



УДК 591

Л. М. Морозова, М. Р. Столина, А. П. Соломко

ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ГЕНЕТИКО-ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЯХ МЫШЕЙ.

2. СРАВНЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ОПЛОДОТВОРЕНИЮ *in vitro*

У ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ C57BL/6j и BALB/cLac

*Изучена возможность оптимизации биологической системы для оплодотворения *in vitro* без предварительной гормональной стимуляции линейных доноров гамет. Выбрана культуральная среда для фертилизации *in vitro*, оптимальная, как минимум, для двух контрастных по многим характеристикам инбредных линий мышей C57BL/6j и BALB/cLac. Показана доминирующая роль отцовского генотипа в процессе оплодотворения *in vitro* и материнского — при развитии зародышей в культуре вплоть до поздних доимплантационных стадий. Использование мужских гамет C57BL увеличивает эффективность оплодотворения *in vitro* с 50 до 76 %, а наличие такого материнского генотипа обеспечивает успешное развитие до бластоцист 90 % линейных и гибридных зародышей.*

Введение. Исследования по оплодотворению *in vitro* у мышей были начаты в 70-е годы [1—4]. Большинство из них преследовало цель улучшить методику оплодотворения, но, по-видимому, в связи с незначительным выходом оплодотворенных зародышей мышей инбредных линий эти работы, в основном, велись на гаметах аутбредных линий или гибридов [5—7].

Создание оптимальной биологической системы для осуществления современных генетико-эмбриологических исследований потребовало выполнения ряда условий, приведенных в нашем первом сообщении. Настоящая работа посвящена изучению влияния генотипов контрастных по многим характеристикам [8] доноров гамет на эффективность оплодотворения и жизнеспособность зародышей в системе *in vitro*.

Материалы и методы. В качестве доноров яйцеклеток использовали 3—5-месячных самок мышей линий C57BL/6j и BALB/cLac без предварительной индукции суперовуляции, а доноров спермы — фертильных самцов тех же линий, используемых в скрещиваниях один раз в неделю. Мышей содержали при инвертированном световом режиме 12 : 12 со световым периодом с 10 до 22 ч.

Оплодотворение *in vitro* проводили по методике [9] в средах, отличающихся соотношением ионов K^+/Na^+ и содержанием БСА: среда I [9], среда II [10]. Концентрации подвижных спермиев после 2 ч капцитации подсчитывали индивидуально для каждого самца в камере Горяева.

Для оценки жизнеспособности зародышей, полученных при оплодотворении *in vitro*, их культивировали в среде M-16 [9] до стадии бластоцисты или трансплантировали на двухклеточной стадии в ампулу яйцевода самкам-реципиентам линии ICR [9].

Результаты и обсуждение. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о доминирующей роли отцовского генотипа в процессе оп-

лодотворения: выход одноклеточных гомо- и гетерозигот, несущих отцовский генотип С57BL, был стабильно высоким (60—76 %) вне зависимости от типа среды. В то же время при оплодотворении яйцеклеток донорской спермой BALB в среде I количество одноклеточных зародышей двух типов оставалось постоянно низким — 20—30 % от исходного числа яйцеклеток. Однако проведение экспериментов в среде II обеспечило увеличение доли гомо- и гетерозигот (53 и 41 % соответственно). Полученные результаты, возможно, объясняются еще и тем, что, по данным Брандера с соавт. [11], яйцеклетки мышей линии С57BL более чувствительны к действию гиалуронидазы и проназы, чем

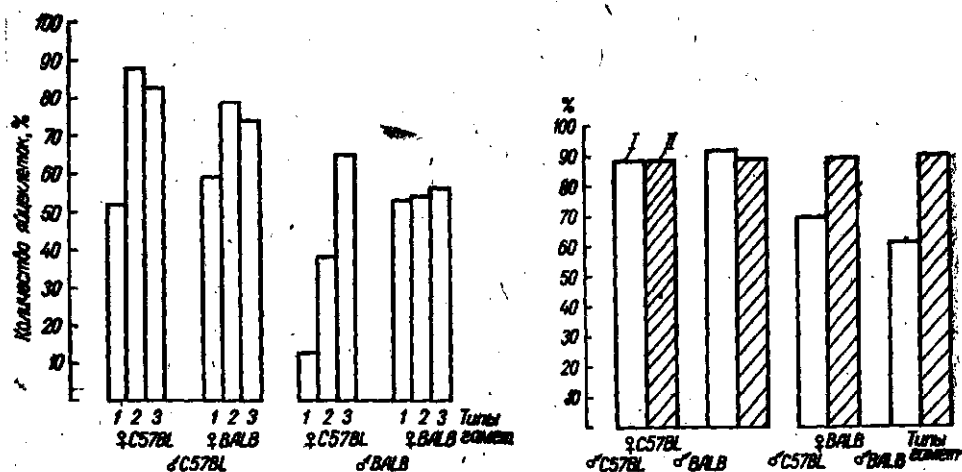


Рис. 1. Зависимость результатов оплодотворения *in vitro* яйцеклеток от генотипа и исходной концентрации подвижных спермиев (1—0—8; 2—9—16; 3—17 млн/мл)

