/2-бластомеров. Таким образом, скорость клеточных делений после уменьшения ЯЦС не изменяется.

На рис. 2 приведена гистограмма распределения числа клеток у зародышей с удвоенным объемом цитоплазмы, зафиксированных через 90—105 ч после овуляции. Среднее число клеток у ранних бластоцист 26 ± 2 .

Контролем к оперированным зародышам служат 1/2-бластомеры, хотя по ЯЦС бластомер с удвоенным объемом цитоплазмы соответствует зиготе. Если у 1/2-бластомеров 70 % бластоцист развились через 50 ч культивирования, у зигот — через 75 ч, то оперированные зародыши развивались до этой стадии 60—65 ч. По стадии начала кавитации зародыши, развившиеся из бластомеров с удвоенным объемом цитоплазмы, близки зародышам, культивируемым с 1-клеточной стадии, для которых среднее число клеток у ранних бластоцист $28,2 \pm 0,2$ (рис. 2).

Полученные результаты могут служить хорошим подтверждением гипотезы о решающей роли ЯЦС в запуске кавитации. Факт образования реконструированными зародышами бластоцели раньше зигот может объясняться тем, что бластомер 2-клеточного зародыша уже прошел первое деление дробления, длящееся 20 ч [21]. На наш взгляд, существует иное объяснение полученных результатов, лучше соответствующее имеющимся на сегодняшний день данным.

Известно, что уменьшение объема цитоплазмы у зигот не влияет на время появления бластоцист, но уменьшает скорость дробления [1,



22]; уменьшение ЯЦС не сказывается на скорости дробления, но задерживает образование бластоцели. Это, а также тот факт, что запуск кавитации зависит не столько от числа клеточных делений, сколько от времени, прошедшего с начала развития [1], указыва-

Рис. 2. Распределение числа клеток у морул (1), ранних бластоцист (2) и бластоцист (3), развившихся из: а — 1/2-бластомеров; б — 1/2-бластомеров с удвоенным объемом цитоплазмы; в — зигот на стадии двух пронуклеусов. Стрелками обозначено среднее число клеток у ранних бластоцист
Fig. 2. Cell distribution among morulae (1), nascent blastocysts (2) and blastocysts (3) developed in vitro from: a — 1/2-blastomeres; б — 1/2-blastomeres with the doubled cytoplasm volume; в — 2-pronuclei stage zygotes. Arrays show the average number of cells in nascent blastocysts

ют на то, что клеточные деления и образование бластоцели — независимые процессы, регулирующие на различных уровнях.

На основе имеющихся данных вырисовывается следующий принцип действия молекулярных механизмов развертывания программы развития. После начала транскрипции первого комплекса генов каждая последующая клеточная программа (лежащая за «point of no return» по Джонсону [23]) может быть запущена лишь после того, как произведено некое морфогенетическое действие, например, достигнута определенная концентрация белков — продуктов реализации предшествующей программы. При уменьшении объема цитоплазмы замедляется скорость пост-транскрипционного биосинтеза, но одновременно уменьшается и количество каждого белка, необходимое для достижения его определенной концентрации в цитоплазме. Естественно, что на различных стадиях развития отдельные морфогенетические процессы могут как ускоряться, так и замедляться. Например, процесс формирования мужского пронуклеуса ускоряется при уменьшении объема цитоплазмы ооцита [24]. Некоторое замедление образования бластоцели [1] указывает на то, что уменьшение объема не компенсирует негативных последствий удаления части систем жизнеобеспечения. При увеличении объема цитоплазмы лимитирующим фактором будет, очевидно, мРНК; время для наработки необходимого количества транскриптов увеличится. Накопление бластоцели будет задерживаться.

