

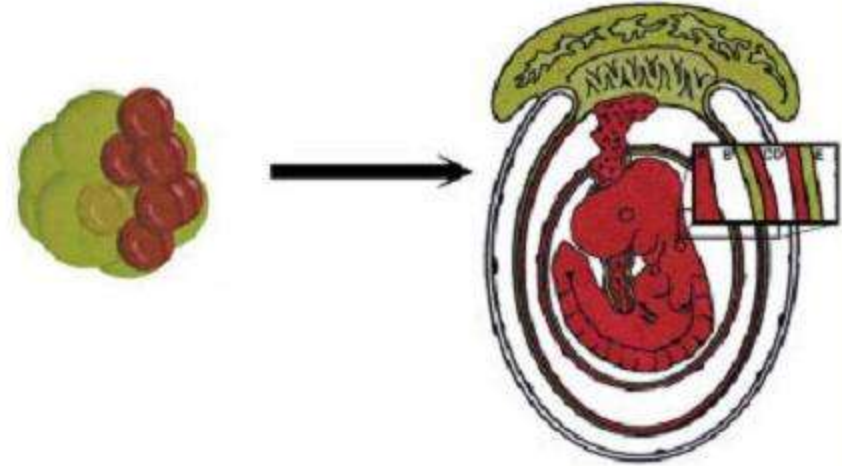
Развитие химерных эмбрионов, полученных агрегацией партнеров разной ploидности

Дипломная работа
студентки 5 курса ФЕН НГУ
Поварницыной П.Ю.

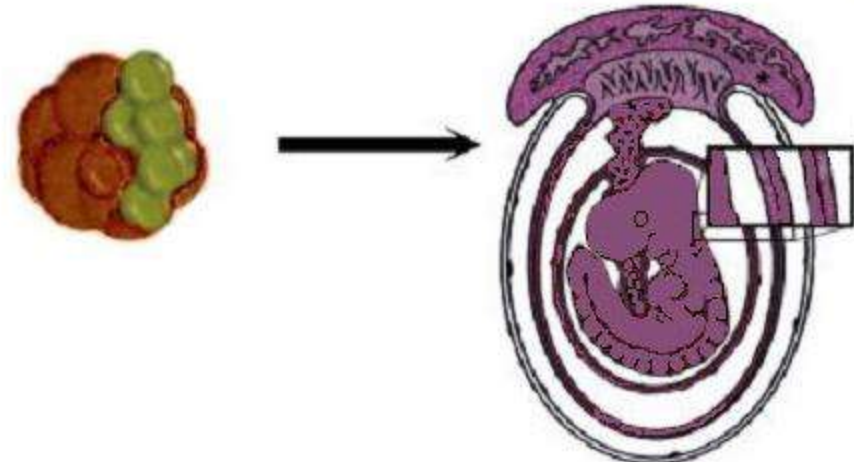
Научный руководитель:
к.б.н., с.н.с. лаб. Генетики Развития ИЦиГ СО РАН
Кизилова Е.А.


Два типа $2n \leftrightarrow 4n$ агрегационных химер


Агрегация **тетраплоидного** эмбриона с **диплоидными** ES-клетками или клетками ВКМ




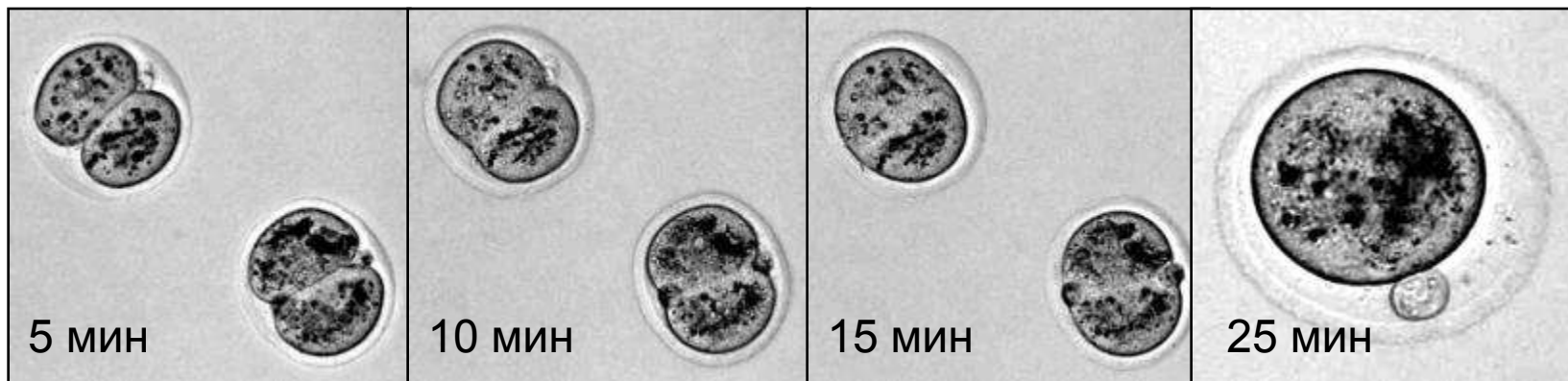
Агрегация **диплоидного** эмбриона с **тетраплоидными** гибридными ES-клетками (были получены в лаборатории Генетики развития ИЦиГ СО РАН)