Рис. 2. Развитие зародышей в зависимости от типа среды (I, II) при оплодотворении *in vitro*. По оси ординат: доля одноклеточных зародышей, развившихся до стадии двух бластомеров

яйцеклетки линии BALB, а анализ гибридов между этими линиями выявил реципрокные различия по чувствительности к действию ферментов с ярко выраженной отцовской компонентой наследования [11].

Таким образом, среда II оказалась лучшей при наличии отцовского генотипа BALB, и обсуждение влияния исходной концентрации подвижных спермиев на результат фертилизации *in vitro* будет проведено по данным, полученным с использованием среды Фразера [10]. Сперму всегда выделяли из одного эпидимиса, но концентрации подвижных спермиев после капацитации в фиксированном объеме среды (0,5 мл) варьировали. Оказалось (рис. 1), что в среде II оплодотворение спермиями С57BL идет лучше в диапазоне концентраций 9—16 млн подвижных сперматозоидов в 1 мл, а для сперматозоидов BALB отмечается улучшение способности к оплодотворению с повышением концентрации, но эта способность все равно значительно ниже относительно С57BL.

Мы оценили распределение самцов в популяции по концентрации у них подвижных спермиев. Оказалось, что для линии С57BL распределение составило 27 : 27 : 34 (соответственно диапазонам концентраций сперматозоидов 1—8; 9—16; 17 млн/мл и более), в то время как для линии BALB — 29 : 40 : 44 (возможно, что концентрация спермы, наиболее благоприятная для оплодотворения, находится в области более высоких концентраций).

Для оценки жизнеспособности зародышей, полученных оплодотворением *in vitro* в средах обоих типов, их культивировали со стадии зиготы в среде М-16. Обнаружено, что среда I оказывает при оплодотворении продленное отрицательное воздействие на дальнейшее развитие зародышей, несущих материнский генотип BALB (рис. 2). Так, до ста-

дни двух бластомеров развилось только 60—70 % гомо- и гетерозигот, полученных в этой среде. В это же время число двухклеточных зародышей того же типа, оплодотворенных в среде II, составило порядка 90 % от количества одноклеточных. В случае материнского генотипа C57BL до стадии двух бластомеров развилось 89—92 % зигот вне зависимости от типа среды. В работе Середенина с соавт. [12] показано различие генотипов C57BL и BALB в качестве окислителей лекарственных веществ: BALB имеет более сильный фенотип окисления, а гибриды наследуют фенотип сильного родителя. Вероятно, в нашем случае наличие материнского генотипа BALB обуславливает повышенную чувствительность зигот к культуральным средам.

Полученные данные свидетельствуют о том, что среда II более приемлема для оплодотворения при наличии гамет BALB. В связи с этим для дальнейшего развития в культуре мы брали зародышей, оплодотворенных в этой среде (табл. 2). Развитие зародышей C57BL до бластоцист составляло 89—91 %, что совпадает с нашими данными по культивированию двухклеточных зародышей C57BL, вымытых из яйцеводов (контроль — 91 %), однако развитие оплодотворенных *in vitro* зародышей BALB хуже, чем в контроле (50 и 88 % соответственно) [13]. Количество F₁-гибридов с материнским генотипом C57BL, развившихся до бластоцист, составило 89 %, в то время как в случае F₁-гибридов с цитоплазмой BALB — 63 % (см. табл. 2). При развитии зародышей до бластоцист всегда наблюдался материнский эффект — больший выход эмбрионов обуславливался наличием яйцеклеток C57BL.

Для оценки жизнеспособности оплодотворенных *in vitro* яйцеклеток восьми псевдобеременным самкам линии ICR трансплантировали двухклеточных зародышей всех исследованных генотипов из расчета девять зародышей на одну самку. Семь самок оказались беременными и были вскрыты на 16-й день. Из 73 пересаженных зародышей имплантировалось 37, из них живой — 31.

