

## Экспериментальные химеры — инструмент биологии развития

Л. М. Морозова, А. П. Соломко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*На примерах многочисленных исследований рассматривается возможность использования химер мышей, полученных в условиях опыта, как аналитического инструмента экспериментальной эмбриологии и генетики развития.*

---

Созданные искусственно химеры млекопитающих представляют собой модель, удобную для изучения различных проблем биологии развития и экспериментальной эмбриологии. Это — исследование клональности клеточных популяций в онтогенезе, времени и места действия мутантных генов и их экспрессии в различных клеточных системах, становление морфогенеза и роли клеточных систем в его контроле, познание механизмов межклеточных взаимодействий и процессов дифференцировки и малигнизации, выяснение особенностей взаимодействия различных генотипов на клеточном уровне и т. д.

Химеры широко используются для получения трансгенных животных, изучения влияния генотипической компоненты в становлении канцерогенеза, сохранения генотипов летальных зародышей, а также партено (Pg)- и андрогенетических (Ag) зародышей, которые не могут полноценно развиваться самостоятельно.

Первые химеры млекопитающих созданы у мышей в 1961 г. Тарковским [1], а затем в 1962 г. Минц — [2]. В настоящее время в зависимости от способа получения химеры подразделяют на агрегационные, инъекционные и ядерно-цитоплазматические. Каждый из этих методов создания химер имеет ряд недостатков и преимуществ, которые необходимо строго учитывать при исследованиях того или иного вопроса.

Метод агрегационных химер наиболее прост,

удобен и не требует дополнительного оборудования. Ограничением метода является стадия развития зародышей: в агрегацию вступают, в основном, зародыши и их бластомеры, обладающие адгезивностью, которая сохраняется у бластомеров, начиная с двухклеточной стадии развития до 16—32-клеточной стадии (очень ранние бластоцисты). Адгезивность двухклеточных зародышей намного ниже, чем четырехклеточных морул, а бластомеры 32-клеточной бластоцисты снова теряют способность к агрегации [3].

Наличие высокой адгезивности у восьмиклеточных морул дало возможность использовать их для агрегации с внутренней клеточной массой (ВКМ) зародыша, которая в отличие от трофобласта сохраняет свои адгезивные свойства. Этот метод окружения определенных клеток зародыша клетками 4—8-клеточного зародыша назван методом «сэндвича» [4]. Агрегируют в «сэндвиче» не только ВКМ, но и эмбриональные половые клетки, изолированные из зародыша на 8,5—12,5-й день эмбрионального развития [5], а также эмбриональные стволовые и карциномные клетки [6, 7].

Высокая адгезивность, обнаруженная у восьмиклеточных зародышей мышей, обеспечивается  $Ca^{2+}$ -зависимыми белками семейства увоморулинов, появляющихся в бластомерах в результате посттрансляционных модификаций ранее синтезированных молекул. Именно эти белки участвуют в определении гомотипичности клеток. Гомотипичные плазматические мембраны при соприкосновении клеток индуцируют встречный рост микроворсинок и микроворостов, в то время как гетероти-

пичные клетки при соприкосновении вытесняются из клеточной популяции [8, 9]. У восьмиклеточных зародышей мышей по способности к адгезии различают две популяции клеток: внутренние клетки, обладающие наибольшей и равномерной поверхностной адгезивностью, максимально контактирующие с другими эмбриональными клетками, и наружные, адгезивность которых на поверхности меньшая, чем внутри. Однако, несмотря на различную степень адгезивности, все клетки восьмиклеточных зародышей мышей обладают тотипотентностью, что доказано с помощью дезагрегации и повторной агрегации клеток таких зародышей с мечеными поверхностными бластомерами [10, 11]. Обычно принятое обозначение агрегационных химер  $A \leftrightarrow B$ , где  $A$  и  $B$  — зародыши (или их бластомеры) разных генотипов, одинаковых или различных стадий развития.

Основоположителем метода инъекционных химер является Гарднер (1968 г.) [12]. Суть метода заключается в инъекции одной или более клеток или даже ВКМ зародыша одного генотипа в бластоциста зародыша другого генотипа в период, начиная с момента ее появления (16—32 клетки) до поздней бластоцисты. Этот метод более трудоемкий, требует специального оборудования, однако сейчас и он становится рутинным. Ограничением этого метода является стадия реципиента — бластоцисты, хотя эта стадия длится у мышей почти сутки. Преимущество этого метода заключается в большем выходе животных-химер в постнатальном периоде и в большем участии потомков донорских клеток в построении различных тканей и органов. При этом не удалось установить связи между количеством инъекцированных клеток и выходом химер [13]. В ряде случаев инъекционный метод создания химер является единственно возможным, как, например, при работе с ранними эмбрионами кроликов, которые не могут развиваться без блестящей оболочки (*zona pellucida*) [14], а также при создании межвидовых химер, когда для нормального развития зародыша (во избежание отторжения плода) необходимо генотипическое сходство его трофобласта с самкой-реципиентом. В связи с этим часто используют микрохирургический метод создания химер, помещая ВКМ одного зародыша в трофобласт другого.

Мыши *Mus musculus* и *M. caroli* обычно не скрещиваются, но введение ВКМ последних в трофобласт *M. musculus*, предварительно лишенный собственной ВКМ, и пересадка таких зародышей самкам *M. musculus* приводят к рождению детенышей *M. caroli*. Зародыши из ВКМ *M. musculus* и трофобласта *M. caroli* погибали у самок *M. mus-*

*culus* на 16-й день после рождения. Агрегационные химеры этих двух видов у самок *M. musculus* развивались нормально. Исследование плацент таких химер обнаруживало участие клеток обоих видов мышей в их образовании, но гигантские клетки плаценты, контактирующие непосредственно с материнскими тканями, имели генотип *M. musculus*. Скорее всего, клетки *M. musculus* в химере имеют селективное преимущество, возможно, вследствие гомологичности клеточных поверхностей [15]. Агрегационным методом получены химеры между мышью и крысой [16], мышью и рыжей полевкой [17], но такие химерные зародыши погибали при пересадке их реципиентным самкам. Интересно, что часто при создании межвидовых химер клетки одного вида «вытесняются» и происходит рождение однокомпонентных животных [18, 19].

Суть третьего метода заключается в замене одного ядра двуклеточного зародыша ядром бластомера любой стадии развития зародыша и даже ядра соматической клетки, используя микрохирургию и электрослияние. Этот метод важен для выяснения роли внеядерной наследственности в развитии [20].