 - клетки-потомки тетраплоидного партнера

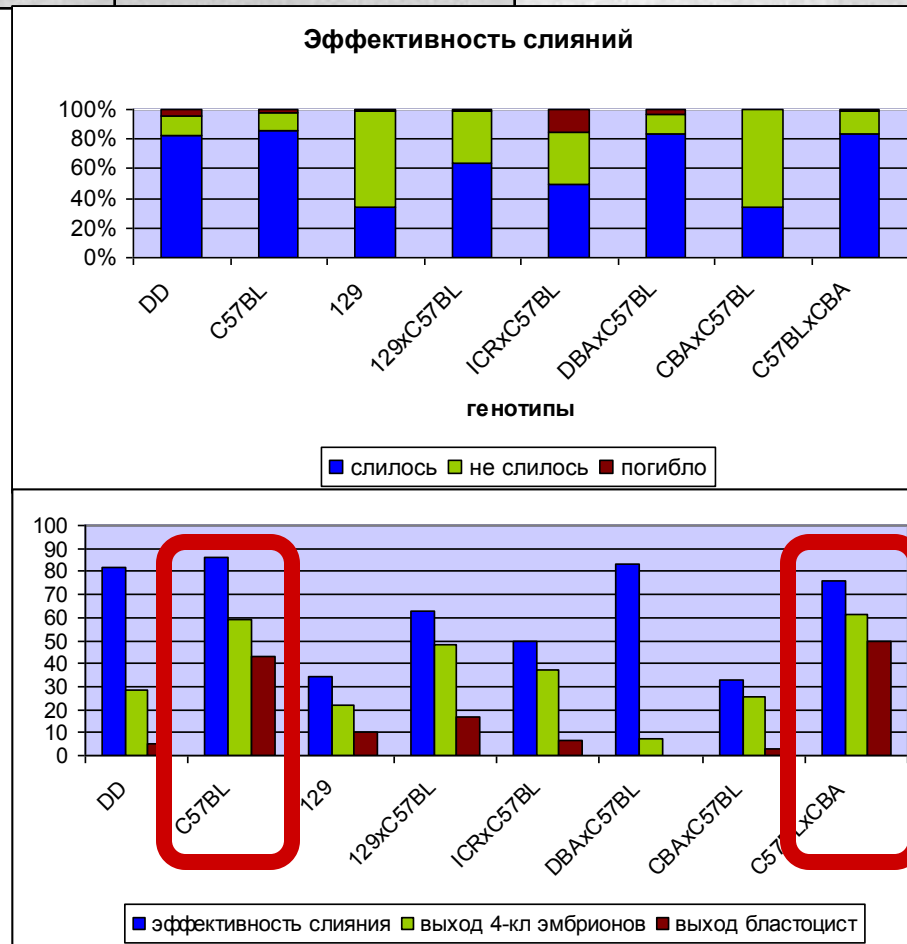
 - клетки-потомки диплоидного партнера

 - смесь клеток обоих партнеров



- **Протокол слияния: режим «электролит»;**
- **Параметры слияния:**
 - **Длительность импульса: 40, 45, 50, 55 μ s;**
 - **Амплитуда: 80, 90, 100, 110 mV;**
 - **Количество импульсов: 2-3;**
 - **Среда слияния – KSOM.**

Рис.1 Электрослияние эмбрионов разных линий. **А – D:** Двуклеточные эмбрионы мышей линии C57BL через 5,10,15,25 мин после импульса (*прижизненная съемка, световая микроскопия*).



Особенности развития 4n эмбрионов

- Отставание в развитии от диплоидных эмбрионов (для эмбрионов генотипов DD, 129, ICRxC57BL, DBAxC57BL, CBAxC57BL);
- Редуцированное число клеток в морулах и бластоцистах;
- Образование трофобластических пузырьков (бластоцист, не содержащих ВКМ);
- Способность к имплантации с высокой частотой (до 84%).

