

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**



**ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ  
НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**



**ЛАБОРАТОРИЯ “ГЕНОМНА ДИНАМИКА И СТАБИЛНОСТ”**

---

**Теодора Кирилова Тасева**

**Влияние на етанола върху ембрионалното  
развитие, експресията и метилационния  
статус на импринтиран локус *Igf2/H19* при  
мишки**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на  
дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Професионално направление: 4.3. „Биологични науки“

Научна специалност: 01.06.06. „Генетика“

*Научен ръководител:*

**Доц д-р Леонид Пенков**

*Рецензенти:*

**Доц д-р Валя Василева**

**Доц д-р Светослав Димов**

**СОФИЯ, 2016**

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**



**ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ  
НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА**



ЛАБОРАТОРИЯ “ГЕНОМНА ДИНАМИКА И СТАБИЛНОСТ”

---

**Теодора Кирилова Тасева**

**Влияние на етанола върху ембрионалното  
развитие, експресията и метилационния  
статус на импринтиран локус *Igf2/H19* при  
МИШКИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**СОФИЯ, 2016**

Дисертационният труд съдържа 174 страници и е онагледен с 10 таблици и 54 фигури. Библиографската справка съдържа 379 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширения Научен съвет на лаборатория „Геномна динамика и стабилност“ към Институт по Физиология на Растенията и Генетика - БАН, проведено на 10.11.2016 г.

Експерименталната работа е проведена в лаборатория „Геномна динамика и стабилност“ при Институт по Физиология на Растенията и Генетика - БАН, София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ..... от .....ч. в заседателната зала на Институт по Физиология на Растенията и Генетика - БАН, ул. „Георги Бончев“ бл. 21 с Протокол № 9/16.11.2016г. и утвърдено със Заповед № 1083/22.11.2016г. на директора на Институт по Физиология на Растенията и Генетика – БАН.

Научното жури е в състав:

- **Председател:**
  1. Доц д-р Валя Василева – рецензент
- Членове:**
  2. Проф дн Нина Атанасова – становище
  3. Доц д-р Светослав Димов - рецензент
  4. Доц д-р Леонид Пенков – становище
  5. Доц д-р Милена Мурджева – становище

Материалите по защитата са на разположение в Библиотеката и на Web-страницата на Институт по Физиология на Растенията и Генетика - БАН, София.

**Използвани съкращения:**

|                   |                                                           |
|-------------------|-----------------------------------------------------------|
| ФАС-              | Фетален алкохолен синдром                                 |
| ФАСР-             | Фетален алкохолен спектър от разстройства                 |
| <i>Actb</i> -     | Actin beta                                                |
| <i>Atp5b</i> -    | ATP synthase subunit 5beta                                |
| CI-               | Confidence interval                                       |
| DMRs-             | Диференцирано метилирани райони                           |
| DNMT-             | ДНК метилтрансфераза                                      |
| dpc-              | day post coitum                                           |
| <i>Gapdh</i> -    | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase                  |
| <i>Hsp90ab1</i> - | Heat shock protein 90kDa, alpha family, class B, member 1 |
| <i>H19</i> -      | Импринтиран, майчино експресиран транскрипт               |
| ICR-              | Район, контролиращ импринтинга                            |
| <i>Igf2</i> -     | Инсулин-подобен растежен фактор II                        |
| MS-HRM-           | Methylation-sensitive high resolution melting             |
| P <sub>m</sub> -  | Процент на медиация                                       |
| REST-             | Relative Expression Software Tool                         |
| RT-PCR-           | Reverse transcription polymerase chain reaction           |
| WGA-              | Whole Genome Amplification                                |



|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>СЪДЪРЖАНИЕ</b>                                                                                              | i  |
| <b>I. УВОД</b>                                                                                                 | 1  |
| <b>II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ</b>                                                                                       | 3  |
| <b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b>                                                                                 | 4  |
| <b>III.1. Материали</b>                                                                                        | 4  |
| <b>III.1.1. Моделна система</b>                                                                                | 4  |
| <b>III.2. Методи</b>                                                                                           | 4  |
| <b>III.2.1. Методи за получаване и третиране на бластоцисти, ембриони и плаценти</b>                           | 4  |
| III.2.1.1. <i>In vitro</i> експерименти                                                                        | 4  |
| III.2.1.2. Трансплантация на бластоцисти                                                                       | 4  |
| III.2.1.3. <i>In vivo</i> експерименти                                                                         | 5  |
| <b>III.2.2. Методи за изолиране на РНК</b>                                                                     | 5  |
| III.2.2.1. Изолиране на РНК от бластоцисти                                                                     | 5  |
| III.2.2.2. Изолиране на РНК от ембриони и плаценти                                                             | 5  |
| <b>III.2.3. Методи за обратна транскрипция</b>                                                                 | 5  |
| III.2.3.1. Обратна транскрипция на РНК от бластоцисти                                                          | 5  |
| III.2.3.2. Обратна транскрипция на РНК от ембриони и плаценти                                                  | 5  |
| <b>III.2.4. Методи за анализ на генна експресия</b>                                                            | 5  |
| III.2.4.1. Полимеразна верижна реакция (PCR)                                                                   | 5  |
| III.2.4.2. Real-Time PCR                                                                                       | 5  |
| <b>III.2.5. Метод за изолиране на ДНК</b>                                                                      | 6  |
| <b>III.2.6. Методи за получаване на стандарти за MS-HRM</b>                                                    | 6  |
| III.2.6.1. Получаване на метилиран ДНК стандарт                                                                | 6  |
| III.2.6.2. Получаване на неметилиран ДНК стандарт                                                              | 6  |
| <b>III.2.7. Модифициране на ДНК чрез натриев бисулфит</b>                                                      | 6  |
| <b>III.2.8. Метод за анализ на нивата на метилиране чрез метилационно-специфичен HRM (MS-HRM)</b>              | 7  |
| III.2.8.1. MS-HRM                                                                                              | 7  |
| III.2.8.2. Методи за детекция на нивото на метилиране при MS-HRM                                               | 7  |
| <b>III.2.9. Статистически анализи</b>                                                                          | 7  |
| III.2.9.1. Корелационни зависимости                                                                            | 8  |
| III.2.9.2. SPSS анализ за установяване на индиректен ефект чрез модел на медиация                              | 8  |
| <b>IV. РЕЗУЛТАТИ</b>                                                                                           | 9  |
| <b>IV.1. Оптимизиране на среда за култивиране <i>in vitro</i></b>                                              | 9  |
| <b>IV.1.1. Оптимизиране на рН</b>                                                                              | 9  |
| <b>IV.1.2. Оптимизиране на концентрацията на ЕДТА в средата</b>                                                | 9  |
| <b>IV.2. Влияние на етанола върху развитието на бластоцисти, ембриони и плаценти след третиране на 3.5 ден</b> | 10 |
| <b>IV.2.1. Влияние на етанола върху развитието на бластоцисти</b>                                              | 10 |

