

УДК 576.3: 591.3: 636.934

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГЕНОМА ХОРЯ ПЕРЕД ИМПЛАНТАЦИЕЙ

© 2010 г. Г. К. Исакова

Институт цитологии и генетики СО РАН
630090 Новосибирск, проспект Лаврентьева, д. 10
E-mail: isakova@math.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.04.09 г.
Окончательный вариант получен 13.10.09 г.

Проведено цитогенетическое изучение активности эмбрионального генома в клетках бластоцист хоря *Mustela putorius*, не имплантирующихся в эпителий матки в течение ~6 дней после их перехода из яйцевода в полость матки. Обнаружено, что у хоря задержка в имплантации не сопровождается подавлением митоза и активности ядрышкообразующих районов хромосом в клетках внутренней клеточной массы, как это происходит у видов животных, имеющих обязательную стадию задержанной имплантации (облигатную эмбриональную диапаузу), а митоз клеток трофобласта запускается на периимплантационной стадии, как у животных без облигатной диапаузы. Полученные данные поддерживают нашу гипотезу о том, что обязательная стадия задержанной имплантации могла возникнуть у отдельных животных разной таксономической принадлежности вследствие хромосомной мутации, затрагивающей генетический контроль хронологии событий (тайминг) эмбриогенеза, и поэтому её характер должен быть разным у разных видов животных.

Ключевые слова: эмбриогенез, задержка имплантации, облигатная эмбриональная диапауза, активность ядрышкообразующих районов хромосом, митоз, амитоз, хорь.

Наши цитогенетические исследования явления облигатной эмбриональной диапаузы (задержанной имплантации) у млекопитающих показали, что у разных видов животных семейства Mustelidae (у норки *Mustela vison*, соболя *Martes zibellina* и западного пятнистого скунса *Spilogale putorius latifrons*) активность эмбрионального генома в диапаузных бластоцистах проявляется одинаково: в клетках внутренней клеточной массы (ВКМ) угнетены митоз и синтез нуклеиновых кислот, но в клетках трофобласта идёт синтез ДНК и рРНК и прямое (амитотическое) деление эндополиплоидных интерфазных ядер (Исакова, Жоголева, 1997; Исакова, Шилова, 2000, 2003; Исакова и др., 2001; Исакова, 2004; Isakova, Mead, 2004). Как оказалось, в бластоцистах мыши *Mus musculus*, не подвергающихся облигатной диапаузе, амитотическое деление клеток трофобласта тоже происходит, но начиная с периимплантационной стадии (Исакова, Скворцова, 2003). Эти данные мы интерпретировали как указывающие на то, что возникновение облигатной диапаузы связано не только с задержкой имплантации, но и с изменением в хронологии событий (тайминге) всех этапов эмбриогенеза. Мы полагаем также, что это изменение может быть вызвано перестройкой кариотипа отдельных животных из разных таксономических групп, затрагивающей генетический

контроль тайминга эмбриогенеза, и поэтому характер диапаузы должен быть разным у разных видов животных из-за различий в организации их кариотипов и геномов (Исакова, 2006). Это значит, что все виды животных, даже таксономически близкие, должны отличаться по паттерну активности эмбрионального генома в течение доимплантационного периода. Задача настоящей работы – изучить активность генома в клетках ВКМ и трофобласта бластоцист в течение преимплантационного периода у ещё одного вида животных из семейства Mustelidae.

Объектом исследования был темный хорек *Mustela putorius*, разводившийся на экспериментальной звероферме Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Известно, что беременность у хорьков длится 41–43 дня. В течение ~6 дней после оплодотворения эмбрионы достигают стадии бластоцисты и переходят из яйцевода в полость матки, однако их имплантация в эпителий матки начинается между 12-м и 13-м днями (Enders, Schlafke, 1972; Mead et al., 1988; Mead, 1989). Поэтому возник вопрос: затормаживается ли развитие эмбрионов в период от 7-го до 12-го дней, т.е. является ли этот период эмбриональной диапаузой. По наблюдениям Даниэля (Daniel, 1970), за это время размер бластоцист увеличивается от 0.4 до 1.3 мм в диаметре, и в них поддерживается митотическая активность

Вес половых органов матери и цитогенетическая характеристика развития эмбрионов перед имплантацией у хорька

Показатели	Время после спаривания, дни		
	8-й	11-й	12-й
Вес половых органов матери, мг:			
– рога матки (пара)	1283	1464	1675
– яичники (пара)	57	92	92
Диаметр бластоцист, мм	0.4	1.8	2.2
Число клеток в бластоцисте	~800	~1800	~23000
Диаметр клеточных ядер, мкм	6–10	6–10	6–15
Активность ядрышкообразующих районов в клетках:			
– внутренней клеточной массы (ВКМ)	+	+	+
– трофобласта	+	+	+
Тип деления клеток трофобласта*:			
– митоз	+	+	+
– амитоз	–	++	+++

* В ВКМ встречались только фигуры митоза диплоидных ядер.