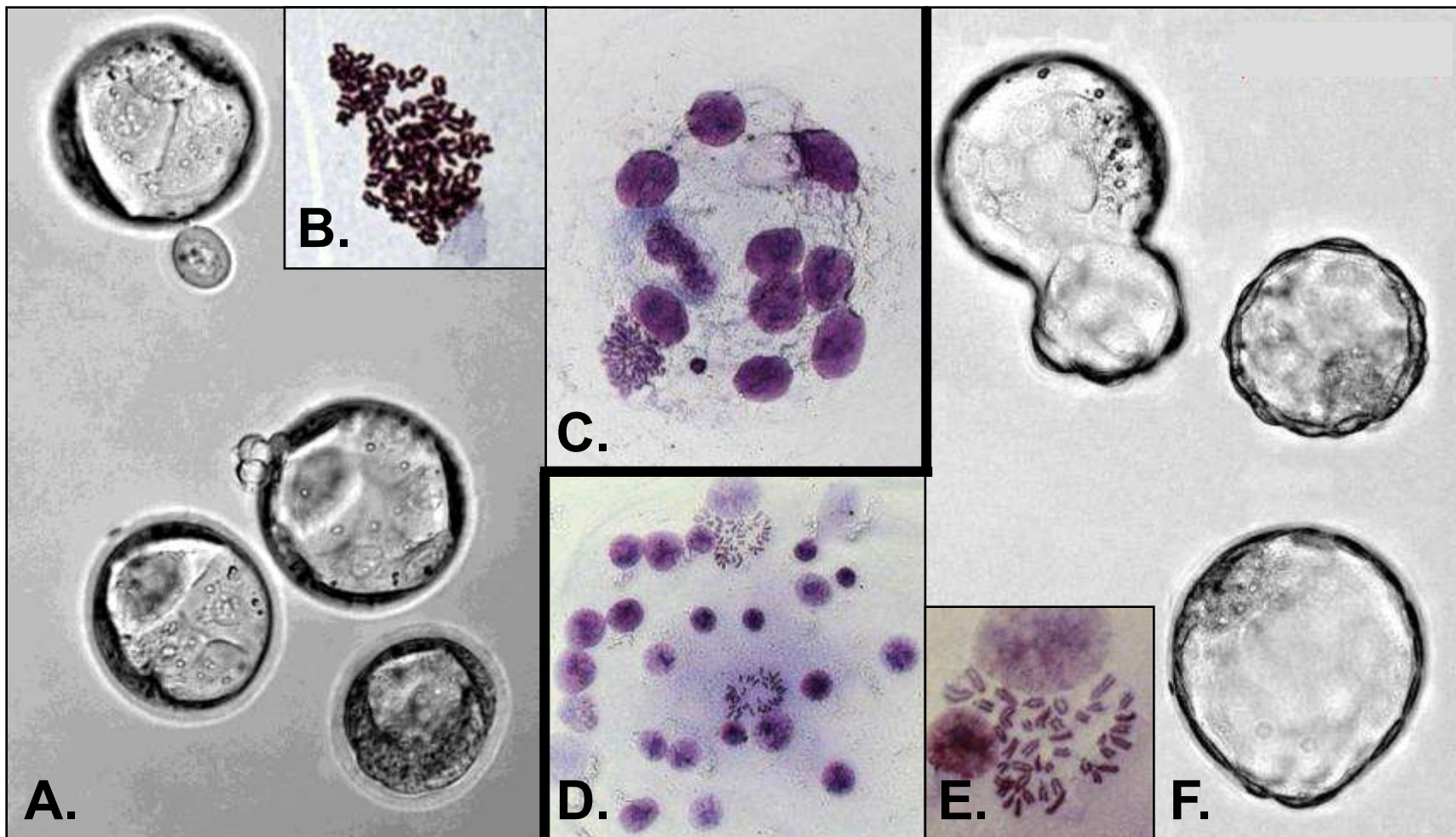


Рис.2 Особенности развития тетраплоидных эмбрионов. **А.** Тетраплоидные бластоцисты на третьи сутки культивирования. **В.** Метафазная пластина тетраплоидного эмбриона. **С.** Ядра тетраплоидной бластоцисты. **Д.** Ядра диплоидной бластоцисты. **Е.** Метафазная пластина диплоидного эмбриона. **Ф.** Диплоидные бластоцисты на третьи сутки культивирования. **А, Ф** - прижизненная съемка, световая микроскопия; **В - Е** - суховоздушные препараты, окраска Гимза.

