Б. В. ЛЕОНОВ, А. П. КАМАХИН, Ю. Б. БАЕВСКИЙ

СПОНТАННОЕ СЛИЯНИЕ БЛАСТОМЕРОВ ДРОБЯЩИХСЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК МЫШИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ IN VITRO

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 19 IV 1972)

Известно, что при заражении культуры соматических клеток вирусом Sendai, инактивированным с помощью ультрафиолетового излучения, в результате слияния возникают клетки с общей цитоплазмой и даже объединенным ядром. Такие клетки — гетерокарионы в дальнейшем не делятся, однако некоторое время в них продолжается синтез ДНК и белка (1).

Сравнительно недавно установлен факт слияния под влиянием инактивированного вируса Sendai не только соматических, но и репродуктивных клеток. Например, из двух неоплодотворенных яйцеклеток был получен гиногенетический зародыш (2). Грэхем рассматривает процесс слияния в этом случае как начало партеногенетического развития. Таким же путем оказалось возможным получить зародыш из двух первых бластомеров, слияние которых, естественно, не меняло генетической природы исходной зиготы (3). В процессе образования химер (4-8), в котором вирусы, по-видимому, не имеют какого-либо значения, слияния клеток не происходит (Тарковский, персональное сообщение).

Можно полагать, что различные факторы, приводящие к слиянию клеток, по всей видимости, в различной степени ограничивают потенции зародыша к развитию. С этой точки зрения представляет интерес наблюдавшееся нами спонтанное слияние бластомеров, не получившее еще освещения в литературе. При изучении процесса дробления оплодотворенных яйцеклеток, культивируемых in vitro со стадии двух бластомеров до стадии бластоцисты с использованием замедленной микрокиносъемки, нам удалось обнаружить спонтанное слияние двух бластомеров в одну клетку на стадиях трех и четырех бластомеров. Материалом послужили ранние зародыши мыши, культивируемые in vitro по методу Бринстера (9) в некоторой модификации, описанной нами ранее (10-12). Яйцеклетки получали индуцированием суперовуляции у половозрелых животных внутрибрюшинным введением сыворотки жеребых кобыл (с.ж.к.) и хорионического гонадотропина по Эдварду и Гейтсу (13). Стадию образования двух бластомеров определяли исходя из времени наступления овуляции (11-14 час. после инъекции хориогонина) и времени, протекающего от момента оплодотворения до образования двух бластомеров и принимаемого за 23-24 часа (14-16). Вымывание яйцеклеток производили через 37-40 час. после спаривания. Съемка велась с частотой 1 кадр в 2 мин. на киноустановке МКУ-1. Подробные сведения по динамике дробления яйцеклеток мыши, культивируемых in vitro до стадии 8 бластомеров, приведены в нашей работе (13). Слияние двух бластомеров в один на трех- и четырехклеточной стадии наблюдалось нами в нескольких яйцеклетках, которые находились в одной и той же капле питательной среды с яйцеклетками, не обнаруживавшими «перебоев» в ритме дробления. Слившиеся на отмеченных стадиях бластомеры через определенные промежутки времени начинали дробиться вновь. Зародыши, в которых происходило слияние, развивались в дальнейшем нормально, достигая in vitro стадии бластоцисты, в сроки, свойственные зародышам, не испытывающим слияния. На рис. 1

и 2 приведена динамика процесса слияния blastomeres соответственно в трех- и четырехклеточной стадии. Моменты возникновения стадий двух (рис. 1) и четырех blastomeres (рис. 2) приняты за исходные, от которых в дальнейшем ведется отсчет времени и наблюдения за дроблением. Цифры слева от зародышей (рис. 1), а также в светлых квадратах (рис. 2) обозначают промежуток времени (час., мин.) между приведенными стадиями развития (рис. 1 и 2 см. вкл. к стр. 1249).

На рис. 1 в первом и втором вертикальных рядах показаны последовательные кадры уменьшения третьего blastomera и его слияние со вторым blastomером (возникновение blastomera II—III). В результате яйцеклетка оказывается на двухклеточной стадии. Процесс слияния в этом случае завершался в течение 1 часа 26 мин. Через 10 час. 10 мин. после его завершения blastomera II—III, образовавшийся из материала второго и третьего blastomeres, вновь начинает дробиться, в результате возникает опять трехклеточная стадия. Через 16 час. 00 мин. от нулевого времени и через 40 мин. после вторичного возникновения трехклеточной стадии первый недробившийся blastomera делится на два и зародыш оказывается на четырехклеточной стадии. Причем она возникает с запаздыванием на 9 час. 54 мин. по сравнению с контролем. Для сравнения на рис. 1 в третьем вертикальном ряду показано развитие зародышей в контроле. Следует отметить, что рассматриваемое слияние blastomeres не препятствовало развитию зародышей до стадии морулы и blastoцисты в обычные сроки.