В общем приходится согласиться, что однозначно интерпретировать результаты, полученные при экспериментальном изменении ЯЦС,

довольно сложно [23]. Но в совокупности с данными по культивированию [1], обработке зародышей ингибиторами репликации ДНК [2—5], биосинтезу белков [25, 26], по пересадке ядер (см. обзоры [27, 28]) они убеждают нас в том, что цитоплазма яйцеклетки не имеет сколько-либо заметного регуляторного влияния на процесс образования бластоцели. Другими словами, нам представляется маловероятным наличие в цитоплазме зиготы регуляторных факторов, которые, титруясь при дроблении зародыша, после определенного числа клеточных делений позволяют включаться следующей клеточной программе. Справедливость этой гипотезы для рыб и земноводных [29, 30] ни в коей мере не доказывает ее применимости к млекопитающим, поскольку роль и функции цитоплазмы на первых этапах развития у этих классов заметно различаются [31].

Следует отметить, что вне зависимости от правильности рассуждений, приведенных выше, результат, полученный при изучении развития бластомеров с удвоенным объемом цитоплазмы, следует учитывать при интерпретации результатов клонирования млекопитающих. Дело в том, что задержка во времени запуска кавитации для ядер, пересаженных в цитоплазму зиготы, приводится как доказательство «перепрограммирования» генома [32, 33]. Но когда мы удваиваем объем цитоплазмы у ядра 2-клеточного зародыша, образование бластоцели задерживается почти на 12 ч, хотя теоретических предпосылок для того, чтобы говорить о перепрограммировании, не имеется. По-видимому, доказательства измененности программы развития в результате эксперимента следует искать прежде всего на молекулярном уровне. Первые шаги в этом направлении уже сделаны [8, 33—35].

Авторы искренне благодарят С. Л. Рыбалко за помощь при работе с вирусом Сендай.

ROLE OF THE NUCLEOCYTOPLASMIC RATIO IN REGULATION OF THE MAMMALIAN DEVELOPMENT. DEVELOPMENT OF THE EMBRYOS WITH THE DOUBLED CYTOPLASM VOLUME

S. V. Evsykov, L. M. Morozova, A. P. Solomko

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Certain blastomeres of the two-cell mouse embryos and blastomeres with the doubled cytoplasm volume have been compared as to their development in vitro. A decrease of the nucleocytoplasmic ratio had no effect on the rate of embryo cleavage, but the blastocoele appearance was 10 h delayed with more cleavage divisions than in control. The presented hypothesis suggests that the change of cellular morphogenetic programs requires definite concentration of substances — products of the previously realized program.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евсиков С. В., Морозова Л. М., Соломко А. П. Роль ядерно-цитоплазматического соотношения в регуляции развития млекопитающих. Развитие зигот с уменьшенным объемом цитоплазмы // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 5.— С. 87—93.
2. Bolton V. N., Oades P. J., Johnson M. H. The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo // J. Embryol. and Exp. Morphol.— 1984.— 79.— P. 139—163.
3. Smith R. K. V., Johnson M. H. DNA replication and compaction in the cleaving embryo of the mouse // Ibid.— 1985.— 89.— P. 133—148.
4. Dean W. L., Rossant J. Effect of delaying DNA replication on blastocyst formation in the mouse // Differentiation.— 1984.— 26, N 2.— P. 134—137.
5. Alexandre H. The utilization of spermidine and spermine synthesis as a tool for the study of the determination of cavitation in the preimplantation mouse embryo, // J. Embryol. and Exp. Morphol.— 1979.— 53.— P. 145—162.
6. Kaufman M. H., Sachs L. Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos // Ibid.— 1976.— 35.— P. 179—190.