Получение химерных эмбрионов

Эмбриональный партнер ES-клетки и их гибриды	2n	4n
2n	Химеры 2n↔2n с линией ES-клеток Tau-GFP (контроль)	Химеры 4n↔2n (ТЕС-тест) с ES-клетками линии Tau-GFP
4n	Химеры 2n↔4n с клонами D3T-14 и D3T-7	Химеры 4n↔4n (ТЕС-тест) с клонами D3T-14 и D3T-7

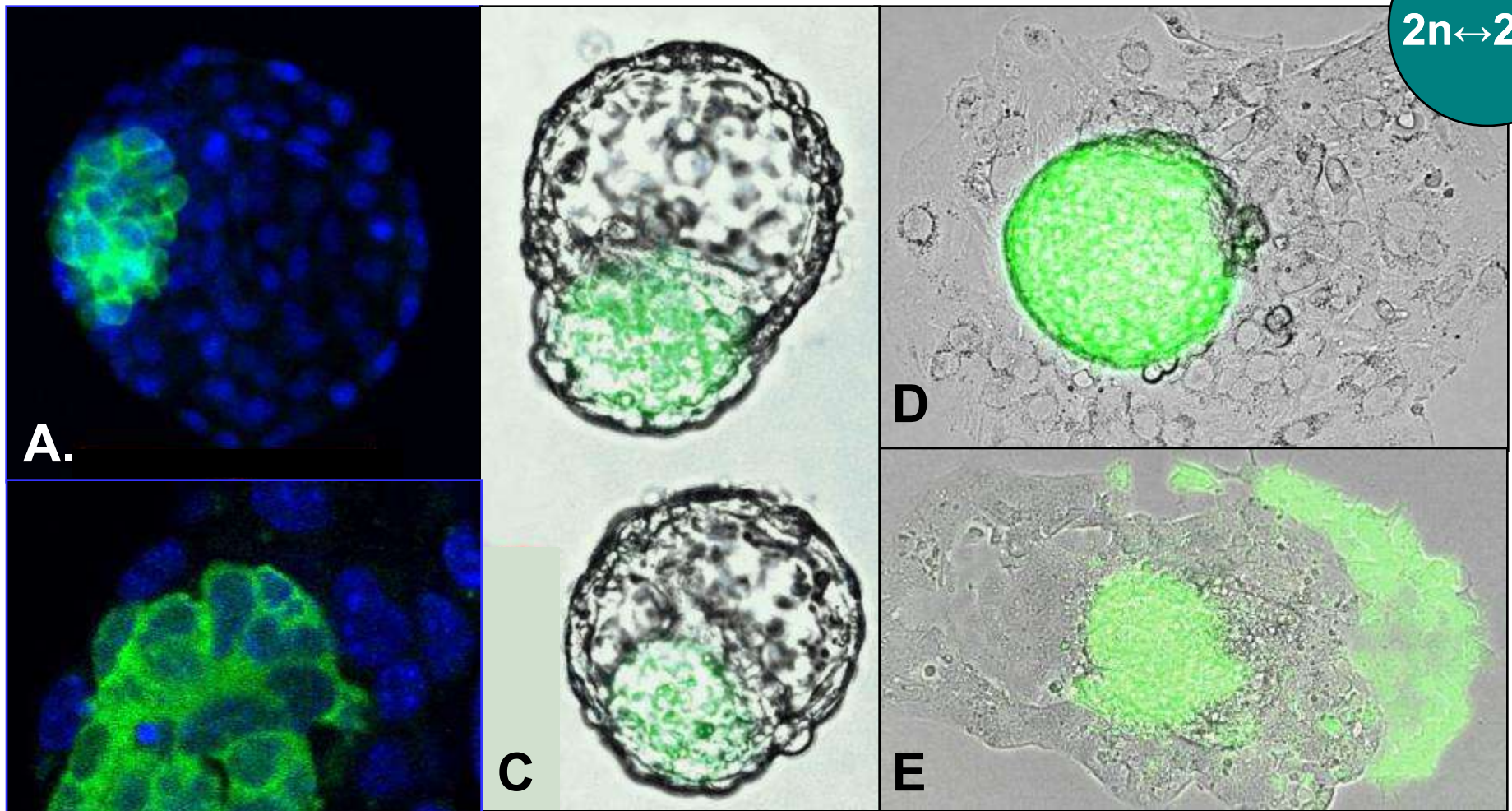


Рис.3 *In vitro* развитие $2n \leftrightarrow 2n$ -химерных эмбрионов. **А.** Химерная $2n \leftrightarrow 2n$ -бластоциста. **В.** ВКМ бластоцисты **А.**, большое увеличение. **С.** Химерные $2n \leftrightarrow 2n$ -бластоцисты. **Д,Е.** Прикрепившиеся химерные $2n \leftrightarrow 2n$ -эмбрионы. **А,В** - Конфокальная микроскопия, окраска DAPI; **Д,Е** - прижизненная съемка, флуоресцентная микроскопия.