На рис. 2 приведена серия кадров, иллюстрирующих слияние blastomeres, наступающее на стадии четырех клеток. На каждом из представленных 18 кадров в верхнем правом углу виден зародыш, в развитии которого происходило слияние blastomeres, а в нижнем левом — зародыш, свободный от рассматриваемого феномена. В результате слияния первого и четвертого blastomeres, продолжающегося в течение 1 часа 52 мин., а также слияния второго и третьего blastomeres, завершающегося за 1 час 28 мин., вновь возникает стадия двух клеток. Спустя 8 час. 14 мин. после образования blastomera I—IV, в нем происходит дробление, которое заканчивается через 18 мин. после начала. Сходный процесс наблюдается в blastomere II—III через 8 час. 46 мин., который завершается в течение 4 мин. Дальнейшее развитие зародыша протекало как обычно и завершалось образованием blastoцисты, морфологически не отличающейся от нормальной.

Так как слияние blastomeres нами наблюдалось в 4 зародышах из 18, то в настоящее время говорить о достоверности именно такой частоты возникновения этого феномена преждевременно.

Количество клеток в зародышах, претерпевавших спонтанное слияние и развивавшихся без этого феномена, было одинаковым до стадии 8 blastomeres. Дальнейший достоверный подсчет количества клеток в наших условиях исследований не представлялся возможным.

Проведенные нами наблюдения слияния клеток позволяют отметить две особенности. Первая особенность состоит в том, что рассматриваемое слияние blastomeres имеет спонтанный характер. Вторая — в том, что оно является обратимым и не препятствует образованию blastoцист, морфологически не отличающихся от нормальных и формирующихся в обычные сроки. В пользу спонтанности говорит тот факт, что яйцеклетки, обнаруживавшие слияние blastomeres, развивались в контактной близости с яйцеклетками, в развитии которых слияния не наблюдалось. Это исключает вероятность воздействия вирусов как причины наблюдаемого явления. Исключает вирусный источник происхождения феномена и принятая степень стерильности условий инкубирования при проведении этих экспериментов. Об обратимости явления наряду с морфологическими признаками blastoцист, не отличающихся от нормы, свидетельствуют обычные сроки проявления физиологической активности зародышей, ведущей к высвобождению их из прозрачной оболочки. По-видимому, blastoцисты, полу-

ченные *in vitro* в опытах Грэхема из слившихся под влиянием вируса Sendai клеток, отличаются в этом отношении. Во всяком случае к отмеченной стадии они характеризуются весьма низким числом составляющих их клеток: 34, 30, 28, 10, 8, 4 (³). Возможно, что с этой особенностью связан и тот факт, что все трансплантированные в матку мышей зародыши (всего 36) подверглись той или иной степени резорбции. При слиянии blastомеров под влиянием вируса Sendai Грэхем наблюдал на стадии blastоцисты возникновение полиплоидных клеток (от 4 до 16*n*). Вопрос о полиплоидизации в случае спонтанного слияния blastомеров остается открытым. Цитология явления спонтанного слияния исследуется.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт акушерства и гинекологии
Министерства здравоохранения СССР

Поступило
19 IV 1972

Институт эволюционной морфологии и
экологии животных им. А. Н. Северцова
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Harris, G. F. Watkins, *Nature*, 205, 640 (1965). ² C. F. Graham, In: *Advances in the Biosciences*, 6, 1971, p. 87. ³ C. F. Graham, In: *Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, III Symposium. In Vitro Methods in Reproductive Cell Biology*, 1971, p. 154. ⁴ A. Tarkowsky, *Acta Theor. Biol.* 3, 191 (1959). ⁵ F. Seidel, *Wilhelm Roux' Arch.*, 152, 43 (1960). ⁶ B. Mintz, *Ciba Found. Symposium on Preimplantation Studies of Pregnancy*, 1965, p. 123. ⁷ T. Mulnard, *Idem.*, 1965, p. 123. ⁸ T. Mulnard, *Advances in the Biosciences*, 6, 255 (1971). ⁹ R. F. Brinster, *Exp. Cell Res.*, 32, 2051 (1963). ¹⁰ Б. В. Леонов, А. П. Камахин и др., *Авт. свид. № 233170*, 1968. ¹¹ Б. В. Леонов, А. П. Камахин и др., *Авт. свид. № 258282*, 1969. ¹² Б. В. Леонов, А. П. Камахин, *Авт. свид. № 277398*, 1970. ¹³ Б. В. Леонов, А. П. Камахин, Л. М. Дмитриева, *Онтогенез*, 3, № 2, 202 (1972). ¹⁴ R. Edwards, A. Gates, *J. Endocrinol.*, 18, 292 (1959). ¹⁵ W. H. Lewis, E. S. Wright, *Carnegie Inst. Wash., Contrib. Embriol.*, 25, № 418, 113 (1933). ¹⁶ C. R. Austin, In: *Mechanism Concerned with Conception*, Oxford—London—N. Y., 1963, p. 285. ¹⁷ P. B. Barlou, C. F. Graham, *цит. по* (³), 1971. ¹⁸ Е. В. Зыбина, В сборн. *Морфология и цитология клетки* Изв. АН СССР, 1963, стр. 34.