Создание агрегационных химер часто сопровождается увеличением их клеточной массы, но при слиянии даже девяти зародышей рождаются жизнеспособные детеныши-химеры [21]. Существует предположение о том, что такие зародыши каким-то образом «знают» о своем размере и сразу после имплантации приводят себя в соответствие с нормой. Регуляция, вероятно, начинается еще на стадии бластоцисты и полностью заканчивается на стадии яйцевого цилиндра [22]. Если у нормальных зародышей на шестой день эмбрионального развития отмечают буквально «взрыв» пролиферативной активности, то этого не наблюдают у гигантских химерных зародышей. Существуют две точки зрения на регуляцию размера ранних зародышей. Первая связывает их размер с количеством клеток и формированием проамниотической полости зародыша. Обычно появление проамниотической полости зависит от количества клеток, но не от количества клеточных циклов, прошедших после оплодотворения. Проамниотическая полость образуется в разное время, но при сходном количестве клеток как у контрольных « $n$ » клеточных зародышей, так и у экспериментальных  $1/2 n$  и  $2n$  [23]. В то же время показано, что дифференциация зародышей не зависит от размеров яйцевого цилиндра. При исследовании появления LDH-5 (лактатдегидрогеназа-5), продуцируемой зародышами в момент имплантации, отмечена зависимость продукции LDH-

5 от количества циклов репликации и отсутствие таковой от количества клеток [24].

У зародышей с числом клеток  $2n$ ,  $4n$  на стадии яйцевого цилиндра отмечают снижение пролиферативной активности и возрастание клеточной гибели. Возможно, что оба механизма имеют опосредованное влияние на приведение зародыша к нормальному числу клеток, а каким образом идет регуляция размера гигантских бластоцист, еще предстоит выяснить и, вероятно, исследование экспрессии клеточного протоонкогена *c-fos*, наблюдаемое в этот период, поможет решению вопроса [25].

Эффективность получения агрегационных химер может быть достаточно высокой и составлять ~80 % для синхронизированных по темпам развития и потому обладающих сходной адгезивностью зародышей при их развитии до бластоцисты [26, 27]. Однако постнатальный выход химер, как правило, невысок и составляет менее 30 % от количества пересаженных химерных бластоцист [28]. Процессы, происходящие при объединении гетерохронных зародышей или их бластомеров, изучены весьма слабо. Каждый этап доимплантационного эмбриогенеза сопровождается процессами, крайне важными для дальнейшего развития, однако практически неизвестно, что происходит на молекулярном уровне при объединении высокогетерохронных бластомеров [29].

Считается установленным, что независимо от «возраста» вероятность вхождения эндогенных бластомеров в ВКМ выше, поэтому, если есть необходимость попадания исследуемых бластомеров или эмбриональных клеток в ВКМ, часто применяют метод «сэндвича». Для этого их окружают бластомерами других зародышей [30, 31].

Объединение только одного бластомера восьмиклеточного зародыша с двуклеточным зародышем способствовало ускорению образования бластоцеля по сравнению с контролем [32, 33], а объединение одного бластомера четырехклеточного зародыша с Pg-зародышами разных стадий развития (2, 4 и 8-клеточными) в каждом отдельном случае обеспечивало дальнейшее нормальное развитие последних [34]. Гарбут [35], агрегируя восьмиклеточные зародыши из четырех пар 2/8 бластомеров, одна пара из которых была старше других на 4 ч, показал, что более продвинутые в развитии бластомеры, как правило, входили впоследствии в ВКМ зародыша.

Работы с доимплантационными зародышами млекопитающих в основном ограничены небольшим количеством клеток в них. Поэтому в настоящее время часто пользуются либо эмбриональными стволовыми клетками (embryonal stem cells, ESC),

либо эмбриональными карциномными клетками (embryonal carcinomal cells, ECC). Эти клетки обладают тотипотентностью и их с успехом применяют в различных манипуляциях с зародышами. ESC — это клетки, выделенные из ВКМ и поддерживаемые в культуре *in vitro* на протяжении многих пассажей. ESC способны создавать клоны в агрегационных химерах, хотя и с меньшей эффективностью, чем клетки ВКМ того же генотипа. Агрегация ESC с тетраплоидными зародышами мышей приводила к рождению мышат, состоящих в основном из ESC-производных, тетраплоидные же клетки находили в желточном мешке и трофобласте [36]. Инъекция ESC в бластоцель также приводит к рождению мышат-химер [37], но авторы отметили, что избыточное введение ESC (15—20 клеток) вместо 4—8 под блестящую оболочку вызывало аномальное развитие зародышей.

Гомотипические ESC образуют адгезивные контакты с бластомерами морулы, но не бластоцисты. Использование ESC, несущих трансген в качестве маркера, позволило изучать в химерах распределение клеточных клонов, исследовать закономерности изменений, происходящих при становлении отдельных органов и тканей [38]. Применение ESC с мутантными или выключенными генами позволяет изучить роль этих генов в развитии зародышей [39, 40].

ECC, так же как и ESC, способны участвовать в создании агрегационных химер. Клеточных линий ЕС очень много, но исследователи отдают предпочтение карциномным линиям, полученным от мышей линии 129/Sv. Клетки ЕС получают из тератом, развившихся после инъекции зародышей мышат в эктопические места. Как и ESC, ECC тоже тотипотентны и агрегация их с восьмиклеточными зародышами обеспечивает рождение мышат-химер [41]. Некоторые авторы отмечают зависимость нормального развития таких химер от количества объединенных ECC [7, 42, 43], но в то же время введение в бластоцель от 20 до 40 ECC не приводило к аномальному развитию и появлению опухолей, последние наблюдали лишь в единичных случаях [44]. Из анализа этой работы складывается впечатление, что появление опухолей зависит от используемой линии ECC. Так, при инъекции ECC линии C17 в бластоцель зародышей не наблюдали появления опухолей. Более «молодые» линии ECC, как правило, не давали опухолей, а более «старые» обладали такими свойствами.

Сравнительный анализ результатов, полученных при использовании агрегационного и инъекционного методов, выявил различную способность линий ECC к образованию химер с F-зародыша-

ми — уровень получения химер был выше при инъекционном методе, несмотря на то, что предварительно линии ЕСС отобраны по их способности давать химеры агрегационным методом. При введении в бластоцель от 2 до 50 клеток ЕС только два плода из 193 имели морфологические изменения и у одного из 88 выявлена опухоль [45]. Поэтому необходима предварительная селекция линий клеток на способность образовывать химеры без развития опухолей. Распределение ЕСС по органам и тканям не зависело от количества введенных клеток, но уровень химеризма в постнатальном периоде снижался с возрастом химер, что свидетельствует о прохождении селекции против ЕС клеток на протяжении жизни химер. Эмбриональные карциномные клетки обнаруживаются в производных всех зародышевых листков, что открывает перспективы для использования их в терапевтической трансплантологии [46].