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>IV.2.2. Влияние на етанола върху развитието на ембриони и плаценти, получени от трансплантирани бластоцисти, третирани с доза 0.2% в условия in vitro</b> | 11 |
| IV.2.2.1. Сомитен стадий, общо състояние и тегло                                                                                                             | 11 |
| <b>IV.2.3. Влияние на етанола върху развитието на ембриони и плаценти, получени след третиране in vivo с дози от 2.9 и 5.8 g/kg</b>                          | 11 |
| IV.2.3.1. Сомитен стадий и общо състояние на ембрионите                                                                                                      | 11 |
| IV.2.3.2. Тегло на ембрионите                                                                                                                                | 12 |
| IV.2.3.3. Тегло на плацентите                                                                                                                                | 13 |
| <b>IV.2.4. Съотношение между тегло на ембриона и неговата плацента</b>                                                                                       | 14 |
| <b>IV.2.5. Процент на ембрионална резорбция (децидуа без развили се ембриони)</b>                                                                            | 14 |
| <b>IV.3. Real-Time PCR анализ на експресивните нива на гени след въздействие с етанол</b>                                                                    | 15 |
| <b>IV.3.1. Анализ на експресията на референтни гени <i>Gapdh</i> и <i>ActB</i></b>                                                                           | 15 |
| IV.3.1.1. Експресия на <i>Gapdh</i>                                                                                                                          | 15 |
| IV.3.1.2. Експресия на <i>ActB</i>                                                                                                                           | 16 |
| <b>IV.3.2. Анализ на експресията на <i>Igf2/H19</i> локус</b>                                                                                                | 17 |
| IV.3.2.1. Експресия в бластоцисти след третиране с 0.2% етанол                                                                                               | 17 |
| IV.3.2.2. Експресия в ембриони, получени от трансплантирани бластоцисти, третирани с 0.2% етанол                                                             | 17 |
| IV.3.2.3. Експресия в ембриони след третиране с 2.9 g/kg етанол                                                                                              | 18 |
| IV.3.2.4. Експресия в ембриони след третиране с 5.8 g/kg етанол                                                                                              | 19 |
| IV.3.2.5. Експресия в плаценти на ембриони, получени от трансплантирани бластоцисти, третирани с 0.2% етанол                                                 | 19 |
| IV.3.2.6. Експресия в плаценти след третиране с 2.9 g/kg етанол                                                                                              | 20 |
| IV.3.2.7. Експресия в плаценти след третиране с 5.8 g/kg етанол                                                                                              | 20 |
| <b>IV.3.3. Анализ на експресията на метилтрансферази <i>Dnmt1</i>, <i>Dnmt3a</i> и <i>Dnmt3b</i></b>                                                         | 21 |
| <b>IV.4. Анализ на метилационен статус с MS-HRM</b>                                                                                                          | 22 |
| <b>IV.4.1. Метилационен статус на импринтиран локус <i>Igf2/H19</i></b>                                                                                      | 22 |
| IV.4.1.1. Промяна в метилирането на <i>Igf2/H19</i> локус в ембриони                                                                                         | 22 |
| IV.4.1.2. Промяна в метилирането на <i>Igf2/H19</i> локус в плаценти                                                                                         | 23 |
| <b>IV.5. Статистически анализи на резултатите</b>                                                                                                            | 25 |
| <b>IV.5.1. Корелационни зависимости</b>                                                                                                                      | 25 |
| IV.5.1.1. Корелационна зависимост между тегло на ембриони и плаценти, и етанол                                                                               | 25 |
| IV.5.1.2. Корелационна зависимост между теглото на ембрионите и техните плаценти                                                                             | 26 |
| IV.5.1.3. Корелационна зависимост между теглото на ембриони и плаценти, и метилирането на DMRs на <i>Igf2/H19</i> локус                                      | 26 |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>IV.5.2. SPSS анализ за установяване на индиректен ефект</b>                                                                | 28 |
| IV.5.2.1. Индиректен ефект на теглото на плацентите при въздействие на етанола върху теглото на ембрионите                    | 28 |
| IV.5.2.2. Индиректен ефект на % метилиране на <i>DMRH19</i> в ембриони при въздействие на етанола върху теглото на ембрионите | 29 |
| IV.5.2.3. Индиректен ефект на % метилиране на <i>DMR0</i> в плаценти при въздействие на етанола върху теглото на плацентите   | 29 |
| <b>V. ОБСЪЖДАНЕ</b>                                                                                                           | 31 |
| <b>V.1. Анализ на факторите, оптимизиращи <i>in vitro</i> култивационната среда</b>                                           | 32 |
| <b>V.2. Стимулиращ и инхибиращ ефект на етанола, приложен <i>in vitro</i> в предимплантационния период</b>                    | 32 |
| <b>V.3. Етанол-индуцирана промяна в растежа и развитието на ембрионите</b>                                                    | 33 |
| <b>V.4. Етанол-индуцирана промяна в растежа и развитието на плацентите</b>                                                    | 33 |
| <b>V.5. Модулиране на експресията на импринтирани и неимпринтирани гени</b>                                                   | 33 |
| V.5.1. Оценка на референтните гени <i>Gapdh</i> и <i>ActB</i> като ендогенни стандарти                                        | 33 |
| V.5.2. Промяна в експресията на <i>Igf2/H19</i> импринтиран локус                                                             | 34 |
| <b>V.6. Етанол-индуцирани епигенетични промени</b>                                                                            | 35 |
| V.6.1. Модулиране на експресията на ДНК метилтрансферази                                                                      | 35 |
| V.6.2. Промени в метилационния статус на <i>Igf2/H19</i>                                                                      | 35 |
| V.6.2.1. Повишени нива на метилиране при ембриони                                                                             | 35 |
| V.6.2.2. Деметилиращ ефект на етанола в плаценти                                                                              | 35 |
| <b>V.7. Промени в модела на метилиране и функционалност на <i>Igf2/H19</i> локус като основа в етиологията на ФАС</b>         | 36 |
| <b>V.8. Заключение</b>                                                                                                        | 37 |
| <b>VI. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ</b>                                                                                                   | 38 |
| <b>VII. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА</b>                                                                                               | 40 |
| <b>VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ В ПЪЛЕН ТЕКСТ</b>                                                                                  | 41 |
| <b>IX. БЛАГОДАРНОСТИ</b>                                                                                                      | 42 |





## I. УВОД

Геномът включва цялата наследствена информация на организма. В отговор на непрекъснато променящите се условия на околната среда, неговата изява често претърпява адаптивни промени. Епигенетичните механизми са свързващото звено между влиянието на външните фактори и функционалната промяна на генома. Различните модификации в молекулата на ДНК, като метилиране, модифициране на хистони, РНК интерференция и др., регулират генната активност без да променят нуклеотидната последователност, което води до фенотипни промени в организмите. Тези модификации могат да се запазят дълго след като преходният сигнал от околната среда е изчезнал, както и да се предават в следващите поколения.

В последните десетилетия се натрупаха много факти, доказващи, че начинът на живот и ежедневно употребявани вещества като кофеин, никотин, етанол, както и лекарствени медикаменти, могат да променят епигенетичната регулация на генома, което да генерира различни болестотворни процеси.

Етанолът е едно от най-широко използваните пристрастяващи вещества в световен мащаб, като приемът му се е превърнал в сериозен медицински и социален проблем. Той е класически тератоген, способен да предизвика различни физически, психически и поведенчески разстройства. Употребата му по време на бременност, както и в периода преди зачеване, може да причини широка гама от аномалии в развитието, които варират по тежест - от едва забележими до спонтанни аборти. Пълният спектър от алкохолно-индуцираните морфологични и физиологични нарушения на развиващите се плод и плацента са обединени таксономично от понятието фетален алкохолен спектър от разстройства (ФАСР). Клинично ФАСР представлява съвкупност от хетерогенна група диагнози, една от които е феталният алкохолен синдром (ФАС). Той има три класически характеристики: пренатална и/или постнатална изостаналост в растежа и развитието, лицево-черепни малформации и мозъчни увреждания. Те могат да варират при различните носители, но причинените малформации са необратими и остават за цял живот.

Механизмите, стоящи в основата на алкохолната тератогенност, все още не са напълно изяснени. Широката вариабилност на причинените патологии след излагане на етанол през бременността предполага, че той нарушава множество различни процеси в растежа и развитието. Тежестта и вида на пренаталните повреди строго корелират с определени етапи от бременността, както и с дозите и времевата продължителност на

излагане. Един от уязвимите периоди е предимплантационният. Това е един от най-важните периоди, през който се осъществява епигенетично репрограмизиране в хода на ембрионалното развитие. Процесът включва мащабни промени в метилационния статус на генома и е критичен за започващата диференциация на клетките. Независимо че за този период е характерна пикова алкохолна тератогенност, той не е бил обект на системно изследване, насочено към влиянието на етанола върху епигенетични механизми като метилирането на ДНК.