клеток. Кроме того, по мере роста и особенно к началу имплантации в бластоцистах увеличивается синтез белка. Используя полученные данные и специальную формулу, определяющую связь между скоростью увеличения числа клеток и продолжительностью митотического цикла в популяции *диплоидных* клеток, автор сделал вывод о том, что у хорька нет эмбриональной диапаузы, а продленный преимплантационный период мог возникнуть из-за увеличения продолжительности митотического цикла клеток бластоцист. Полученные нами данные о том, что в диапаузных бластоцистах животных разной таксономической принадлежности клетки трофобласта делятся в основном путем амитоза, дают основание полагать, что у хорька они тоже могут делиться посредством митоза, и амитоза. Даниель мог не заметить фигуры прямого деления, так как для цитологического анализа он использовал гистологические срезы бластоцист, не позволяющие точно судить о событиях, происходящих в данной клеточной популяции. Вполне возможно также, что имевшиеся к тому времени сообщения о ведущей роли амитоза в росте плаценты у человека (Amogoso, 1952) не были восприняты как указывающие на то, что амитоз также может вносить вклад в развитие плаценты и у других видов млекопитающих.

В нашем исследовании использованы следующие эмбрионы хорьков: 8-го (группа I), 11-го (группа II) и 12-го (группа III) дней беременности. Эмбрионы находились на стадии бластоцисты, размер их в среднем составлял 0.4, 1.8 и 2.2 мм в диаметре в трех группах соответственно. Бластоцисты группы II были на стадии экспансии, а группы III – в начале имплантации, на что указывало появление ворсинок хориона. Всего было исследовано 12 успешно развивавшихся зародышей, по 4 из каждой

возрастной группы. Цитологические препараты бластоцист были приготовлены по методу, разработанному специально для кунных (Исакова, Жоголева, 1997; Isakova, Mead, 2004), обработаны нитратом серебра и красителем Гимза для выявления транскрипционной активности ядрышкообразующих районов хромосом (ЯОР), т.е. синтеза рРНК, и анализа морфологии клеточных ядер (Howell, Black, 1980; Hubbell, 1985). В каждом эмбрионе определяли приблизительное число клеточных ядер, их размер, тип деления и наличие в ядрах гранул осажденного серебра. Данные по эмбрионам-сибсам были объединены в одну группу.

Полученные результаты представлены в таблице. За период от 8-го до 12-го дней беременности увеличивался вес матки и яичников, что указывало на активность репродуктивной системы матери. В эмбрионах за это время увеличилось число клеток приблизительно от 800 до 23000. Диаметр клеточных ядер варьировал от 6 до 10 мкм в группах I и II и от 6 до 15 мкм – в группе III. ЯОР были активны в клетках и ВКМ, и трофобласта бластоцист во всех трёх группах, что указывает на происходящий в них синтез рРНК в течение всего этого периода. Что касается деления клеток, то в ВКМ наблюдались фигуры митоза диплоидных клеток во всех трёх группах эмбрионов. В трофобласте бластоцист группы I встречались фигуры митоза диплоидных ядер с частотой около 4.5%, а в группах II и III – митоза, и амитоза с преобладанием последнего. Крупные интерфазные ядра делились посредством амитоза. Наиболее часто деление выглядело как перетяжка ядра на две части. В группе III встречались также выделения дочерних ядер сквозь мембрану материнского ядра – так называемая экструзия. Фигуры амитоза и морфология крупных интерфазных ядер

имели полное сходство с теми, которые мы наблюдали ранее у норки, скунса, соболя и мыши (Исакова, Жоголева, 1997; Исакова, Скворцова, 2003; Isakova, Mead, 2004). Многие ядра имели морфологические признаки политении, т.е. умножения числа нитей ДНК в каждой из хромосом, и, следовательно, синтеза ДНК. Число окрашенных серебром ЯОР в крупных ядрах не превышало их числа в самых малых ядрах, что также свидетельствует о политенной организации увеличенных ядер. Многие фрагменты, образующиеся в процессе прямого разделения крупных ядер, имели морфологию нормальных клеточных ядер и высокую аргентофильность ЯОР, что предполагает возможность их развития в клетки трофобласта с повышенной метаболической активностью.