2n↔2n

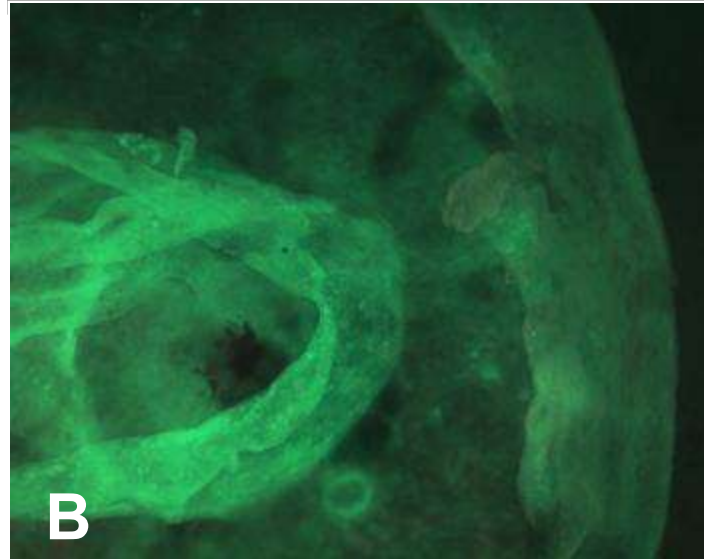
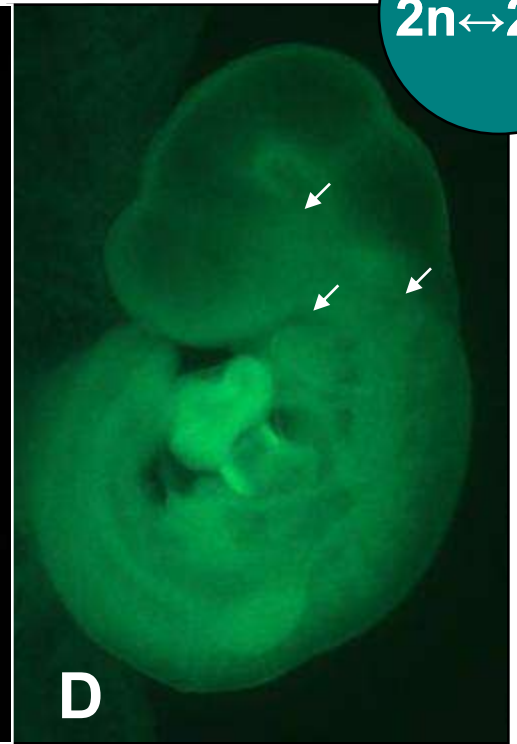
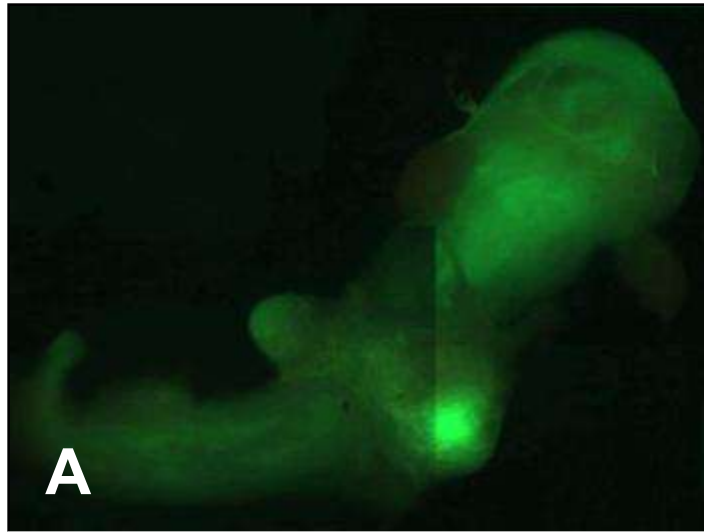


Рис.4 *In vivo* развитие 2n↔2n-химерных эмбрионов **A**. Аномальный эмбрион, стадия E14 (10,5 dpc). **B**. Зародышевые оболочки эмбриона **A**. **C**. Нормальный интактный эмбрион, стадия E14 (10,5 dpc), световая микроскопия. **D**. Аномальный эмбрион, стадия E14 (10,5 dpc). **A, B, D** -флюоресцентная микроскопия, прижизненная съемка.