В настоящия дисертационен труд се изследва влиянието на етанола, приложен в условия *in vitro* и *in vivo* през предимплантационния период, върху растежа и развитието на ембриони и плаценти. Проучването е насочено към импринтирания локус *Igf2/H19*, който представлява един от основните фактори, контролиращи ембриогенеза при бозайниците. С цел търсене на епигенетични основи в етиологията на ФАС е анализирана връзката между етанол-индуцираните нарушения в растежа и промени в метилирането на ДНК.

Получените резултати показват, че етанолът може да действа и стимулиращо и инхибиращо на ембрионалното развитие, в зависимост от условията и дозите на прилагане. Той повлиява нормалните нива на експресия и модулира метилирането в диференциално метилираните райони на импринтиран локус *Igf2/H19*.

Плацентата е по-уязвима към въздействието на етанол в сравнение с ембриона. Ефектът на алкохола върху този орган се изразява в молекулярно-генетични и епигенетични изменения, медиращи аберантен растеж и развитие. Тези изменения са част от механизмите и при алкохол-индуцираните аномалии в развитието на ембрионите.

## II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

**Целта** на настоящата дисертационна работа е да изследва връзката между етанол - индуцираната промяна в растежа на бластоцисти, ембриони и плаценти, и нивото на експресията и метилационния статус на импринтиран локус *Igf2/H19* след въздействие с етанол *in vitro* и *in vivo* по време на предимплантационния период на бременността при мишки.

За реализиране на тази цел бяха поставени следните конкретни експериментални задачи:

1. Изследване влиянието на различни концентрации етанол, приложени в предимплантационния период (четвърти ден от бременността), върху развитието на бластоцисти в среда *in vitro*.
2. Изследване на ефекта на етанола върху теглото на ембрионите и техните плаценти в средата на бременността след третиране с различни дози етанол, в предимплантационния период, в условия *in vitro* и *in vivo*.
3. Анализ на експресията на гените от импринтиран локус *Igf2/H19*:
  - i. в бластоцисти, след четиричасов период на излагане на оптимална доза етанол в среда *in vitro* в предимплантационния период.
  - ii. в ембриони и плаценти, в средата на бременността, след третиране с различни дози етанол в предимплантационния период в условия *in vitro* и *in vivo*.
4. Анализ на метилирането на диференциално метилираните региони - DMRs на импринтирания локус *Igf2/H19* в ембриони и техните плаценти, показващи физически характеристики на ФАС, в средата на бременността, след въздействие с етанол в предимплантационния период.
5. Изследване на промени в модела на метилиране и функционалност на *Igf2/H19* локуса, като основа в етиологията на ФАС.

## **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **III.1. Материали**

#### ***III.1.1. Моделна система***

За експерименталната работа в тази дисертация са използвани лабораторни (инбредна линия) мишки от вида *Mus musculus*, порода C57BL/6. Тази порода е най-използваната инбредна линия лабораторни мишки за научни експерименти като модел на човешки болести, както и за работа с етанол (Engber, 2011). Това е един от малкото видове мишки, който консумира алкохол доброволно и е чувствителен към неговото действие.

### **III.2. Методи**

#### ***III.2.1. Методи за получаване и третиране на бластоцисти, ембриони и плаценти***

##### ***III.2.1.1. In vitro експерименти***

За предизвикване на бременност и получаването на бластоцисти се прилага следната процедура. Един мъжки самец е събиран с три женски самки вечерта. Наличието на вагинална пробка на следващата сутрин е доказателство за копулация, и този ден се отбелязва като първи от бременността (0.5 dpc). На четвъртия ден сутринта бластоцистите се събират и се култивират в 500 µl оптимизирана културална среда, съдържаща 450 µl среда P1 (Preimplantation Stage One Medium, Irvine Scientific), 50 µl ЕДТА (100 µM.) и 400 mg/100ml албумин (Sigma). Инкубират се на 37°C . Оптималното рН (приблизително 7.2-7.4) за култивиране на ембрионите се постига с газова смес съдържаща 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> и 90% N<sub>2</sub> (Penkov et al., 1995).

По така описания начин се култивират контролните и опитните варианти, като към последните се добавя различен процент етанол - 0.01%, 0.1%, 0.2%, 0.4% и 1.0% (v:v). След четирите часа обработка, бластоцистите се замразяват при -20°C. Общият брой използвани за анализ на генна експресия бластоцисти е 176, от които 50% са третирани и 50% контроли.

##### ***III.2.1.2. Трансплантация на бластоцисти***

За имплантацията на бластоцисти се използват псевдобременни мишки (Penkov et al., 1999). След четиричасово излагане на етанол, от културалната среда се подбират добре развити бластоцисти. Имплантациите са извършвани само в единия рог на матката, като при всяка процедура са трансплантирани по 6 бластоциста. Реализирани са три

успешни трансплантации на бластоцисти след третиране с етанол. Ембрионите и плацентите за анализ са събирани на 12 ден от бременността със същата процедура както при *in vivo* опитите.

#### III.2.1.3. *In vivo* експерименти

Експерименталното третиране с етанол се извършва на четвъртия ден от бременността. За тестване на ниската доза етанол, еднократно се инжектират 0.015 ml/g 25%-ен етанол (2.9 g/kg) на предполагаемите бременни женски. Високата доза 0.030 ml/g 25%-ен етанол (5.8 g/kg) се инжектира на два пъти в рамките на 6-8 часа през деня до достигане на крайния обем. Контролните бременни животни не са третирани с никакви вещества. Плацентите и ембрионите са събирани на 12 ден от бременността (11.5 dpc)

### **III.2.2. Методи за изолиране на РНК**

#### III.2.2.1. Изолиране на РНК от бластоцисти

За изолирането на РНК от бластоцисти е използван кит за микро количества Quick-RNA Micro Prep (Zymo Research).

#### III.2.2.2. Изолиране на РНК от ембриони и плаценти

При изолирането е използван GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma).

### **III.2.3. Методи за обратна транскрипция**

#### III.2.3.1. Обратна транскрипция на РНК от бластоцисти

Обратната транскрипция на РНК от бластоцисти е извършена с кит Sensiscript Reverse Transcription (Qiagen), оптимизиран за работа с <50ng РНК.

#### III.2.3.2. Обратна транскрипция на РНК от ембриони и плаценти

За обратна транскрипция и PCR на РНК, получена от ембриони и плаценти, е използван кит Enhanced Avian HS RT-PCR (Sigma).

### **III.2.4. Методи за анализ на генна експресия**

#### III.2.4.1. Полимеразна верижна реакция (PCR)

Използван е кит Enhanced Avian HS RT-PCR (Sigma).

#### III.2.4.2. Real-Time PCR

Анализът е извършен чрез Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR system, като е използван кит Maxima SYBR Green qPCR Master mix (Thermo Scientific).

Първичната последователност, дължината на продуктите и температурата на анийлинг на праймерите са представени в таблица 1.