7. *Modlinski J. A.* Preimplantation development of microsurgically obtained haploid and homozygous diploid mouse embryos and effects of pretreatment with cytochalasin B on enucleated eggs // *Ibid.*—1980.—**60**.—P. 153—161.
8. *Howlett S. K., Barton S. C., Surani M. A.* Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos // *Development.*—1987.—**101**, N 4.—P. 915—925.
9. *Tarkowski A. K., Rossant J.* Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes // *Nature.*—1976.—**259**, N 5545.—663—665.
10. *McGrath J., Solter D.* Nucleoplasmic interactions in the mouse embryo // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1986.—**97**, suppl.—P. 277—289.
11. *Witkowska A.* Parthenogenetic development of mouse embryos *in vivo*. I. Preimplantation development // *Ibid.*—1973.—**30**.—P. 519—545.
12. *Tarkowski A. K.* Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse eggs // *Acta Theriol.*—1959.—**3**, N 11.—P. 191—267.
13. *Hoppe P. C., Whitten W. K.* Does X chromosome inactivation occur during mitosis of first cleavage? // *Nature.*—1972.—**239**, N 5374.—P. 520.
14. *Tsunoda Y., McLaren A.* Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres // *J. Reprod. and Fert.*—1983.—**69**, N 1.—P. 315—322.
15. *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual* / B. Hogan, F. Constantini, E. Lacy et al.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1986.—332 p.
16. *McGrath J., Solter D.* Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion // *Science.*—1983.—**220**, N 4603.—P. 1300—1302.
17. *Giles R. E., Ruddle F. H.* Production of Sendai virus for cell fusion // *In Vitro.*—1973.—**9**, N 2.—P. 103—107.
18. *Harris H., Watkins J. F.* Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species // *Nature.*—1965.—**205**, N 4972.—P. 640—646.
19. *O'Brien M. J., Critser E. S., First N. L.* Developmental potential of isolated blastomeres from early murine embryos // *Theriogenology.*—1984.—**22**, N 5.—P. 601—607.
20. *Rands G. F.* Cell allocation in half- and quadrupule-sized preimplantation mouse embryos // *J. Exp. Zool.*—1985.—**236**, N 1.—P. 67—70.
21. *Muro B., Howlett S. K., Johnson M. H.* Cellular and molecular interpretation of mouse early development: the first cell cycle // *Gametogenesis and the early embryo* / Ed. J. G. Gall.—New York: A. R. Liss, 1986.—P. 389—407.
22. *Petzoldt U., Muggleton-Harris A.* The effect of the nucleocytoplasmic ratio on protein synthesis and expression of a stage-specific antigen in early cleaving mouse embryos // *Development.*—1987.—**99**, N 4.—P. 481—493.
23. *Johnson M. H.* The molecular and cellular basis of preimplantation mouse development // *Biol. Rev.*—1981.—**56**.—P. 463—498.
24. *Borsuk E., Manka R.* Behavior of sperm nuclei in intact and bisected metaphase II mouse oocytes fertilized in the presence of colcemid // *Gamete Res.*—1988.—**20**, N 3.—P. 365—376.
25. *Kidder G. M., McLachlin J. R.* Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos // *Develop. Biol.*—1985.—**112**, N 2.—P. 265—275.
26. *The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis* / J. Levy, M. H. Johnson, H. Goodall, B. Maro // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1986.—**95**.—P. 213—237.
27. *Ротт Н. Н.* Новые данные о пересадках ядер у млекопитающих // *Онтогенез.*—1987.—**18**, № 4.—С. 341—344.
28. *Solter D.* Inertia of the embryonic genome in mammals // *Trends Genet.*—1987.—**3**, N 1.—P. 23—27.
29. *Rolt N. N., Sheveleva G. A.* Changes in the rate of cell divisions in the course of early development of diploid and haploid loach embryos // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1968.—**20**.—P. 141—150.
30. *Newport J., Kirschner M.* A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: 1. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage // *Cell.*—1982.—**30**, N 3.—P. 675—686.
31. *Tarkowski A. K.* Nucleo-cytoplasmic interactions in oogenesis and early embryogenesis in the mouse // *Embryonic Development. Genetic Aspects* / Eds M. M. Burger, R. Weber.—New York: A. R. Liss, 1982.—P. 407—416.
32. *Stice S. L., Robl J. M.* Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos // *Biol. Reprod.*—1988.—**39**, N 3.—P. 657—665.
33. *Surani M. A. H., Barton S. C., Norris M. L.* Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome // *Cell.*—1986.—**45**, N 1.—P. 127—136.
34. *Prather R. S., First N. L.* Chimerization of highly asynchronous murine blastomeres: developmental alteration? // *Gamete Res.*—1988.—**19**, N 4.—P. 359—369.
35. *Трансплантация ядер клеток хрусталика в зиготы мыши и экспрессия генов α-кристаллинов* / О. А. Ларионов, Е. С. Платонов, О. В. Миронова и др. // *Журн. общ. биологии.*—1988.—**49**, № 2.—С. 263—270.