



УДК 591

Л. М. Морозова, М. Р. Століна, О. П. Соломко

## ОПТИМІЗАЦІЯ СИСТЕМИ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ГЕНЕТИКО-ЕМБРІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ НА ІНБРЕДНИХ ЛІНІЯХ МИШЕЙ.

### 2. ПОРІВНЯННЯ ЗДАТНОСТІ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO* ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ МИШЕЙ C57BL/6j І BALB/cLac

Вивчено можливість оптимізації біологічної системи для запліднення *in vitro* без попередньої гормональної стимуляції лінійних донорів гамет. Обрано культуральне середовище для фертилізації *in vitro*, оптимальне, як мінімум, для двох контрастних за багатьма характеристиками інbredних ліній мишей C57BL/6j і BALB/cLac. Показано домінуючу роль батьківського генотипу у процесі запліднення *in vitro* та материнського — під час розвитку зародків у культурі аж до пізніх доімплантаційних стадій. Використання чоловічих гамет C57BL збільшує ефективність запліднення *in vitro* від 50 до 76 %, а наявність такого материнського генотипу забезпечує успішний розвиток до бластоцист 90 % лінійних і гібридних зародків.

**Вступ.** Праці з запліднення *in vitro* у мишей розпочалися у 70-х роках [1—4]. Більшість з них мало на меті поліпшення методики запліднення, але, певно у зв'язку із незначним виходом запліднених зародків інbredних ліній, роботи, в основному, провадили на гаметах аутоbredних ліній або гібридів [5—7].

Створення оптимальної біологічної системи для здійснення сучасних генетико-ембріологічних робіт вимагало виконання ряду умов, які наведено у нашому першому повідомленні. Нинішню працю присвячено дослідженню впливу генотипів контрастних за багатьма характеристиками [8] донорів гамет на ефективність запліднення та життєздатність зародків у системі *in vitro*.

**Матеріали і методи.** Як донорів яйцеклітин використовували 3—5-місячних самиць мишей лінії C57BL/6j і BALB/cLac без попередньої індукції суперовуляції, а як донорів сперми — фертильних самців тих самих ліній, котрих використовували один раз на тиждень. Мишей тримали за інвертованого світлового режиму 12 : 12 із світловим періодом з 10 до 22 год.

Таблиця 1

Вплив генотипів гамет і типу середовища на результат запліднення *in vitro*

| Тип гамет |       | Середовище | Кількість яйцеклітин | Кількість одноклітинних зародків (%) | Тип гамет |       | Середовище | Кількість яйцеклітин | Кількість одноклітинних зародків (%) |
|-----------|-------|------------|----------------------|--------------------------------------|-----------|-------|------------|----------------------|--------------------------------------|
| ♀         | ♂     |            |                      |                                      | ♀         | ♂     |            |                      |                                      |
| 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(41,4)                            |           |       | II         | 311                  | 165(53,1)                            |

© Л. М. МОРОЗОВА, М. Р. СТОЛІНА, О. П. СОЛОМКО, 1992

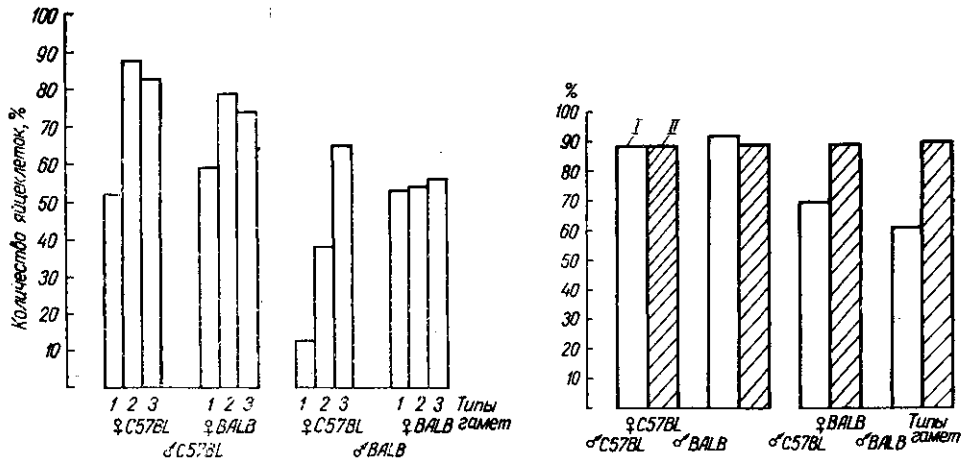
ISSN 0233-7657. БІОПОЛІМЕРИ І КЛІТИНА. 1992. Т. 8. № 3