Агрегационные химеры предоставляют уникальную возможность изучить взаимодействие фенотипически сходных, но генотипически различных аллогенных популяций клеток в одном организме в течение эмбриогенеза и постнатального периода и исследовать судьбу каждой популяции клеток, проследить время и место действия летальных мутаций. Исследование гена *white*, одного из девяти аллелей локуса *mi* у мышей, начато Конюховым в 1965 г. Мутантные аллели локуса *mi* нарушают развитие нервного гребня, приводят к нарушению образования меланоцитов [47]. Изучение паттерна пигментации у агрегационных химер  $Mi^{wt}/+ \leftrightarrow +/+$  показало, что одинарная доза гена  $Mi^{wt}$  подавляет пролиферацию меланоцитов, а на химерах  $Mi^{wt}/+ \leftrightarrow Mi^{wt}/Mi^{wt}$  установлено, что пролиферация меланобластов  $Mi^{wt}/Mi^{wt}$  (двойная доза гена) блокируется на ранних стадиях эмбриогенеза [48].

С помощью агрегационных химер изучали функцию и других генов: *mca*, *T* (*Brachyury*),  $I^{SI}$  (*strong's luxoid gene*). Исследование летальных генов в химерах позволяет выяснить причины, вызывающие гибель зародышей, стадию, на которой происходит действие гена, систему, в которой данный ген реализуется. В большинстве работ фенотипические эффекты проявления мутантных генов зависели от процентного состава в химере клеток с мутантным генотипом [49—51].

Известно, что мыши являются объектом, позволяющим изучать болезни человека. Болезнь Хиршспринга человека, как и мыши, гомозиготные по *ls/ls*, характеризуются отсутствием ганглиев в дистальном конце кишечника. Для выяснения причины отсутствия ганглиев были созданы химеры  $ls/ls \leftrightarrow +/+$  с восьмиклеточными зародышами. Оказа-

лось, что у животных, имевших более 20 % клеток дикого типа, ганглии образовывались. При этом выяснилось, что за развитие дефекта *ls/ls* эмбрионов отвечают не нейробласты, а мезенхима кишечника [52].

С помощью агрегационных химер установлено, что фенотипическая экспрессия гена *nude* подавляется присутствующими нормальными эмбриональными тканями. У мышей *nude* наблюдают отсутствие тимуса, в то время как из 17 химер  $nude \leftrightarrow +/+$  у 16 обнаружено наличие нормального тимуса [53]. Химеры с успехом применяются и в изучении канцерогенеза: исследуется развитие опухолей в зависимости от генотипов используемых линий [54].

В 1984 г. опубликованы работы, доказывающие невозможность развития Pg- и Ag-зародышей до рождения. Ag-зародыши с трудом развиваются до бластоцисты и гибнут, как правило, на стадии нескольких сомитов, а Pg-зародыши гибнут на стадии 25 сомитов (недавно удалось довести их развитие до стадии 45 сомитов) [55—57]. В связи с этим сделаны попытки спасти такие зародыши с помощью агрегации их с  $+/+$ -зародышами, кроме того, открылась заманчивая перспектива быстрого получения чистых линий при использовании Pg-клеток, в том случае, если они будут попадать в половые пути.

Первые работы по получению химер  $Pg \leftrightarrow +/+$  предприняты Стевенсом и соавт. [58, 59]. Авторы использовали линию мышей LT/Sv, у которой 10 % овулировавших яиц спонтанно развиваются партеногенетически. Сначала у потомков таких химер не обнаруживали Pg-клеток в половых путях, затем были получены потомки от химерной самки с Pg-генотипом (по окраске и GPI анализу). Создание инбредных мышей требует до 20 генераций брат-сестринских скрещиваний (около 5 лет). Однако достижение 100 %-й гомозиготности невозможно из-за баланса между возникновением новых мутаций и потерей прежних, вследствие чего постоянно остается небольшой уровень гетерозиготности. Поэтому использование Pg-гомозиготных зародышей предоставляет возможность более быстрого получения чистых линий, что особенно важно при создании пород у крупного рогатого скота, когда при традиционном подходе для этого не хватает целой жизни человека [60].

Исследование  $Ag \leftrightarrow +/+$ - и  $Pg \leftrightarrow +/+$ -химер позволило обнаружить, что Ag- и Pg-клетки неоднозначно распределяются по зародышевым и внезародышевым листкам. Pg-клетки находили в зародыше и мезодерме желточного мешка, однако не выявляли в его эктодерме и трофобласте. Ag-клетки обнару-

живали в основном в трофобласте и желточном мешке и только отдельные — в зародыше. Химеры  $Ag \leftrightarrow F$  гибнут, как правило, не доходя до рождения [61]. Поскольку распределение тех и других клеток было различным, то создавалось впечатление, что химеры  $Ag \leftrightarrow Pg$  могут спокойно развиваться до рождения. Но такие химерные зародыши развивались до бластоцист, имплантировали и погибали на 10—12-й день эмбрионального развития. Распределение  $Ag$ - и  $Pg$ -клеток у этих химер было сходным с таковым при их агрегации с  $F$ -зародышами. Следовательно, наличие только отцовского или материнского генома в отдельных клетках неадекватно их наличию в одной клетке [61]. Однако Ренард и Барра при объединении гаплоидных  $Pg$ - и  $Ag$ -зародышей с помощью электрослияния создали химеры между зародышами этих генотипов, объединяя их вначале на двух-, а затем и на четырехклеточных стадиях, и, пересадив их самкам-реципиентам, получили нормальных мышат [58—59]. Тем самым авторы доказали, что по крайней мере до восьмиклеточной стадии родительские геномы могут развиваться самостоятельно и не требуют объединения. Эти работы подтвердили также их данные в отношении цитоплазматических эффектов у линии ДДК, а именно — что синдром ДДК линии вызван материнской мРНК, которая может сохраняться до имплантации и модифицируется лишь отцовским геномом при взаимодействии с ним [65].