**Таблица 1.** Праймери, използвани при Real-Time PCR анализ

| Ген      | Праймер FWD (5'-3')           | Праймер REV (5'-3')      | Ta/С° | Продукт |
|----------|-------------------------------|--------------------------|-------|---------|
| Igf2 P0  | ATTGACCCAGCCAGCGGATC          | CTGTACTCTAGTCGCTTCGTAG   | 59    | 125     |
| Igf2 P1  | CTCGTCACTTCTCCTACGGTG         | CCCAGTCGTTTTCTGGACAC     | 59    | 135     |
| Igf2 P2  | GTTCTGTCCCGTCGCACATTC         | GGTATGCAAACCGAACAGCG     | 59    | 102     |
| Igf2 P3  | CTGGACATTAGCTTCTCCTGTG        | CTGAAGTTGGGTAAGGAGGC     | 59    | 88      |
| H19      | CCACTACACTACCTGCCTCAGGAATCTGC | GGTGGGTACTGGGGCAGCATTG   | 58    | 522     |
| Gapdh    | ACCACAGTCCATGCCATCACTGCCAC    | TCCACCACCCTGTTGCTGTA     | 58    | 447     |
| Actb     | TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC     | TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG | 58    | 348     |
| Atp5b    | GGCCAAGATGTCCTGCTGTT          | GCTGGTAGCCTACAGCAGAAGG   | 59    | 207     |
| Hsp90ab1 | GCTGGCTGAGGACAAGGAGA          | CGTCGGTTAGTGAATCTTCATG   | 59    | 175     |
| Dnmt1    | GTAGGAAGGCTACCTGGCTA          | ACAACCGTTGGCTTTTGTAG     | 60    | 97      |
| Dnmt3a   | CCTGCAATGACCTCTCCATT          | CAGGAGGCGGTAGAACTCAA     | 60    | 89      |
| Dnmt3b   | TGGTGATTGGTGGAAGCC            | AATGGACGGTTGTCGCC        | 60    | 145     |

За количественото определяне на експресията на таргетините ДНК участъци е използван математическият модел за относително количествено определяне на Real-Time PCR на Pfaffl. Определянето на експресионните нива и анализът на данните са извършени с помощта на Relative Expression Software Tool (REST) (Pfaffl, 2002).

### **III.2.5. Метод за изолиране на ДНК**

ДНК е изолирана от плаценти и ембриони чрез стандартна фенол-хлороформна екстракция.

### **III.2.6. Методи за получаване на стандарти за MS-HRM**

#### **III.2.6.1. Получаване на метилиран ДНК стандарт**

Напълно метилирана ДНК е получена с помощта на ензим CpG Methyltransferase M.SssI (Thermo Scientific).

#### **III.2.6.2. Получаване на неметилиран ДНК стандарт**

За получаванет на неметилиран ДНК стандарт е извършено цялостно геномно амплифициране на ДНК с кит GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) (Sigma). Финалните продукти от WGA са пречистени с GenElute PCR Clean-Up kit (Sigma).

### **III.2.7. Модифициране на ДНК чрез натриев бисулфит**

За конверсията е използван кит Imprint DNA Modification Kit (Sigma).

### **III.2.8. Метод за анализ на нивата на метилиране чрез метилационно-специфичен HRM (MS-HRM)**

#### **III.2.8.1. MS-HRM**

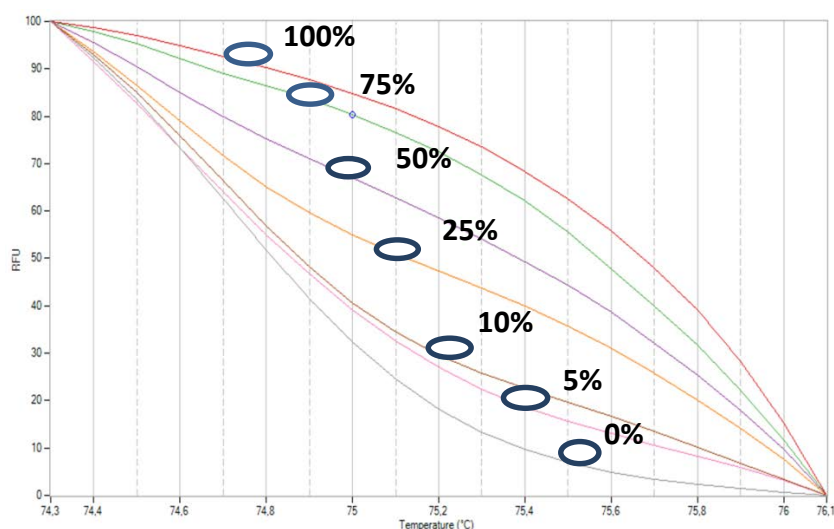
Анализът е извършен на Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR system, като е използван EpiTect HRM PCR Kit (100) (QIAGEN). Сквенциите и характеристиките за праймерите, използвани за MS-HRM, са представени в таблица 2.

**Таблица 2.** Последователности и характеристики на праймери, използвани при HRM PCR анализ.

| DMR     | Праймер FWD (5'-3')       | Праймер REV (5'-3')   | Ta/С° | СрG | Продукт | Амплифициран регион       |
|---------|---------------------------|-----------------------|-------|-----|---------|---------------------------|
| DMR 0   | GGACGAGGTGAGGGATAAAAG     | AATACCCGAACCTCCAAC    | 52    | 9   | 194     | GB-AY849920.1 (688-882)   |
| DMR 1   | TGGGTAGTTATATAGAGGAAG     | TAAAAAACAACAATCACAAC  | 53    | 4   | 238     | GB-AY849918.1 (444-684)   |
| DMR 2   | GGTATCGTGAAGAGTGTG        | AACCTCGTAATACCCCAAATC | 51    | 8   | 196     | GB-AY849922.1 (806-1002)  |
| DMR H19 | GATTTATAAGGGTTATGGGGTGGTA | ACAACGAACCCCAACCTATAC | 56    | 10  | 196     | GB-AY849916.1 (1788-1984) |

### III.2.8.2. Методи за детекция на нивото на метилиране при MS-HRM

За детекция на нивото на метилиране е създадена сравнителна интерполираща крива, като са използвани стандарти от метилирана и неметилирана ДНК в съотношение - 0%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100% (Фиг. 1).



**Фигура 1.** Криви на топене на стандарти за метилирана ДНК в диапазон 0-100%

### III.2.9. Статистически анализи

#### III.2.9.1. Корелационни зависимости

При анализа е тествана двустранната връзка между променливите - тегло на ембриони или плаценти и процент на метилиране на DMRs на *Igf2/H19*. Използвана е

непараметрична рангова корелация на Spearman's извършена с програмата SigmaPlot 12.5.

III.2.9.2. SPSS анализ за установяване на индиректен ефект чрез модел на медиация

За изчисляване на индиректен ефект е използван пакетът *PROCESS* на Andrew Hayes (*Preacher and Hayes, 2004*) и IBM SPSS Statistics 21.



## IV. РЕЗУЛТАТИ

### IV.1. Оптимизиране на среда за култивиране *in vitro*

#### IV.1.1. Оптимизиране на рН

Регулирането на рН на средата е от критично значение за процеса на култивиране. За създаване на необходимото рН е използвана газова смес с концентрация 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> и 90% N<sub>2</sub> (Penkov *et al.*, 1995). Експериментално се установи, че оптималното рН е приблизително 7.3 и е в границите 7.2-7.4.

#### IV.1.2. Оптимизиране на концентрацията на ЕДТА в средата

ЕДТА е аминокиселина, способна да се свързва с метални йони като цинк, мед, желязо и др. По този начин, металните йони остават в разтвора, но с намалена реактивоспособност, и не генерират вредните за клетките кислородни радикали (Halliwell and Gutteridge, 1984). Част от комерсиалните среди за култивиране *in vitro* съдържат ЕДТА, но оптималната и подбрана експериментално за опитите Р1 среда, не съдържа този компонент. Изследвани са различни концентрации в средата в границите между 0 и 500 µM/l ЕДТА, изложени в таблица 3.