87

Запліднення *in vitro* здійснювали за методикою [9] у середовищах, які відрізнялися співвідношенням іонів  $K^+/Na^+$  та вмістом БСА: середовище I [9], середовище II [10]. Підрахунок концентрації рухливих спермій після 2 год. капацитації виконували індивідуально для кожного самця у камері Горяєва.

З метою оцінки життєздатності зародків, яких отримували при заплідненні *in vitro*, їх культивували у середовищі M-16 [9] до стадії бластоцисти або трансплантували на двоклітинній стадії до ампули яйцепроводу самицям-реципієнтам ICR [9].

**Результати і обговорення.** Дані, які наведено у табл. 1, свідчать про домінуючу роль батьківського генотипу у процесі запліднення:



Мал. 1. Залежність результатів запліднення *in vitro* яйцеклітин від генотипу та вихідної концентрації рухливих спермій (1—0—8; 2—9—16; 3—17 млн/мл)

Мал. 2. Розвиток зародків в залежності від типу середовища (I, II) при заплідненні *in vitro*. По осі ординат: частота одноклітинних зародків, які розвинулися до стадії двох бластомерів

вихід одноклітинних гомо- і гетерозигот, що несуть батьківський генотип C57BL, був стабільно високим (60—76 %) незалежно від типу середовища. У той же час при заплідненні яйцеклітин донорською спермою BALB у середовищі I кількість одноклітинних зародків двох типів залишалася стабільно низькою — 20—30 % від вихідної кількості яйцеклітин. Проте проведення експериментів у середовищі II забезпечило збільшення частки гомо- і гетерозигот (53 і 41 % відповідно). Отримані результати, можливо, пояснюються ще й тим, що, за даними Брандера з співавт. [11], яйцеклітини мишей лінії C57BL є більш чутливими до дії гіалуронідази і пронази, ніж яйцеклітини лінії BALB, а аналіз гібридів між цими лініями виявив реципрокні розбіжності за чутливістю до дії ферментів з виразною батьківською компонентою наслідування [11].

Таким чином, середовище II виявилось кращим при наявності батьківського генотипу BALB, і обговорення впливу вихідної концентрації рухливих спермій на результат фертилізації *in vitro* буде провадитися за даними, які отримано з використанням середовища Фразера [10]. Виділення сперми відбувалося завжди з одного епідіміса, але концентрації рухливих спермій після капацитації у фіксованому об'ємі середовища (0,5 мл) варіювали. Виявилось (мал. 1), що у середовищі II запліднення сперміями C57BL йде краще у діапазоні концентрацій 9—16 млн рухливих сперматозоїдів у 1 мл, а для сперматозоїдів BALB відзначено покращення здатності до запліднення з підвищенням концентрації, але ця здатність однаково значно нижча відносно C57BL.

Ми оцінили розподіл самців у популяції за концентрацією в них рухливих спермій. З'ясувалося, що для лінії C57BL розподіл складав

27:27:34 (відповідно до діапазонів концентрацій сперматозоїдів — 1—8; 9—16; 17 млн/мл і більше), у той же час, для лінії BALB він складав 29:40:44 (можливо, що концентрація сперми, найбільш сприятлива до запліднення, лежить у межах більш високих концентрацій).

Для оцінки життєздатності зародків, які отримували шляхом запліднення *in vitro* у середовищах двох типів, їх культивували від стадії зиготи у середовищі М-16. Виявлено, що середовище I при заплідненні має подовжений негативний вплив на подальший розвиток зародків, які несуть материнський генотип BALB (мал. 2). Так, до стадії двох бластомерів розвивалося тільки 60—70 % гомо- і гетерозигот, отриманих у цьому середовищі. В той же час кількість двоклітинних зародків того ж типу, запліднених у середовищі II, складала біля 90 % від кількості одноклітинних. У випадку материнського генотипу C57BL до стадії 2 бластомерів розвинулося 89—92 % зигот незалежно від середовища. У праці Середеніна з співавт. [12] показано різницю генотипів C57BL і BALB як окислювачів лікарських речовин: BALB має більш сильний фенотип окислювання, а гібриди наслідують фенотип сильнішого з батьків. Можливо, у нашому випадку наявність материнського генотипу BALB обумовлює підвищену чутливість зигот до культуральних середовищ.