Распределение  $Pg$ -клеток в тканях  $Pg \leftrightarrow F$ -зародышей очень различно. До 10—12-го дня отмечалось равное соотношение тех и других клеток, а на последующих стадиях развития обнаруживалась направленная селекция против однородительских клеток. Причем элиминация  $Pg$ -клеток происходит сначала во внезародышевых оболочках, затем в тканях мезодермы и энтодермы [66, 67]. В тканях эктодермального происхождения гибель этих клеток идет не столь интенсивно и вклад  $Pg$ -клеток остается довольно велик в до- и постнатальном периодах [68, 69].  $Pg$ -клетки участвуют в формировании всех тканей, кроме скелетной мускулатуры, но в печени, почках и крови их вклад очень незначителен [69, 70].

Относительно значения  $Pg$ -клеток для тканей головного мозга, то у этих авторов работ [69, 70] имеются противоречия, хотя и другие исследователи подтверждают важность  $Pg$ -клеток для тканей мозга.  $Pg \leftrightarrow F$ -зародыши, как правило, меньше по размеру, чем контрольные. В связи с этим сделано предположение о том, что в таких химерах нарушена пролиферация клеток [70]. Была исследована пролиферативная активность клеток пищеварительного тракта и матки у  $Pg \leftrightarrow F$ -химер [71]. До

24-го дня постнатального развития у химер не обнаружено изменений в пролиферативной активности, но на 101-й день отмечено снижение пролиферации  $Pg$ -клеток в толстом кишечнике и матке. При этом в криптах толстого кишечника обнаруживались и морфологические изменения. Причина снижения пролиферации и гибели  $Pg$ -клеток неизвестна, но подтверждается многими исследователями. Отсутствие  $Pg$ -клеток в скелетной мускулатуре, возможно, связано с более ранней селекцией против  $Pg$ -миобластов, происходящей до их объединения в мышечное волокно.

Развитие  $Pg$ -эмбрионов мышей зависит от их линейной принадлежности [72] и это позволяет предположить, что элиминация  $Pg$ -клеток в химерах может осуществляться с различной интенсивностью в зависимости от генотипа  $Pg$ -клеток. Исачев и соавт. показали, что доимплантационное развитие химер  $(Pg)CBA \leftrightarrow BALB$  и  $(Pg)C_{57}Bi \leftrightarrow BALB$  происходит сходным образом, а в постимплантационном периоде у химер первого типа  $Pg$ -клетки погибают быстрее, чем у химер второго типа [69]. Зависимость развития  $Pg$ -клеток в химерах от их генотипической принадлежности отмечена также в работе [70] (причем использование чистых линий обеспечивает больший вклад  $Pg$ -клеток, чем  $Pg F_2$  этих линий). Таким образом, различия в результатах относительно вклада  $Pg$ -клеток в развитие разных органов и химер в целом, по-видимому, обусловлены их генотипическими различиями, стадиями развития объединенных зародышей, а также способом создания агрегационных химер.

В 1988 г. Сурани и соавт. [61] проанализировали  $Ag \leftrightarrow F$ -химеры на 10-й день эмбрионального развития.  $Ag$ -клетки обнаруживали в желточном мешке и трофэктодерме, причем в некоторых случаях их содержание превышало 50%. Содержание этих клеток 50% и более оказалось летальным для плода, несмотря на то, что они находились во внезародышевых оболочках. Только при незначительном количестве  $Ag$ -клеток в химере развитие плода доходит до рождения [73]. Химеры, как правило, были большого размера, а наибольшее количество  $Ag$ -клеток отмечено в скелетной мускулатуре и сердце и лишь следовые количества — в тканях головного мозга. Химеры  $Ag \leftrightarrow F$  погибали из-за нарушений в скелете и хрящевой ткани. Скорее всего, экспрессия с отцовских аллелей ответственна за развитие сердца и скелетной мускулатуры, а для нормального развития необходим баланс дозы гена. Если баланс нарушен дупликациями родительских хромосом или даже их участков, то наблюдаются фенотипические нарушения [74].

Значительное улучшение потенциала развития

Ag-клеток в химерах получено при использовании ESC линии 129/Sv, обеспечивших развитие Ag-химер до рождения. Химеры были большого размера, но имели различные нарушения в развитии [75]. Таким образом, следует отметить различия в потенциях Ag- и Pg-клеток в составе химер.

ES клетки использовали не только при исследовании химер с Ag-, но и с Pg-клетками. Необходимо выделить ряд особенностей развития химер при использовании PgESC — это нормальный размер зародышей и экспрессия ряда генов, которые не экспрессировались у Pg-зародышей, что, по мнению авторов, связано с изменением регуляции PgESC. Распределение же PgESC по тканям и органам было аналогично таковому Pg-клеток в зародышах [76].

Ограничение потенций в развитии Pg- и Ag-клеток в химерах связывают с нарушением геномного импринтинга в них. Под геномным импринтингом подразумевается регуляторный процесс распознавания аллелей материнского и отцовского происхождения. Таких импринтированных генов в геноме млекопитающих насчитывают около 0,1 % [77]. Наиболее изученными генами, подверженными импринтингу, являются: *Igf2* — ген инсулиноподобного фактора роста; *Igf2r* — ген его рецептора; *H-19* — тесно сцепленный с *Igf2*, но имеющий противоположный импринт; *SnrpN* — ген малого ядерного рибонуклеопротеина N. Считается, что импринтинг реализуется посредством метилирования геномной ДНК во время гаметогенеза [78]. В последние годы ведется активное изучение этой проблемы и отмечен большой поток работ, посвященных исследованию импринтинга и его регуляции у отдельных генов [79—81]. Изучение двух генов — *Igf2* и *Igf2r*, экспрессирующихся в норме только с отцовских и материнских аллелей соответственно, у Ag- и Pg-клеток химер позволило обнаружить изменение импринта этих генов, они работали в таких клетках как с материнских, так и отцовских аллелей. Кроме того, двойная доза этих генов могла вызывать аномалии, причем изменение экспрессии отцовских аллелей, ответственных за становление определенных клеточных линий, приводило к большим нарушениям [82].

Изменение импринта ES клеток при введении их в химеры, наблюдали в примордиальных половых клетках эмбрионов 12,5 дня развития [83]. Исследование импринта гена *H-19* в условиях *in vitro* и *in vivo* на стадии бластоцисты обнаружило нарушение его экспрессии в системе *in vitro*. В среде Whitten обычно молчащий отцовский аллель начинал экспрессироваться, в то время как в среде KSOM+AA (аминокислотные добавки) экспрессия

этого аллеля омечалась, но была очень низкой. Появление экспрессии гена *H-19* в системе *in vitro* не связано с недостатком ДНК-метилтрансферазной активности или распределением белка Dnmt1, которые были одинаковыми в обеих системах. Тем более, что импринт гена *SnrpN* у зародышей в обеих системах оставался неизменным [84].