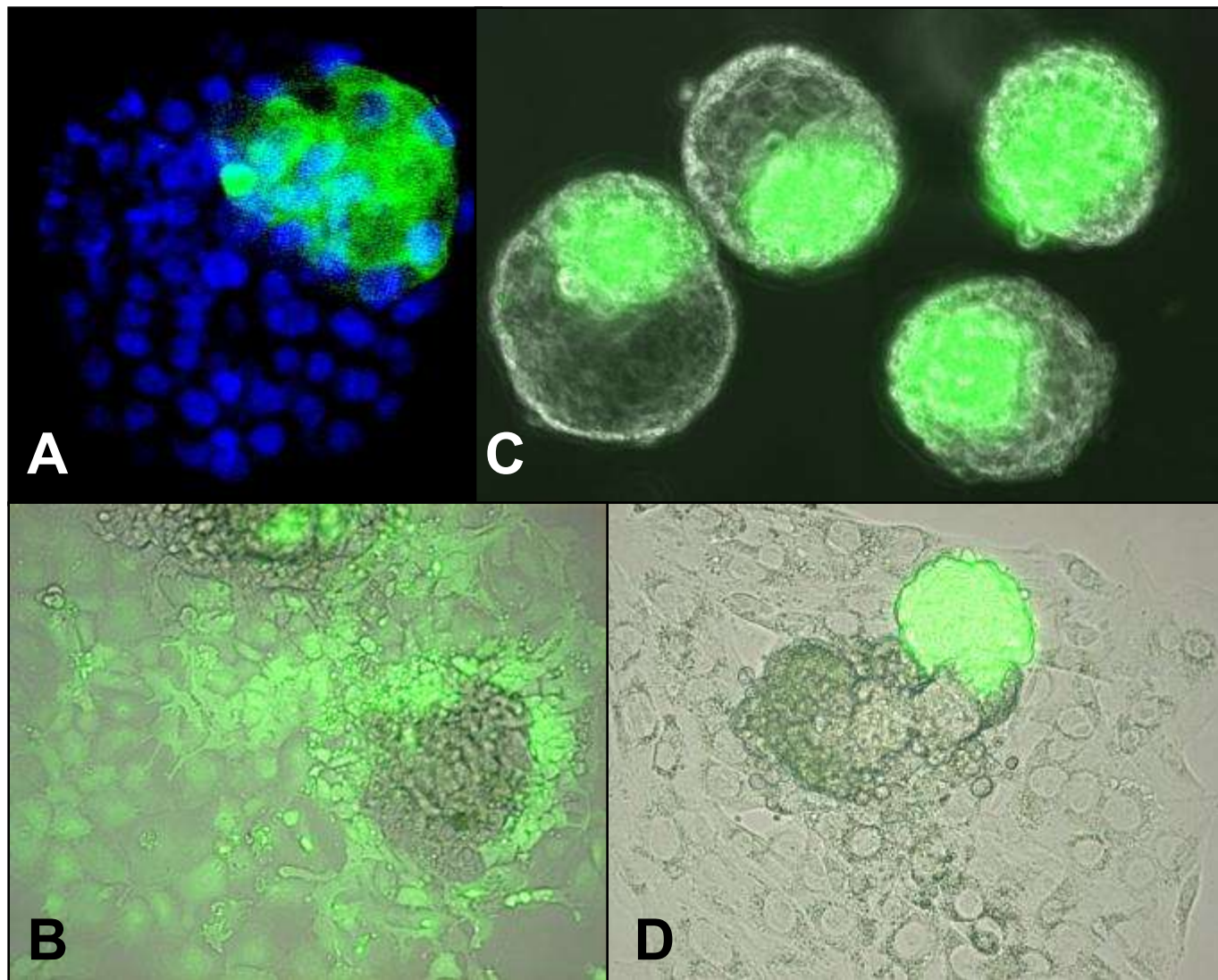


Рис.5 *In vitro* развитие $2n \leftrightarrow 4n$ -химерных эмбрионов. **А.** Химерная $2n \leftrightarrow 4n$ -бластоциста (конфокальная микроскопия, окраска DAPI). **В,Д.** Прикрепившиеся химерные $2n \leftrightarrow 4n$ -эмбрионы. **С.** Химерные $2n \leftrightarrow 4n$ -бластоцисты через сутки после агрегации. **В,С,Д** – флуоресцентная микроскопия, прижизненная съемка.