Отримані дані свідчать про те, що середовище II більш прийнятне для запліднення при наявності гамет BALB. У зв'язку з цим для подальшого розвитку у культурі ми брали зародки, запліднені у цьому середовищі (табл. 2). Розвиток зародків C57BL до бластоцист складав 89—91 %, що співпадає з нашими даними з культивування двоклітинних зародків C57BL, котрі вимивали з яйцепроводів (контроль — 91 %), однак розвиток запліднених *in vitro* зародків BALB гірший, ніж у контролі (50 і 88 % відповідно) [13]. Кількість F<sub>1</sub>-гібридів з материнським генотипом C57BL, що розвинулися до бластоцист, складала 89 %, в той же час у випадку F<sub>1</sub>-гібридів з цитоплазмою BALB вона складала 63 % (див. табл. 2). При розвитку зародків до бластоцист завжди спостерігався материнський ефект — більший вихід ембріонів обумовлювався наявністю яйцеклітин C57BL.

З метою оцінки життєздатності запліднених *in vitro* яйцеклітин вісьмом псевдовагітним самицям лінії ICR трансплантували двоклітинні зародки усіх досліджених генотипів, виходячи з розрахунку: дев'ять зародків на одну самицю. Сім самиць виявилися вагітними і їх розітнули на 16-й день. З 73 пересаджених зародків імплантувало 37, з них 31 — живий.

Таким чином, становлення методики запліднення і культивування *in vitro* зародків інбредних ліній мишей потребує аналізу взаємодії біологічних факторів, які впливають на ці процеси. Нами показано чутливість яйцеклітин, сперматозоїдів та зигот до типу середовища для запліднення, пов'язану з лінійною приналежністю самиць і самців—донорів гамет. Проте є можливим вибір середовища, оптимального, як мінімум, для двох контрастових за багатьма характеристиками ліній (середовище II). Очевидно, що для самців кожної лінії мишей існує оптимальна вихідна концентрація рухливих спермій, яка

Таблиця 2

Вплив генотипів гамет на розвиток у культурі двоклітинних зародків, одержаних шляхом запліднення *in vitro*

| Тип схрещування |       | Кількість двоклітинних зародків | Кількість зародків, що розвинулися до бластоцист (%) | Тип схрещування |       | Кількість двоклітинних зародків | Кількість зародків, що розвинулися до бластоцист (%) |
|-----------------|-------|---------------------------------|--|-----------------|-------|---------------------------------|--|
| ♀               | ♂     |                                 |  | ♀               | ♂     |                                 |  |
| C57BL           | C57BL | 98                              | 90(91,8)   | BALB            | C57BL | 70                              | 45(63,4)   |
|                 | BALB  | 66                              | 59(89,4)   |                 | BALB  | 54                              | 27(50,0)   |

забезпечує успішний процес запліднення *in vitro*. Позитивний вплив С57BL-генотипу спермій на процес штучного запліднення слід враховувати як важливий фактор під час вибору інбредної лінії донорів гамет.

Аналіз розвитку одноклітинних зародків у культурі показав, що материнський генотип С57BL забезпечує їх нормальне поділення до пізніх доімплантаційних стадій. У той же час негативний вплив материнського генотипу BALB виявляється зі стадії зиготи аж до пізньої бластоцисти. Таким чином, для запліднення *in vitro* слід використовувати гамети донорів інбредної лінії С57BL, а наявність такого материнського генотипу у лінійних зародків і F<sub>1</sub>-гібридів забезпечує їх успішний розвиток у культурі та життєздатність.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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 / З. К. Бландова, В. А. Душкин, А. М. Малашенко, Е. Ф. Шмидт.— М.: Наука, 1983.— 190 с.
9. Hogan B., Constantini 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 С<sub>57</sub>BL/6 и BALB/c / С. Б. Середенин, 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. біології і генетики АН України, Київ

Одержано 06.09.91