Изменение экспрессии генов *H-19*, *Igf2*, а также импринтированного гена *Grb10* отмечено у пренатальных мышат в том случае, если до стадии бластоцисты зародыши культивировали в среде M16, а затем пересаживали самкам-реципиентам [85]. Можно предположить, что повышенная экспрессия *Igf2* в AgES ответственна за развитие избыточной массы и аномалий в скелете. Для выяснения этого вопроса введены мутации *Igf2*<sup>-/-</sup> в AgES-клетки. У химер, несущих эту мутацию, не наблюдали скелетных аномалий, однако выявили другие аномалии, включая избыточную массу и эмбриональную гибель, что, по-видимому, свидетельствует о существовании в химерах с Ag-клетками и других импринтированных генов, ответственных за эти нарушения [86].

Представляет определенный интерес работа, проведенная группой Сурани [87], в которой было сопоставлено развитие химер с Pg- и Ag-клетками, несущими дубликацию дистального района 7-й хромосомы, где расположены гены *H-19* и *Igf2*, *PatDi7*→*N* и *MatDi7*→*N*. Выяснилось, что зародыши, несущие дубликацию дистального района, гибли на 16-й день развития, когда несли *MatDi7*, в то время как при наличии отцовской дубликации *PatDi7* гибель наступала на более ранних стадиях. При этом у химер с *PatDi7* выявлен ускоренный рост по сравнению с химерами с Ag-клетками. Масса эмбрионов у химер *MatDi7* была сравнима с таковой у обычных эмбрионов и они выживали до родов (в то время как F-зародыши *MatDi7* гибли на 16-й день развития). У химер с Pg-клетками отмечено замедление роста. Эти результаты свидетельствуют о кумулятивном эффекте других генов, расположенных на дистальном конце хромосомы 7. Явление импринтинга все еще недостаточно изучено, и в последние годы (1999—2001) опубликовано особенно много работ, посвященных этому эпигенетическому регуляторному процессу экспрессии генов у млекопитающих [81, 88].

Еще в 1979 г. МакЛарен предсказала возможность эффекта гетерозиса у химер, несущих две генетически различные популяции клеток [89]. Фолкнер и соавт. [90] отметили наличие гетерозиса по массе химер, но не обнаружили каких-либо закономерностей ее повышения. В том же году было показано, что степень гетерозиса по величине

помета у химер находится в прямой зависимости от степени химеризма [91]. Тщательный анализ всех пометов у химер  $BALB \leftrightarrow C_{57}Bl$  позволил выявить такую зависимость в яйчниках и других органах самок, дающих две популяции потомков, тогда как у самок, дающих потомков одного генотипа, гетерозис не был обнаружен, несмотря на высокий вклад клеток обоих генотипов в яйчники. Важно отметить, что у названных химер в смешанных пометах рождались, в основном, детеныши генотипа  $C_{57}Bl$ , в то время как в яйчниках доминантной компонентой были клетки линии  $BALB$ . Это же отмечено и для самок однокомпонентных пометов — из девяти самок-химер семь рожали детенышей только линии  $C_{57}Bl$ . Авторам работы не удалось установить, с чем может быть связано проявление большего числа детенышей линии  $C_{57}Bl$  при высоком уровне химеризма в яйчниках обеих клеточных популяций. Они ссылаются на данные Герхарда о возможном наличии у таких самок генотипа  $XX/XY$ . Кроме того, обнаружены различия в потомстве у самцов химер  $BALB \leftrightarrow C_{57}Bl$ , скрещенных с самками  $BALB$ , зависящие от времени спаривания и времени овуляции у самок, а также от возраста химерных самцов [93]. Повышенную фертильность химер по сравнению с исходными родителями отметили Ренк и Клюгер [94].

Рождение преимущественно детенышей одного генотипа было отмечено и в более ранних работах. При скрещивании самцов химер  $C_{57}Bl \times C_{3}H$  с самками  $C_{57}Bl$  доля детенышей последнего генотипа резко снижалась с увеличением возраста самцов, хотя даже в 15-месячном возрасте такие самцы несли более 30 % сперматозоидов генотипа  $C_{57}Bl$ . Этот факт делает вполне реальным предположение о существовании внутриматочного отбора против эмбрионов собственного генотипа у самок линии  $C_{57}Bl$ , который зависит не только от генотипа, но и от возраста матери. Инбредные самки  $C_{57}Bl$  с возрастом становятся менее способными к вынашиванию инбредных эмбрионов того же генотипа. Преобладание  $C_{3}H$  половых клеток у химер  $C_{3}H \leftrightarrow C_{57}Bl$  происходит, несмотря на то, что в яйчниках идет отбор на преобладание клеток генотипа  $C_{57}Bl$  [95]. Тенденция к преобладанию одного компонента в составе двух популяций половых клеток отмечается и в других сочетаниях линий. Большинство самцов химер  $SJL \leftrightarrow C_{57}Bl$  генерируют только  $SJL$  сперматозоиды, даже те самцы, которые производят оба типа клеток [96].

Материнский эффект при развитии химер до 12,5 дня отмечен и для линии  $BALB$ . Наблюдали уменьшение в химерах клеток линии  $BALB$ , если эту линию использовали в качестве материнской

одного из компонентов химер [ $BALB \times (BC \times BALB) \leftrightarrow (C_{57}Bl \times CBA)F_2$ ], и отсутствие такого эффекта при рецессивных скрещиваниях [ $(BC \times BALB) \times BALB \leftrightarrow (C_{57}Bl \times CBA)F_2$ ], когда линию  $BALB$  использовали как отцовскую. Авторы обсуждают три возможные причины этого явления: цитоплазматическое наследование, геномный импринтинг и влияние репродуктивного тракта [97].

Таким образом, причины избирательного взаимодействия двух генотипов с предпочтением одного из них в потомстве предстоит еще выяснить, вероятно, с привлечением третьей линии в качестве самок-реципиентов.

С помощью химер можно решать многие проблемы клеточной биологии, однако и сами химеры остаются весьма интересным объектом исследования. До сих пор нет четкого ответа на вопрос — существует ли предпочтительное сочетание определенных генотипов в химере, каковы должны быть особенности генотипов, позволяющие химере развиваться более активно и обладать повышенной жизнеспособностью. И если химеры толерантны к составляющим генотипам, то по каким признакам, кроме иммунологического, нужно вести подбор необходимых линий. Остается невыясненным, в какой степени асинхронность зародышей при создании химер сказывается на их доимплантационном и постнатальном развитии, каков количественный вклад клеток зародышей одного срока развития и соответственно генотипа необходим для того, чтобы «подчинить» себе регуляцию развития отстающих или более продвинутых в развитии зародышей. Для выяснения всех перечисленных вопросов необходимы дальнейшие исследования.