**Таблица 3.** Влияние на различни концентрации ЕДТА върху ембрионалното развитие в предимплантационния период, от двуклетъчен стадий до бластоцист. Забележка: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

|                 |                |                       |                              | Процент изследвани ембриони развити на стадии: |                  |            |                 |
|-----------------|----------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------------------------|------------------|------------|-----------------|
| Обем среда (µl) | Обем ЕДТА (µl) | Моларност ЕДТА (µM/l) | Брой изследвани ембриони (n) | Двуклетъчни (%)                                | Осемклетъчни (%) | Морули (%) | Бластоцисти (%) |
| 500             | 0              | 0                     | 46                           | 100                                            | 97               | 91         | 89              |
| 497.5           | 2.5            | 5                     | 42                           | 100                                            | 97               | 92         | 90              |
| 495             | 5              | 10                    | 50                           | 100                                            | 98               | 94         | 93              |
| 475             | 25             | 50                    | 55                           | 100                                            | 98               | 97         | 97*             |
| 450             | 50             | 100                   | 47                           | 100                                            | 98               | 98         | 98*             |
| 400             | 100            | 200                   | 52                           | 100                                            | 96               | 89         | 85              |
| 250             | 250            | 500                   | 48                           | 100                                            | 81*              | 74**       | 68***           |

От морули до бластоцисти се развиват 100% от ембрионите само при дози от 50 и 100 µM/l, докато при всички други дози има намаление в развитието до стадий бластоцист. 100 µM/l е оптималната доза, способстваща за максималното развитие на ембрионите до стадий бластоцист от 98% (95-100%), при която има статистически

значим процент разлика ( $P < 0.05$ ). Освен увеличение на общия брой бластоцисти, след добавяне на ЕДТА в концентрации от 50 и 100  $\mu\text{M/l}$  се наблюдава увеличение на синхронността на делене и развитие, както и еднородност при ембрионите. Подобни резултати са отчетени и от други автори (Mehta, 1990).

## IV.2. Влияние на етанола върху развитието на бластоцисти, ембриони и плаценти след третиране на 3.5 ден

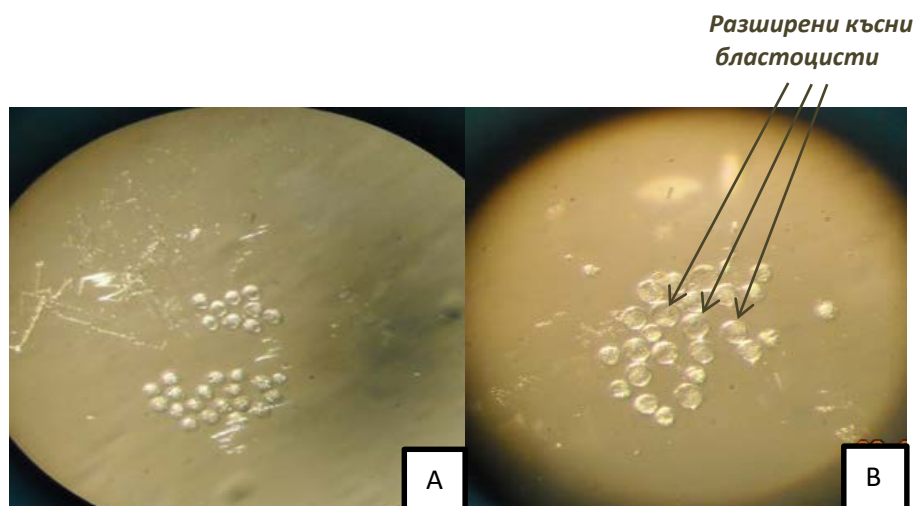
### IV.2.1. Влияние на етанола върху развитието на бластоцисти

Този анализ е насочен към изследване на влиянието на различни дози етанол и откриване на концентрация с най-висок стимулиращ ефект върху развитието на морули и на ранни бластоцисти до стадий късни бластоцисти (напълно разширени) в четвъртия ден от бременността за 4-часов инкубационен период (Таблица 4).

**Таблица 4.** Влияние на различни концентрации етанол върху развитието на бластоцисти, третирани за четири часа в четвъртия ден от бременността.

| Общо обем среда и ЕДТА ( $\mu\text{l}$ ) | Обем Етанол ( $\mu\text{l}$ ) | Процент Етанол в средата (v:v) | Брой изследвани ембриони (n) | Брой бластоцисти преди култивиране (%) | Брой бластоцисти след култивиране (%) | Разликата в броя бластоцисти преди и след култивиране (%) |
|------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 500                                      | 0                             | 0                              | 76                           | 51                                     | 61                                    | 10                                                        |
| 499.95                                   | 0.05                          | 0.01                           | 72                           | 50                                     | 59                                    | 9                                                         |
| 499.5                                    | 0.5                           | 0.1                            | 78                           | 41.3                                   | 58                                    | 16.7*                                                     |
| 499                                      | 1                             | 0.2                            | 65                           | 50                                     | 76                                    | 26**                                                      |
| 497.5                                    | 2.5                           | 0.5                            | 58                           | 58                                     | 70.2                                  | 12.2                                                      |
| 495                                      | 5                             | 1.0                            | 59                           | 48                                     | 52                                    | 4*                                                        |

Оптималната концентрация, при която е отбелязан най-висок стимулиращ ефект, е 0.2%, като се наблюдаваше увеличение на бластоцистите до 26% ( $p < 0.01$ ). При третираните с оптималната доза от 0.2% етанол, се наблюдаваха големи разширени бластоцисти, с прозрачен бластоцъл, стигнали до фаза на „излюпване“ (Фиг. 2). При нито една друга доза както и при контролите, не се наблюдаваха толкова напреднали в развитието си бластоцисти.



**Фигура 2.** Развитие на бластоцисти след култивиране за четири часа през четвъртия ден: контролни бластоцисти (А) и третиран с оптимална доза от 0.2% етанол (В).

#### ***IV.2.2. Влияние на етанола върху развитието на ембриони и плаценти, получени от трансплантирани бластоцисти, третиран с доза 0.2% в условия in vitro***

##### **IV.2.2.1. Сомитен стадий, общо състояние и тегло**

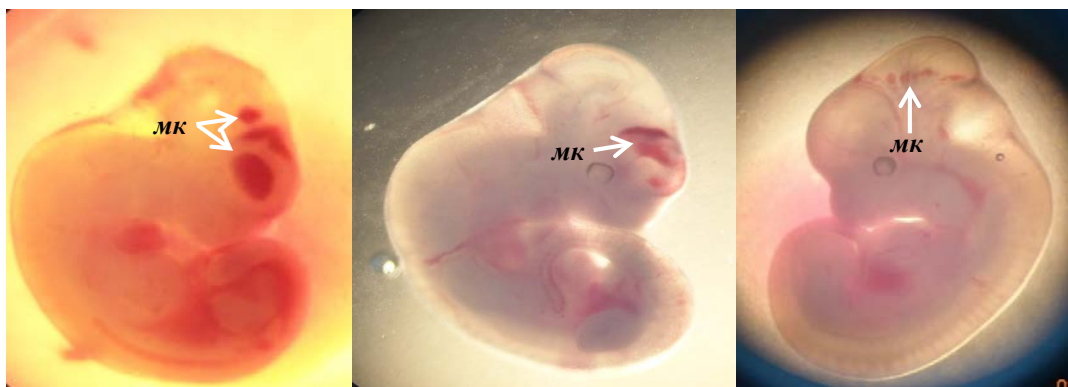
Бяха инициирани три успешни бременности след трансплантации на бластоцисти, третиран с 0.2% етанол. От общо 18 трансплантирани бластоцисти, на 11.5 дрс се наблюдаваха общо 11 броя развити ембриони и плаценти (от които 10 броя са използвани за анализ) и пет децидуа без развили се ембриони. Общото състояние и външният вид на трансплантираните ембриони не се различаваха от контролните. Сомитният стадий на ембрионите варираше приблизително в границите 28-38 сомита. При теглото на ембрионите, както и на плацентите имаше слабо, статистически незначимо намаление спрямо контролите. Средното тегло на ембрионите ( $\pm$ SEM) е  $48.6 \pm 2.94$  mg ( $p < 0.3$ ), като варира в границите 44.6-50.9 mg (Фиг. 4). Средното тегло на плацентите е  $33.6 \pm 3.32$  mg, като варира в границите 30-37.2 mg ( $p < 0.4$ ) (Фиг. 5).