Таким образом, при постановке методики оплодотворения и культивирования *in vitro* зародышей инбредных линий мышей необходим анализ взаимодействия биологических факторов, влияющих на эти процессы. Нами показана чувствительность яйцеклеток, сперматозоидов и зигот к типу среды для оплодотворения, связанная с линейной принадлежностью самок и самцов — доноров гамет. Однако возможен выбор среды, оптимальной, как минимум, для двух контрастных по мно-

Таблица 1

Влияние генотипов гамет и типа среды на результат оплодотворения *in vitro*

Тип гамет		Среда	Число яйцеклеток	Число одноклеточных зародышей (%)	Тип гамет		Среда	Число яйцеклеток	Число одноклеточных зародышей (%)
♀	♂				♀	♂			
C57BL	C57BL	I	284	200 (70,4)	BALB	C57BL	I	371	226 (60,9)
		II	152	98 (64,4)			II	118	90 (76,2)
	BALB	I	168	49 (29,1)		BALB	I	357	74 (20,7)
		II	270	111 (41,1)			II	311	165 (53,1)

Таблица 2

Влияние генотипов гамет на развитие в культуре двухклеточных зародышей, полученных оплодотворением *in vitro*

Тип скрещивания		Число двухклеточных зародышей	Число зародышей, развившихся до бластоцист (%)	Тип скрещивания		Число двухклеточных зародышей	Число зародышей, развившихся до бластоцист (%)
♀	♂			♀	♂		
C57BL	C57BL	98	90 (91,8)	BALB	C57BL	711	45 (6,3)
		BALB	66		59 (89,4)		BALB

тим характеристикам линий (среда II). Очевидно, что для самцов каждой линии мышей существует оптимальная исходная концентрация подвижных спермиев, обеспечивающая успешный процесс оплодотворения *in vitro*. Положительное влияние C57BL-генотипа спермиев на процесс искусственного оплодотворения следует учитывать в качестве важного фактора при выборе инбредной линии доноров гамет.

Анализ развития одноклеточных зародышей в культуре показал, что материнский генотип C57BL обеспечивает их нормальное дробление до поздних доимплантационных стадий. В то же время отрицательное влияние материнского генотипа BALB проявляется со стадии зиготы вплоть до поздней бластоцисты. Таким образом, для оплодотворения *in vitro* следует использовать гаметы доноров инбредной линии C57BL, а наличие такого материнского генотипа у линейных зародышей и F₁-гибридов обеспечивает их успешное развитие в культуре и жизнеспособность.

Summary. We present data on optimization of the biological system for *in vitro* fertilization without preliminary hormonal stimulation of inbred ova donors. An incubation medium for *in vitro* fertilization was chosen, which is optimal for at least two different in many features inbred mice strains C57BL/6j and BALB/cLac. We demonstrated the male genotype is dominant during *in vitro* fertilization, while the female genotype appears to be dominant in the course of zygote development in culture until late preimplantation stages. Application of C57BL spermatozoa rises the effectivity of *in vitro* fertilization from 50 to 76%. Maternal C57BL genotype ensures successful development of about 90% of homo- and heterozygotes till blastocyst stage.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Whittingham D. Fertilization of mouse eggs *in vitro* // Nature.— 1968.— 220.— P. 592—593.
2. Pavlok A. Fertilization of mouse ova *in vitro*. 1. Effect of some factors on fertilization // J. Reprod. Fert.— 1968.— 16.— P. 401—408.
3. Hoppe P., Pitts S. Fertilization *in vitro* and development of mouse ova // Biol. Reprod.— 1973.— 8.— P. 420—426.
4. Fraser L. R., Drury L. The relationship between sperm concentration and fertilization *in vitro* of the mouse eggs // Ibid.— 1975.— 13.— P. 513—518.
5. Fraser L. R. Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation // J. Exp. Zool.— 1977.— 202.— P. 439—442.
6. Binding of mouse spermatozoa to the *Zona pellucida* of mouse eggs in cumulus: evidence that the acrosomes remain substantially intact / B. T. Storey, M. A. Lee, C. Muller et al. // Biol. Reprod.— 1984.— 31, N 5.— P. 1119—1128.
7. Talansky B. E., Gordon J. W. Cleavage characteristics of mouse embryos inseminated and cultured after *Zona pellucida* drilling // Gamete Res.— 1988.— 21.— P. 277—287.
8. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований / Э. К. Бландова, В. А. Душкин, А. М. Малашенко, Е. Ф. Шмидт.— М.: Наука, 1983.— 190 с.
9. Hogan B., Costantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1986.— 332 p.
10. Fraser L. R. Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility *in vitro* // J. Reprod. Fert.— 1983.— 69.— P. 539—553.
11. Bander S. A. A., Watson S. C., Shire J. G. M. Paternal inheritance of egg traits in mice: a case of genomic imprinting // Genet. Res.— 1989.— 54, N 3.— P. 213—219.
12. Определение фенотипа окисления у инбредных мышей линий C57BL/6 и BALB/c / С. Б. Середенни, И. В. Рыбина, Т. Г. Хлопушина, В. П. Жердев // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1990.— 110, № 11.— С. 491—493.
13. 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.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики, АН Украины, Киев

Получено 06.09.91