*L. M. Morozova, A. P. Solomko*

Experimental chimeras — instrument of investigation in development biology

Summary

*Potential of using experimental chimeras of mice as an analytical instrument in the experimental embryology and genetics of development is reviewed.*

*Л. М. Морозова, О. П. Соломко*

Експериментальні химери — інструмент біології розвитку

Резюме

*На прикладах численних досліджень розглянуто можливості використання химер мишей, отриманих за умов досліду, як аналітичного інструменту експериментальної ембріології та генетики розвитку.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tarkowski A. K.* Mouse chimeras developed from fused eggs // *Nature*.—1961.—190.—P. 857—860.

2. Mintz B. Formation of genotypically mosaic embryos // *Amer. Zool.*—1962.—2.—P. 432—.
3. Collins J. E., Flemming T. P. Epithelial differentiation in the mouse preimplantation embryo: making adhesive cell contacts for the first time // *Trends Biochem. Sci.*—1995.—20.—P. 307—312.
4. Matta C. A. Formation by aggregation of viable chimeras between ICM and eight-cell mouse embryos with different genetic backgrounds // *Func. and Develop. Morphol.*—1991.—1, N 3.—P. 35—39.
5. Kato Y., Tsunoda Y. Studies on the development of aggregation on chimeras experimentally produced between 8 to 16 cell embryos and isolated fetal germ cells in the mouse // *Jap. J. Anim. Reprod. Jap.*—1991.—37.—P. 225—230.
6. Tokunaga T., Tsunoda Y. Efficacious production of viable germ-line chimeras between embryonic stem cells and 8-cell stage embryos // *Develop. Growth and Differ.*—1992.—34, N 5.—P. 561—566.
7. Hanaoka K., Kondo S., Hayasaka M., Kato Y. Internalization of embryonal carcinoma cells when aggregated with normal mouse embryos // *Develop. Groth and Differ.*—1987.—29, N 4.—P. 307—315.
8. Maro B., Kubiak J., Queth C., Depennart H., Houliston S., Weber M., Antony C., Aghion J. Cytoskeleton organization during oogenesis, fertilization and preimplantation development of the mouse // *Int. J. Develop. Biol.*—1990.—34.—P. 127—137.
9. Steinberg M. Reconstruction of tissues by dissociated cells // *Science.*—1963.—141.—P.401—408.
10. Hillman N., Sherman M. I., Graham C. Effect of spatial arrangement of cell determination during mouse development // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1972.—28.—P. 263—278.
11. Wilson I. B., Bolton E., Cutter R. H. Preimplantation differentiation in the mouse egg as revealed by microinjection of vital markers // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1972.—27.—P. 467—479.
12. Gardner R. L. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst // *Nature.*—1968.—220.—P. 596—597.
13. Максимовский Л. Ф., Кизилова Е. А., Железова А. И., Голубица А. Р., Мазуров М. М. Взаимодействие гомо- и гетеротипических эмбриональных стволовых клеток с развивающимися зародышами // *Онтогенез.*—1998.—29.—С. 96—103.
14. Moustafa L. A. Chimeric rabbits from embryonic cell transplantation // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*—1974.—147.—P. 485—488.
15. Rossant J., Croy B. A., Clark D. A., Chapman V. M. Interspecific hybrids and chimeras in mice // *J. Exp. Zool.*—1983.—228.—P. 223—233.
16. Tachi S., Tachi C. Electron microscopic studies of chimeric blastocysts experimentally produced by aggregating blastomeres of rat and mouse embryos // *Develop. Biol.*—1980.—80.—P. 18—27.
17. Mystkowska E. T. Development of mouse-bank vole interspecific chimeric embryos // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1975.—33.—P. 731—744.
18. Gardner R. L., Jonson M. N. Investigation of cellular interaction and development in early mammalian embryo using interspecific chimeras between the rat and mouse // *Cell Patter. Ciba Found. Symp.*—1975.—29.—P. 183—196.
19. Fehilly C., Willadsen S. H., Tucker E. M. Interspecific chimeras between sheep and goat // *Nature.*—1984.—307.—P. 634—636.
20. Свиридова Т. А., Чайлахян Л. М., Венпринцев Б. Н. Получение химеры заменой одного ядра у двухклеточного эмбриона мыши // *Докл. АН СССР.*—1987.—296, № 3.—С. 749—754.
21. Petters R. M., Mettus R. V. Survival rat to term of chimeric morulae produced by aggregation of five to nine embryos in the mouse, *Mus. musculus* // *Theriogenology.*—1984.—22.—P. 167—174.
22. Lewis N. E., Rossant J. Mechanisms of size regulation in mouse embryo aggregates // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1982.—72.—P. 169—181.
23. Rands G. F. Size regulation in the mouse embryo. I. The development of quadruple aggregates // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1986.—94.—P. 139—148.
24. Schwarzpaul W., Petzoldt U. Influence of embryo size on lactate dehydrogenase isozyme expression in giant mouse chimeras // *Anat. Embryol.*—1988.—178.—P. 281—285.
25. Smeyne R. J., Vendrell M., Hayward M., Baker S. J., Miao G. G., Schilling K., Robertson L. M., Curran T., Morgan J. I. Continuous *c-fos* expression proceeds programmed cell death *in vivo* // *Nature.*—1993.—363.—P. 166—169.
26. Bowman P., McLaren A. Viability and growth of the mouse embryos after *in vitro* culture and fusion // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1970.—23.—P. 693—704.
27. Landa V., Tepla O. Construction of aggregation chimeras from 8-cell mouse embryos stored for several years in liquid nitrogen // *Folia biol.*—1990.—36.—P. 159—164.
28. Зубин М. Н. Проблема получения химерных животных // *Пробл. сохранения и поддержания генет. количества лаб. животных: консервация генет. ресурсов.*—Пушино, 1991.—С. 126—129.
29. Braude P. R. Time dependent effects of  $\alpha$ -amanitin on blastocyst formation in the mouse // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1979.—52.—P. 193—202.
30. Kelly S. J., Mulnarol J. G., Graham C. T. Cell division and cell allocation in early mouse development // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1978.—48.—P. 37—51.
31. Surani M. A. H., Barton S. C. Spatial distribution blastomeres in dependent on cell division order and interactions in mouse morula // *Develop. Biol.*—1984.—102.—P. 335—343.
32. Prather R. S., First N. L. Reprogramming of murine blastocoele formation // *J. Exp. Zool.*—1987.—237.—P. 347—350.
33. Prather R. S., First N. L. Developmental fate in chimeras derived from highly asynchronous murine blastomeres // *J. Exp. Zool.*—1987.—242.—P. 27—33.
34. Pinyopummin A., Takahashi Y., Hishinuma M., Kanagawa H. Development of single blastomeres from 4-cell stage embryos after aggregation with parthenogenones in mice // *Jap. J. Vet. Res.*—1994.—42.—P. 119—126.
35. Garbutt C. L., Johnson M. N., George M. A. When and how does cell division order influence cell allocation to the inner cell mass of the mouse blastocyst // *Development.*—1987.—100.—P. 325—332.
36. Nagy A., Rossant Y., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder L. C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early pass age embryonic stem cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—90.—P. 8424—8428.
37. Nagy A., Gocza E., Diaz E. M., Prideaux V. R., Ivanyi F., Markula M., Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // *Development.*—1990.—110.—P. 815—821.
38. Brinster R. L. Stem cells and transgenic mice in the study of development // *Int. J. Develop. Biol.*—1993.—37.—P. 89—99.
39. Travis J. Scoring a technical knockout in mice // *Science.*—1992.—256.—P. 1392—1394.
40. Magnuson T., Epstein Ch. J., Silver L. M., Martin G. R.