#### ***IV.2.3. Влияние на етанола върху развитието на ембриони и плаценти, получени след третиране in vivo с дози от 2.9 и 5.8 g/kg***

##### **IV.2.3.1. Сомитен стадий и общо състояние на ембрионите**

Мишите ембриони са събрани от контролните и третираните с етанол бременни самки на фаза 11.5 дрс. Ембрионите, изложени в утробата на етанол, при по-висока доза от 5.8 g/kg достигат приблизително 16-37 сомитен стадий, за разлика от контролите и

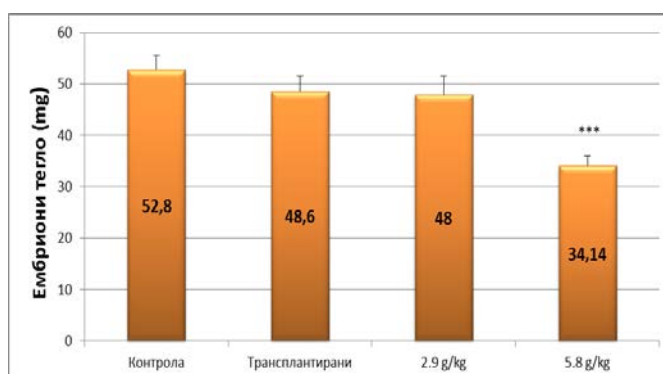
ембрионите, третирани с 2.9 g/kg етанол, които се развиват до 25-40 сомитен стадий. Контролните ембриони и третираните с ниската доза от 2.9 g/kg етанол имаха сходен външен вид, без видими различия. Разлики бяха отчетени при групата ембриони, третирани с високата доза 5.8 g/kg етанол. При част от ембрионите се наблюдаваха лицево-черепни аномалии и асиметричност в части на тялото. При 14.6% от ембрионите имаше наличие на вътрешни кръвоизливи, в по-голямата си част разположени в областта на главата (Фиг. 3).



**Фигура 3.** Ембриони на 11.5 ден след третиране с 5.8 g/kg етанол. Белите стрелки отбелязват мозъчни кръвоизливи (МК).

#### IV.2.3.2. Тегло на ембрионите

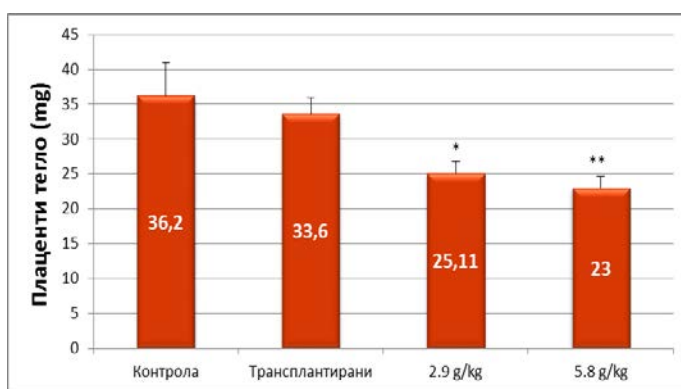
Теглото на ембрионите на 11.5 гестационен ден беше както следва: за нетретираната контролна група средното ембрионално тегло е  $52.8 \pm 2.71$  mg, като теглото на ембрионите варира в границите 40.3-68.0 mg. Средното тегло на ембрионите, третирани с ниска доза (2.9 g/kg), е  $48.6 \pm 3.54$  mg ( $P < 0.5$ ), като теглото на ембрионите варира в границите от 41.0 до 63.0 mg. За етанол-третираните с високата доза от 5.8 g/kg е  $34.14 \pm 1.78$  mg ( $p < 0.001$ ). Теглото на ембрионите, третирани с високата доза от 5.8 g/kg, варира в границите 16.0-42.0 mg (Фиг. 4). Изоставащи в растежа и развитието си ембриони с плаценти, сравнени с нормален ембрион с плацента, са показани на фиг. 6.



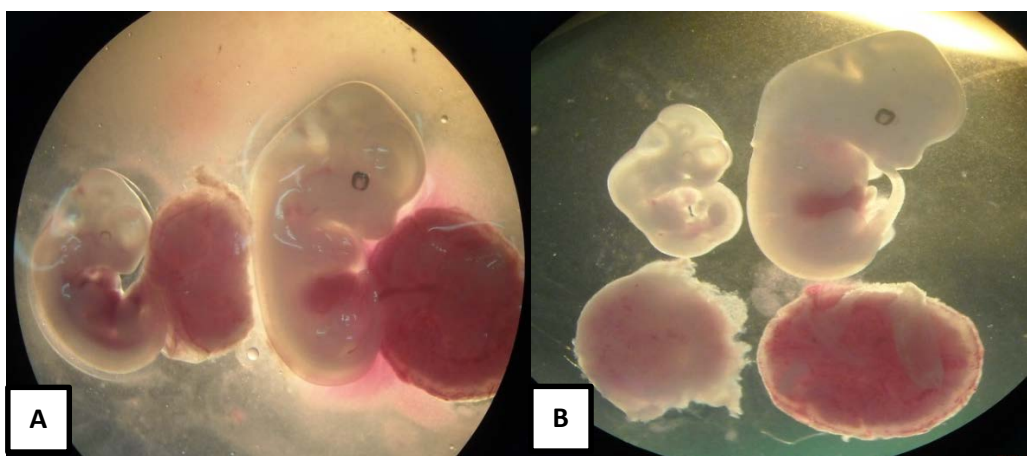
**Фигура 4.** Тегло на ембрионите (mg) на 11.5 ден, след третиране с етанол през четвъртия ден.

#### IV.2.3.3. Тегло на плацентите

Теглото на плацентите на 11.5 ден от бременността е както следва: за нетретираната контролна група средното плацентно тегло е  $36.2 \pm 4.7$  mg, като теглото на плацентите варира в границите 20.4-58.0 mg. Средното тегло на плацентите от ембриони, третирани с ниската доза от 2.9 g/kg е  $25.11 \pm 1.7$  mg ( $p < 0.05$ ), като теглото на плацентите варира в границите 16.0-36.0 mg. При третираните с високата доза от 5.8 g/kg е  $23.0 \pm 1.6$  mg ( $p < 0.01$ ). Теглото на плацентите варираше в границите 9.2-28.0 mg (Фиг. 5).



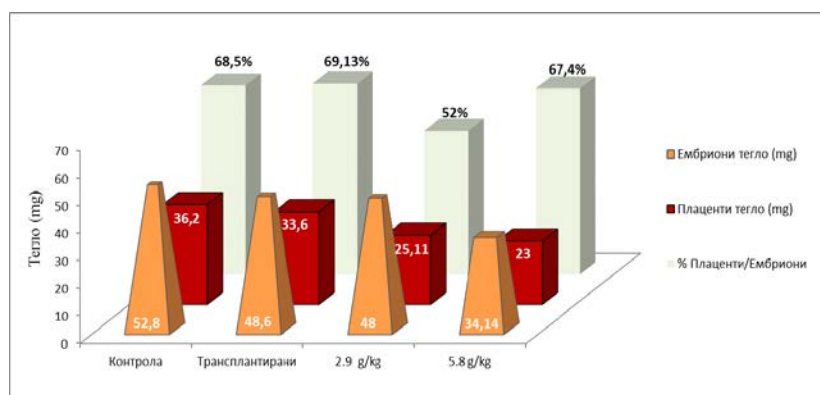
**Фигура 5.** Тегло на плацентите (mg) на 11.5 ден, след третиране с етанол през четвъртия ден.



**Фигура 6.** Ембриони с плаценти на 11.5 ден. В лявата част на (А) и (В) са разположени третирани с 5.8 g/kg етанол ембриони с плаценти, в дясната част е нормален ембрион с плацента. На (В) ясно се отличава по-слабо кръвоснабдената плацента на третирания ембрион с изоставащо развитие.