4n↔2n

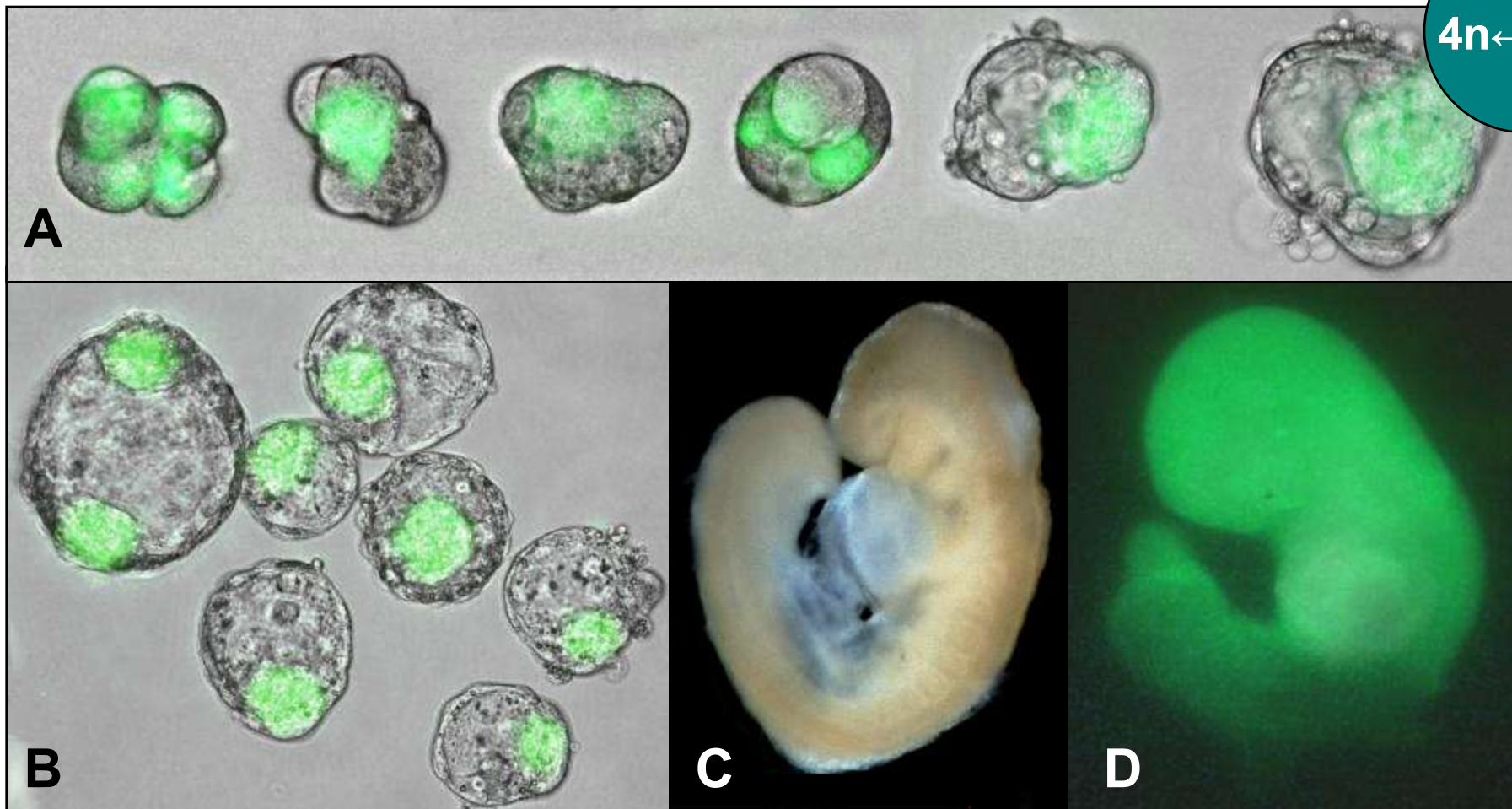


Рис.6 ТЕС-тест с диплоидным партнером ($4n \leftrightarrow 2n$). **А.** Процесс агрегации тетраплоидного 4-кл эмбриона с диплоидными ES-клетками. **В.** Химерные $4n \leftrightarrow 2n$ -бластоцисты через сутки после агрегации. **С.** Нормальный интактный эмбрион, стадия E12 (9,5 dpc) – световая микроскопия. **Д.** Аномальный эмбрион, стадия E12 (9,5 dpc). **А,В,Д** - прижизненная съемка, флуоресцентная микроскопия.