- Pluripotent embryonic stem cell lines can be derived from  $w^5t/w^5$  blastocysts // *Nature*.—1982.—298.—P. 750—753.
41. Lenton E., Wartiovaara J., Reima J. Cell relationships during aggregation between preimplantation embryos and teratocarcinoma-derived cells // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1984.—81.—P. 17—35.
  42. Beecher K., Wobus A. M., Konrad U., Schoneich I. Injection of murine embryonal carcinoma cells and embryo-derived pluripotential cells into mouse // *Cell Differentiation*.—1984.—15.—P. 195—202.
  43. Mintz B., Ilmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1975.—72.—C. 3585—3589.
  44. Papaioannou V. E., Mc Burney M. W., Gardner R. L., Evans M. Y. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos // *Nature*.—1975.—258.—P. 70—73.
  45. Hanaoka K., Hayasaka M., Noguchi T., Kato Y. Viable chimeras between embryonal carcinoma cells and mouse embryos: comparison of aggregation and injection methods // *Develop. Growth and Differ.*—1987.—29.—P. 263—270.
  46. Boheler K. K., Fiszman M. Y. Can exogenous stem cells be used in transplantation // *Cells Tissues Organs*.—1999.—165.—P. 237—245.
  47. Колюхов Б. Н., Малинина Н. А., Марчук Е. Г. Изучение экспрессии мутантного гена *mi* у агрегационных мышей // *Онтогенез*.—1993.—24, № 4.—С. 11—18.
  48. Колюхов Б. Н., Кудряков Б. Н., Малинина Н. А. Изучение эффектов гена *white* на пигментацию волосяного покрова у агрегационных химер // *Изв. АН СССР, Сер. Биология*.—1993.—№ 4.—С. 500—506.
  49. Hamre K. M., Goldowitz D. Meander tail acts intrinsic to granule cell precursors to disrupt cerebellum development: analysis of meander tail chimeric mice // *Development*.—1997.—124.—P. 4201—4212.
  50. Wilson V., Rashbass P., Beddington R. S. P. Chimeric analysis of T (*Brachyury*) gene function // *Development*.—1993.—117.—P. 1321—1331.
  51. Forsthoefel P. E., Kanjanangkulpan P. B., Harmon S. Developmental interactions of cells mutant for *strong's luxoid* gene with normal cells in chimeric mice // *J. Hered.*—1983.—74.—P. 153—162.
  52. Kapur R. P., Yost C., Palmiter R. D. Aggregation chimeras demonstrate that the primary defect responsible for aganglionic megacolon in lethal spotted mice is not neuroblast autonomous // *Development*.—1993.—117.—P. 993—999.
  53. Nakaaki O. Phenotypic expression in *nude*↔normal chimeric mice // *Genet. Approach Develop. Neurobiol.*—Tokyo; Berlin, 1982.—P. 95—98.
  54. Elbling L., Sauerman G. Predominance of cell population less sensitive to carcinogenesis in neoplastic cells of 3-methylcholanthrene-induced tumors in mouse aggregation chimeras // *Cancer Res.*—1982.—42.—P. 3486—3491.
  55. Mc Grath J., Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes // *Cell*.—1984.—33, N 2.—P. 179—183.
  56. Surani M. A., Barton S. C., Norris M. L. Development of reconstituted mouse eggs suggest imprinting of genome during gametogenesis // *Nature*.—1984.—308.—P. 548—550.
  57. Пенков Л. И., Платонов Е. С. Ультро-сер-Г и 5-азацидин пролонгируют развитие парthenогенетических зародышей мышей // *Онтогенез*.—1997.—28, № 2.—С. 138—143.
  58. Eppig J. J., Zozak L. P., Eicher E. M., Stevens L. C. Viable chimeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos // *Nature*.—1977.—269.—P. 515—518.
  59. Stevens L. C. Totipotent cells of parthenogenetic origin in a chimeric mouse // *Nature*.—1978.—276.—P. 266—267.
  60. Andereggs Ch., Markert C. L. Successful rescue of microsurgically produced homozygous uni parental mouse embryos via production of aggregation chimeras // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1986.—83.—P. 6509—6513.
  61. Surani M. A., Barton S. C., Howlett S. K., Norris M. L. Influence of chromosomal determinants on development of androgenetic and parthenogenetic cells // *Development*.—1988.—105.—P. 171—178.
  62. Surani M. A., Barton S. C., Norris M. L. Influence of parental chromosomes on spatial of androgenetic↔parthenogenetic chimeras in the mouse // *Nature*.—1987.—326.—P. 395—397.
  63. Barra J., Renard J.-P. Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term // *Development*.—1988.—102.—P. 773—779.
  64. Renard J.-P., Babinet Ch., Barra J. Participation of the paternal genome is not required before the eight-cell stage for full-term development of mouse embryos // *Develop. Biol.*—1991.—143.—P. 199—202.
  65. Babinet Ch., Richoux V., Guinet J.-L., Renard J.-P. The DDK inbred strain as a model for the study of interaction between parental genomes and egg cytoplasm in mouse preimplantation development // *Development*.—1990.—Suppl.—P. 81—87.
  66. Wagy A., Paldi A., Dezso L., Varga L., Magyar A. Prenatal fate of parthenogenetic cells in mouse aggregation chimeras // *Development*.—1987.—101.—P. 67—71.
  67. Fundele R. H., Norris M. L., Barton S. C. Temporal and spatial selection against parthenogenetic cells during development of fetal chimeras // *Development*.—1990.—108.—P. 203—211.
  68. Paldi A., Nagi A., Morkkula M., Barna I., Dezso L. Postnatal development of parthenogenetic↔fertilized mouse aggregation chimeras // *Development*.—1989.—105.—P. 115—118.
  69. Исаев Д. А., Миронова О. В., Платонов Е. С., Колюхов Б. В. Анализ парthenогенетических клеточных клонов у химерных мышей CBL/6(PG)↔BALB/c // *Онтогенез*.—1999.—30.—С. 64—67.
  70. Fundelle R., Howlett S. K., Kotharg R., Norris M. L., Mills W. E., Surani M. A. Developmental potential of parthenogenetic cells: role of genotype specific modifier // *Development*.—1991.—113.—P. 941—946.
  71. Jagerbauer E.-M., Fraser A., Herbst E. W., Kothary R., Fundele R. Parthenogenetic stem cells in postnatal mouse chimeras // *Development*.—1992.—116.—P. 95—102.
  72. Penkov L. I., Platonov E. S., Mironova O. V., Konyukhov B. V. Effect of 5-azacytidine on the development of parthenogenetic mouse embryos // *Develop. Growth Differ.*—1996.—38.—P. 263—270.
  73. Barton S. C., Ferguson-Smith A. C., Fundele C., Surani M. A. Influence of paternally imprinted genes on development // *Development*.—1991.—113.—P. 679—687.
  74. Cattenach B. M. Parental origin effects in mice // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1986.—97.—Suppl.—P. 137—150.
  75. Mann J. R., Stewart C. L. Development to term of mouse androgenic aggregation chimeras // *Development*.—1991.—113.—P. 1325—1333.
  76. Allen N. D., Barton S. C., Hilton K., Norris M. L., Surani M. A. A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells // *Development*.—1994.—120.—P. 1473—1482.
  77. Barlow D. P. Competition — a common motif for the imprinting mechanism? // *EMBO J.*—1997.—16.—P. 6899—6909.
  78. Chaillet J. R., Vogt T. F., Beier D. R., Leder Ph. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established