#### IV.2.4. Съотношение между тегло на ембриона и неговата плацента

След третиране с етанол съотношението между теглото на ембриона и неговата плацента се променяше при някои дози, както е илюстрирано на фиг. 7.



**Фигура 7.** Съотношение между тегло на ембриона и неговата плацента (в проценти) на 11.5 ден.

#### ***IV.2.5. Процент на ембрионална резорбция (децидуа без развили се ембриони)***

След третиране с етанол, нивата на резорбция бяха увеличени значително. При женските, третирани с 2.9 g/kg, имаше 6-кратно повишение на нивото на резорбция, което представлява приблизително 64.05% ( $p < 0.001$ ). При по-висока доза от 5.8 g/kg, резорбцията е увеличена 7 пъти, приблизително 71.8% ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 8). Резорбцията или броя на децидуа без развили се ембриони при нетретирани контролни самки беше приблизително 10.8%.



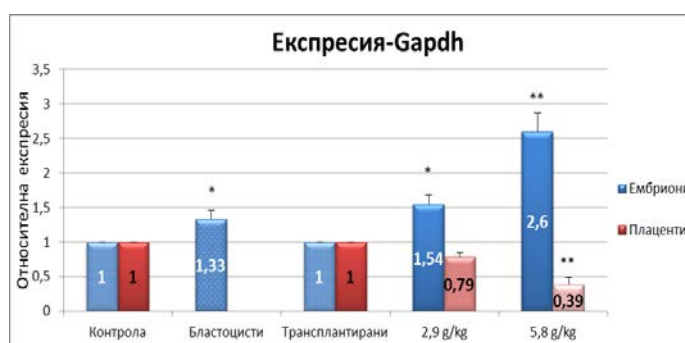
**Фигура 8.** Съотношение между нормални ембриони и децидуа без развили се ембриони (в проценти) на 11.5 ден при нетретираната група самки, и при третираните с различни дози етанол на четвъртия ден.

### IV.3. Real-Time PCR анализ на експресивните нива на гени след въздействие с етанол

#### IV.3.1. Анализ на експресията на референтни гени *Gapdh* и *ActB*

##### IV.3.1.1. Експресия на *Gapdh*

Първоначално Real-Time PCR анализите в дисертационния труд започнаха с използването на *Gapdh* за референтен ген, който е широко използван като ендегенен стандарт и най-често употребяван при експерименти с етанол. Промяна в експресивните нива беше отчетена във всички експериментални групи, с изключение на трансплантираните ембриони и техните плаценти. При бластоцистите беше отчетено статистически значимо повишение на експресията с  $1.33 \pm 0.12$  ( $p < 0.05$ ). Ниската доза от 2.9 g/kg в ембрионите доведе до увеличаване на експресията на 11.5 гестационен ден с  $1.54 \pm 0.14$  ( $p < 0.05$ ), а при техните плаценти доведе до статистически незначимо намаление в експресията до  $0.79 \pm 0.05$  ( $p < 0.07$ ). Високата доза от 5.8 g/kg повлия по подобен начин експресията, но в по-силна степен: при ембрионите се отчете средно повишение с  $2.6 \pm 0.27$  ( $p < 0.01$ ), а при техните плаценти имаше намаление до  $0.39 \pm 0.1$  ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 9).



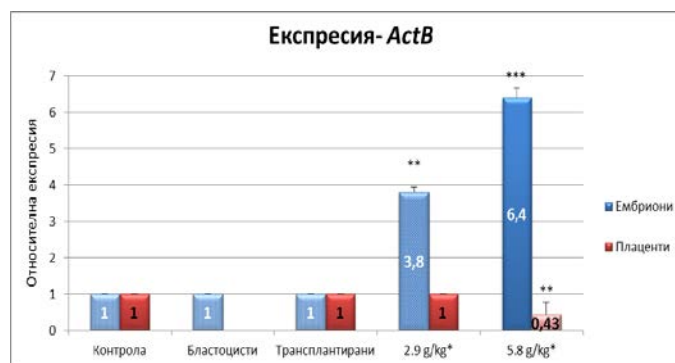
**Фигура 9.** Сравнителна характеристика на експресията на референтен ген *Gapdh* в бластоцисти, ембриони и плаценти след третиране с етанол през четвъртия ден.

##### IV.3.1.2. Експресия на *ActB*

Следващият тестван референтен ген, който по литературни данни е често използван в Real-Time PCR анализите, е *ActB*. Генът показва много по-стабилни експресионни нива след въздействие с етанол. Въпреки това беше отчетено статистически значимо отклонение в експресията при 22.2% от ембрионите, като при ниската доза от 2.9 g/kg етанол експресията се увеличаваше на 11.5 гестационен ден с  $3.8 \pm 0.14$  ( $p < 0.01$ ). Високата доза от 5.8 g/kg индуцира най-голямото отчетено отклонение спрямо контролата

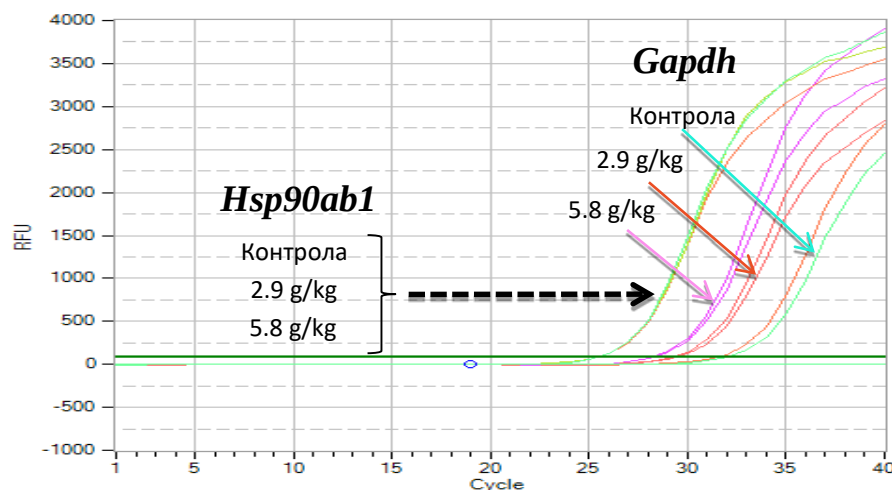


( $6.4 \pm 0.26$ ) приблизително при същия процент ембриони ( $p < 0.001$ ). При 20% от плацентите е регистрирано отклонение единствено след въздействие с 5.8 g/kg етанол, като експресията е намалена до  $0.43 \pm 0.34$  ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 10). Всички тези резултати дадоха основание за изключването от анализите и на *ActB* като референтен ген и въвеждането на два нови референтни гена - *Atp5b* и *Hsp90ab*.



**Фигура 10.** Сравнителна характеристика на експресията на референтен ген *ActB* в бластоцисти, ембриони и плаценти след третиране с етанол през четвъртия ден.

*Atp5b* и *Hsp90ab* показаха стабилна експресия във всички изследвани групи и бяха паралелно използвани при всички анализи на дисертационната работа (Фиг. 11).



**Фигура 11.** Сравнителна характеристика на амплификационните криви на референтните гени *Hsp90ab1* и *Gapdh* при нетретирани и третирани с 2.9 g/kg и 5.8 g/kg ембриони на 11.5 ден от бременността.