4n↔4n

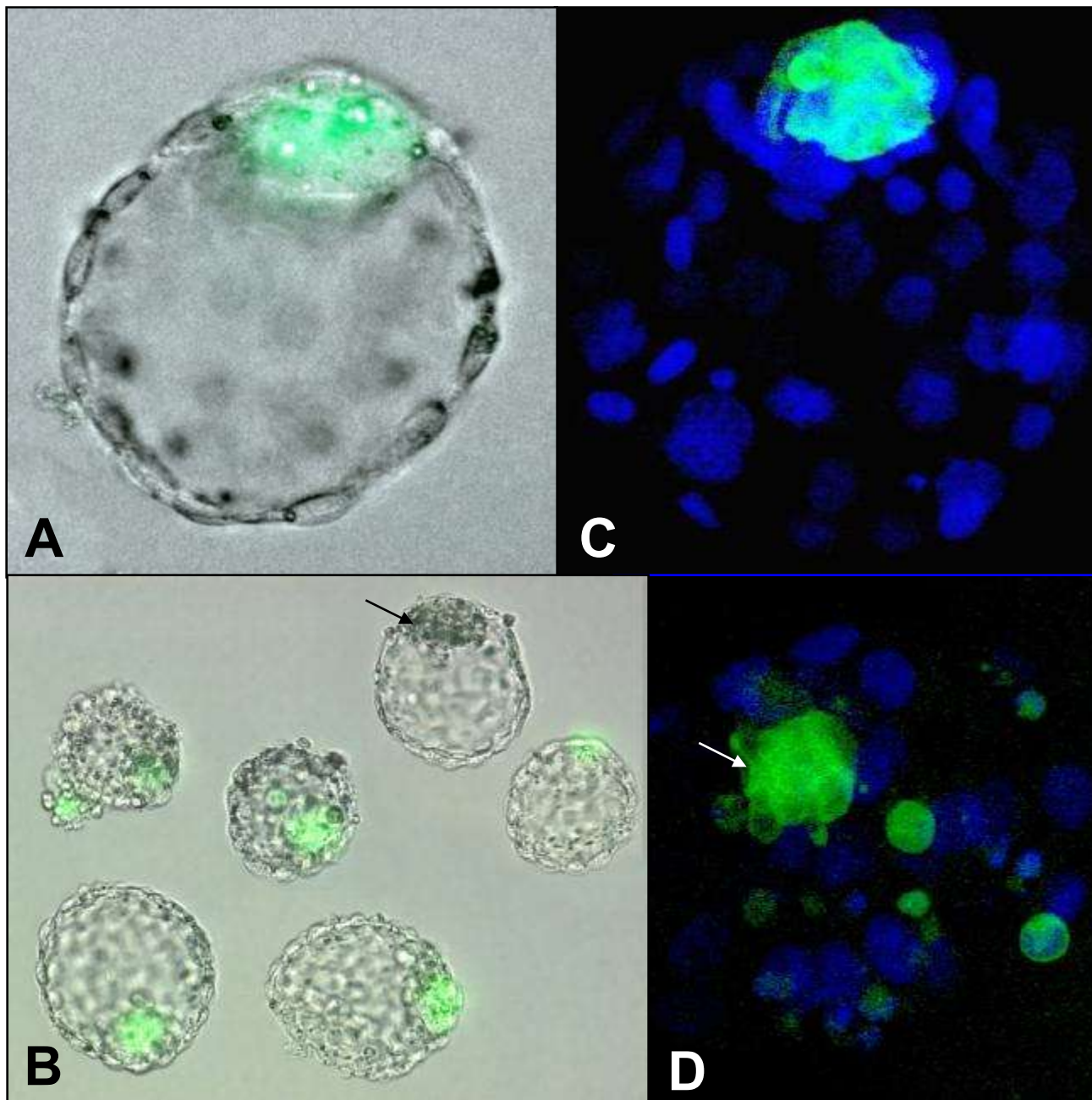


Рис.7 **А.** Химерная 4n↔4n-бластоциста, полученная агрегацией с клоном D3T-7.

В. Химерные 4n↔4n-бластоцисты, полученные агрегацией с клоном D3T-14.

С, D Химерные 4n↔4n-бластоцисты.

А, В - прижизненная съемка, флюоресцентная микроскопия.

С, D - конфокальная микроскопия, окраска DAPI.

Получение химерных эмбрионов

Эмбриональный партнер ES-клетки и их гибриды	$2n$	$4n$
$2n$	Химеры $2n/2n$: заселение ВКМ, <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> развитие	Химеры $4n/2n$: заселение ВКМ, <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> развитие 
$4n$	Химеры $2n/4n$: заселение ВКМ, <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> развитие 	Химеры $4n/4n$: заселение ВКМ, <i>in vitro</i> развитие

Выводы



- Эмбрионы генотипов C57BL и F1: ♀ C57BL x ♂ CBA являются оптимальными для получения тетраплоидного партнера, необходимого в ТЕС-тесте. Подобранные условия слияния и культивирования обеспечивают достаточно высокий (до 70%) выход нормальных тетраплоидных бластоцист.
- Компактизация и кавитация тетраплоидных эмбрионов наступает при уменьшенном числе клеток, которое зависит от генотипа эмбриона. Ранняя компактизация тетраплоидных эмбрионов может приводить к их развитию в трофобластические производные.
- Химерные эмбрионы с использованием ES-клеток (линия Tau-GFP, клоны D3T-7, D3T-14) могут быть получены как с диплоидным, так и с тетраплоидным эмбриональным партнером. Химеры в состоянии нормально развиваться *in vitro* до поздней бластоцисты, однако к 10-12 *dpc* их развитие *in vivo*, как правило, сопровождается различными аномалиями.
- ES-клетки независимо от ploидности преимущественно заселяют ВКМ химерных бластоцист во всех 4 группах ($2n \leftrightarrow 2n$, $2n \leftrightarrow 4n$, $4n \leftrightarrow 2n$, $4n \leftrightarrow 4n$), что может свидетельствовать о сохранении их свойства заселять ВКМ. Pлоидность ES-клеток не является фактором, определяющим пути их развития в предимплантационный период формирования химерного эмбриона.