- during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis // *Cell*.—1991.—66.—P. 77—85.
79. *Constancia M., Pickard B., Kelsey G., Reik W.* Imprinting mechanisms // *Genome Res*.—1998.—8.—P. 881—900.
80. *Jaenisch R.* DNA methylation and imprinting: why bother? // *Trends Genet*.—1997.—13.—P. 323—329.
81. *Jones B. K., Levorske J., Tilghman Sh. M.* Deletion of a nuclease-sensitive region between the *Igf2* and *H19* genes leads to *Igf2* misregulation and increased adiposity // *Hum. Mol. Genet*.—2001.—10, N 8.—P. 807—819.
82. *Latham K. E., Doherty A. S., Scott C. D., Schultz R. M.* *Igf2r* and *Igf2* gene expression in androgenetic, gynogenetic and parthenogenetic preimplantation mouse embryos absence of regulation by genomic imprinting // *Genes and Develop*.—1994.—8.—P. 190—299.
83. *Labosky P. A., Barlow D. P., Hagan B. L. M.* Mouse embryonic germ (EG) cells lines: transmission through the germline and difference in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (*Igf2r*) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines // *Development*.—1994.—120.—P. 3197—3204.
84. *Doherty A. S., Mann M. R. W., Trembly K., Bartolomei M. S., Schultz R. M.* Differential effects of culture on imprinted H-19 expression in the preimplantation mouse embryo // *Biol. Reprod*.—2000.—62.—P. 1526—1535.
85. *Khosla S., Dean W., Brown D., Reik W., Feil R.* Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes // *Biol. Reprod*.—2001.—64.—P. 918—926.
86. *McLaughlin K. J., Kochanowski H., Solter D., Schwarzkopf G., Szabb P. F., Mann J.* Roles of the imprinted gene *Igf2* and paternal duplication of distal chromosome 7 in the perinatal abnormalities of androgenetic mouse chimeras // *Development*.—1997.—124.—P. 4897—4904.
87. *Ferguson-Smith A. C., Cattanach B. M., Barton B. C., Beechey C. V., Surani M. A.* Embryological and molecular investigation of parental imprinting on mouse chromosome 7 // *Nature*.—1991.—351.—P. 667—670.
88. *Kaffer Ch. R., Srivastava M., Park K.-Y., Ives E., Hsieh S., Battle J., Grinberg A., Huang S.-P., Pfeifer K.* A transcriptional insulator at the imprinted *H19/Igf2* locus // *Genes and Develop*.—2000.—14.—P. 1908—1919.
89. *МакЛарен Э.* Химеры млекопитающих.—М.: Мир, 1979.—176 с.
90. *Falconer D. S., Gaudl I. K., Roberts R. G., Williams D. A.* The control of body size in mouse chimeras // *Genet. Res*.—1981.—38.—P. 25—46.
91. *Georhart J., Oster-Granite M. L.* Reproduction in a population of chimeric mice relationship of chromosomal sex to functional germ cells and proportions of chimeric components in several tissues // *Biol. Reprod*.—1981.—24.—P. 713—722.
92. *Hitoshi Mikami, Akira Onishi.* «Heterosis» in litter size of chimeric mice // *Genet. Res. Camb*.—1985.—46.—P. 85—94.
93. *Bauer M., McLaren A.* Interlitter variation in progeny of chimeric male mice // *J. Reprod. and Fertil*.—1989.—72.—P. 213—221.
94. *Renk R., Kluge R., Hahn J.* Untersuchungen zur genetischen Charakterisierung und Fruchtbarkeit von Mausechimeren // *Zuchthygiene*.—1986.—21.—P. 198—206.
95. *Burgoyne R. S.* Sperm phenotype and its relationship to somatic and germ line phenotype. A study using mouse aggregation chimeras // *Develop. Biol*.—1975.—44.—P. 63—76.
96. *Mullen R. J., Whitten W. K.* Relationship of genotype and degree of chimerism in coat color to sex ratios and gametogenesis in chimeric mice // *J. Exp. Zool*.—1971.—178.—P. 165—176.
97. *West J. D., Flockhart J. H., Kissenpfenning A.* A maternal genetic effect on the composition of mouse aggregation chimeras // *Genet. Res. Camb*.—1995.—65.—P. 29—40.

УДК 575.22

Надійшла до редакції 23.07.01