Таким образом, наше исследование показало, что в бластоцистах хоря в течение ~6 дней, предшествующих имплантации, в клетках ВКМ идет синтез рРНК и митоз диплоидных клеток, а в клетках трофобласта – синтез рРНК и ДНК, а также митоз и amitoz. Эти данные подтверждают заключение Даниэля (Daniel, 1970) о том, что у хоря нет эмбриональной диапаузы. Однако удлинение преимплантационного периода может быть связано не с увеличением продолжительности митотического цикла диплоидных клеток, а с запуском, кроме митоза, amitotического деления клеток трофобласта. Очевидно, что как продолжительность клеточного цикла, так и механизм образования новых клеток должны различаться при митозе и amitозе. Наше исследование показало также, что паттерн активности эмбрионального генома в течение доимплантационного периода эмбриогенеза у хоря отличается от такового у видов животных как с облигатной диапаузой, так и без нее. Удлинение доимплантационного периода не сопровождается угнетением митоза и активности генома в клетках ВКМ, как это происходит у видов животных с облигатной диапаузой (норка, пятнистый скунс, соболь), а amitoz клеток трофобласта начинает действовать со стадии экспансии (как у мыши, не имеющей облигатной диапаузы). Полученные данные свидетельствуют в поддержку нашей гипотезы: характер стадии задержанной имплантации должен быть разным у разных видов животных.

Автор благодарен О. В. Трапезову за помощь в работе с животными и Р. А. Миду (R. A. Mead) – за ценные комментарии к содержанию рукописи статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Исакова Г.К. Об активности эмбрионального генома соболя на стадии задержанной имплантации // Докл. РАН. 2004. Т. 397. № 1. С. 128–130.
- Исакова Г.К., Жоголева Н.Н. Биологический смысл явления задержанной имплантации у млекопитающих с точки зрения цитогенетика // Там же. 2006. Т. 409. № 6. С. 847–849.
- Исакова Г.К., Жоголева Н.Н. Активность эмбрионального генома норки во время диапаузы (цитогенетический анализ). Число клеток и размер клеточных ядер в бластоцистах разного размера и возраста // Генетика. 1997. Т. 33. № 6. С. 822–830.
- Исакова Г.К., Скворцова Т.Э. Механизмы и частота деления ядер клеток трофобласта и децидуа в течение постимплантационного эмбриогенеза у мыши // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 6. С. 472–477.
- Исакова Г.К., Шилова И.Э. Размножение “почкованием” клеток трофобласта в имплантирующихся бластоцистах норки // Докл. РАН. 2000. Т. 371. № 1. С. 129–131.
- Исакова Г.К., Шилова И.Э. Соотношение частот двух форм amitotического деления ядер клеток трофобласта в бластоцистах норки в течение периода задержанной имплантации // Изв. АН. Сер. биол. 2003. № 4. С. 395–398.
- Исакова Г.К., Захаренко Л.П., Абрамова М.П. Активность эмбрионального генома норки во время диапаузы (цитогенетический анализ). Ядрышковый и внеядрышковый синтез РНК // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 4. С. 302–308.
- Amoroso E.C. Placentation // Marshall's physiology of reproduction. Ch. 15. L. et al.: Longmans, Green and Co., 1952. P. 127–311.
- Daniel J.C., Jr. Coincidence of embryonic growth and uterine protein in the ferret // J. Embryol. Exp. Morph. 1970. V. 24. P. 305–312.
- Enders A.C., Schlafke S. Implantation in the ferret: epithelium penetration // Am. J. Anat. 1972. V. 133. P. 291–316.
- Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // Experientia. 1980. V. 36. P. 1014.
- Hubbell H.R. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes // Stain Technol. 1985. V. 60. P. 285–294.
- Isakova G.K., Mead R.A. Occurrence of amitotic division of trophoblast cell nuclei in blastocysts of the western spotted skunk (*Spilogale putorius latifrons*) // Hereditas. 2004. V. 104. P. 177–184.
- Mead R.A. Reproduction in Mustelids // Conservation biology and the black-footed ferret /Eds. Seal U.S. et al. New Haven: Yale Univ. Press, 1989. P. 124–137.
- Mead R.A., Bremmer S., Murphy B.D. Changes in endometrial vascular permeability during the periimplantation period in the ferret (*Mustela putorius*) // J. Reprod. Fert. 1988. V. 82. P. 293–298.

Cytogenetic Study on the Activity of the Ferret Embryonic Genome before Implantation

G. K. Isakova

*Institute of Cytology and Genetics of the Russian Academy of Sciences, Siberian Branch,
pr. Lavrentyev 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

e-mail: isakova@math.nsc.ru

Abstract—A cytogenetic study of the activity of the embryonic genome in ferret (*Mustela putorius*) blastocysts during 6 days after their transition from the oviduct to the uterus has been carried out. It has been found that the prolongation in the preimplantation period in the ferret is not accompanied by inhibition of mitosis or activity in nucleolus organizing regions of inner cell mass cells as occurs in species having an obligatory delay of implantation (obligate embryonic diapause). Amitosis of trophoblast cells starts at the periimplantation stage as in other species that do not have obligate diapause. The data obtained are consistent with the hypothesis that the obligatory stage of delayed implantation might occur in some mammals in different taxonomic groups as a result of chromosome mutations affecting the genetic control of the chronology of events (timing) of embryogenesis. Consequently the characteristics of delayed implantation should be different in different species.

Key words: embryogenesis, delayed implantation, obligate embryonic diapause, activity of the nucleolus organizing regions, mitosis, amitosis, ferret.