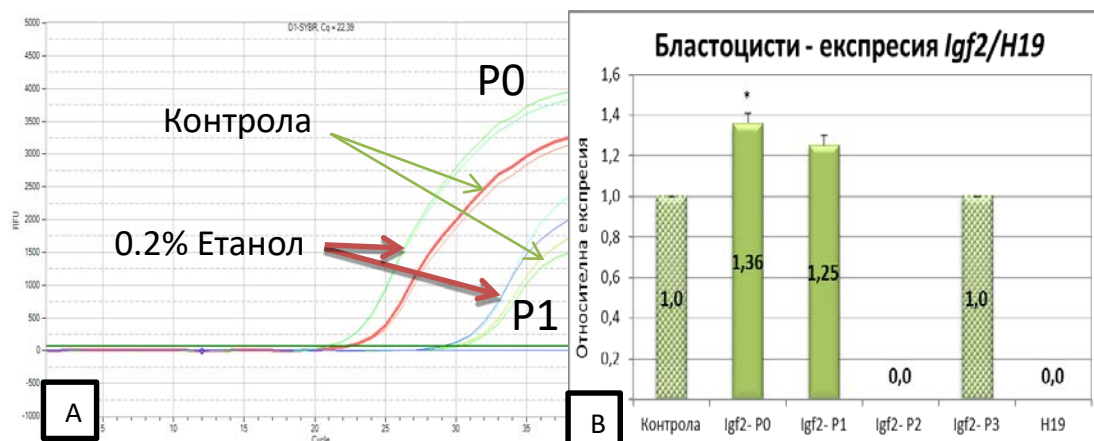
#### IV.3.2. Анализ на експресията на *Igf2/H19* локус

##### IV.3.2.1. Експресия в бластоцисти след третиране с 0.2% етанол

Получените данни показаха, че експресията на мРНК на *Igf2-P0* в третирани с етанол бластоцисти се повишава с  $1.36 \pm 0.1$  ( $p < 0.05$ ) спрямо контролните. Експресията



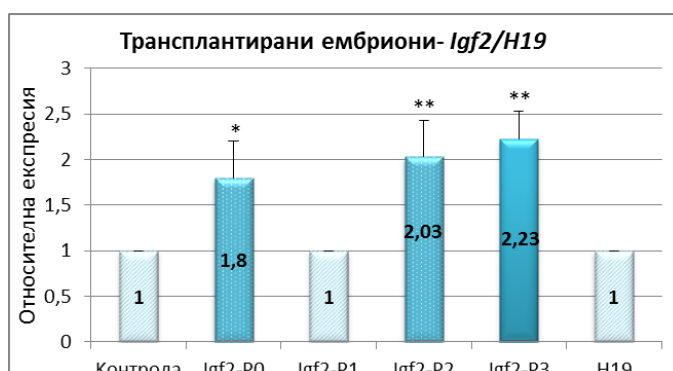
на *Igf2*-P1 се повишава с  $1.25 \pm 0.12$  ( $p < 0.08$ ) (Фиг. 12). При анализа нямаше детекция на експресия на *H19* нито при контролите, нито при третираните бластоцисти.



**Фигура 12.** На схема (А) са показани амплификационните криви на промотори P0 и P1 при нетретиран и третиран бластоцисти. На (В) е показана сравнителна характеристика на експресията на промоторите на *Igf2* и *H19* след третиране на бластоцисти с 0.2% етанол.

IV.3.2.2. Експресия в ембриони, получени от трансплантирани бластоцисти, третиран с 0.2% етанол

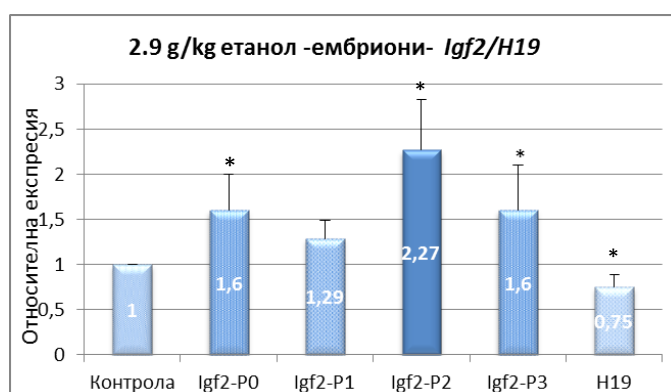
Експресията на промоторите на *Igf2* се променя на 11.5 гестационен ден както следва: P0 показва увеличение на експресията спрямо контролата с  $1.8 \pm 0.6$  ( $p < 0.05$ ). При P1 не е установена разлика с контролите. Промотор P2 показва увеличение спрямо контролата с  $2.03 \pm 0.6$  ( $p < 0.01$ ). Последният промотор на *Igf2*-P3 показва най-голямо повишение в нивата на експресия с  $2.23 \pm 0.14$  ( $p < 0.01$ ). При експресията на *H19* не беше отчетена никаква промяна спрямо контролата (Фиг. 13).



**Фигура 13.** Сравнителна характеристика на експресията на промотори P0, P1, P2 и P3 на *Igf2* и *H19* в ембриони на 11.5 ден, получени от трансплантирани бластоцисти, третиран с 0.2% етанол.

IV.3.2.3. Експресия в ембриони след третиране с 2.9 g/kg етанол

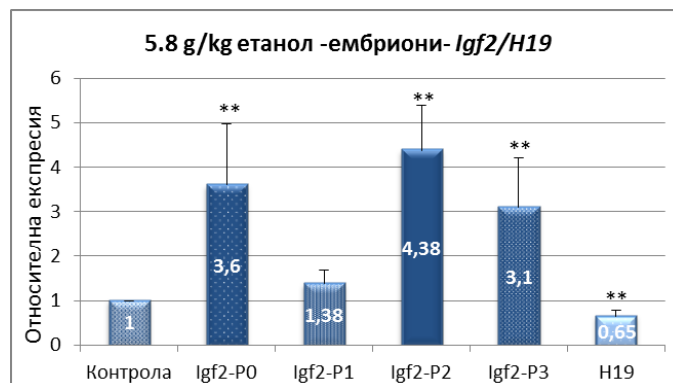
При доза от 2.9 g/kg етанол се установиха следните нива на експресия при промоторите на *Igf2* на 11.5 гестационен ден: при промотор P0 експресията се повишава с  $1.6 \pm 0.4$  ( $p < 0.05$ ) спрямо контролата; промотор P1 показва тенденция към повишаване на експресията с  $1.29 \pm 0.2$  ( $p < 0.4$ ), но това повишение е статистически незначимо; при промотор P2 се отчита статистически значимо увеличение на експресията с  $2.27 \pm 0.56$  ( $p < 0.05$ ); при промотор P3 увеличението е с  $1.6 \pm 0.5$  ( $p < 0.05$ ). При *H19* беше отчетено намаление в нивото на експресия с  $0.75 \pm 0.14$  спрямо контролата ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 14).



**Фигура 14.** Сравнителна характеристика на експресията на промотори P0, P1, P2 и P3 на *Igf2* и *H19* в ембриони на 11.5 ден след третиране с 2.9 g/kg етанол.

#### IV.3.2.4. Експресия в ембриони след третиране с 5.8 g/kg етанол

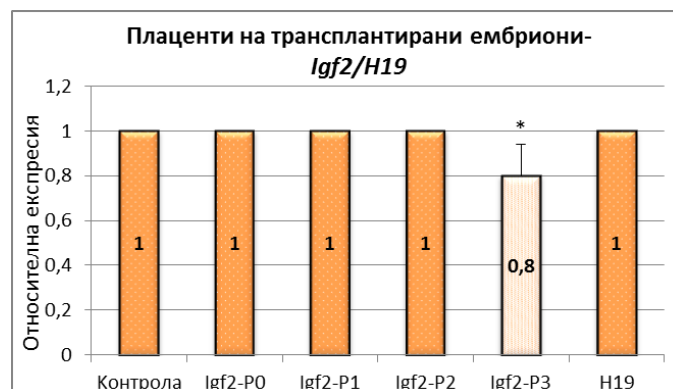
Високата доза от 5.8 g/kg етанол оказва въздействие върху нивата на експресия на всички промотори от локуса на 11.5 гестационен ден. P0 е промотор, който е свързан и се експресира основно в плацентата. На четвъртия ден се установява слаба експресия в ембриона, която е с по-ниски нива от тази на останалите три промотора, но след излагане на високата доза от 5.8 g/kg експресията на промотора се повишава с  $3.6 \pm 1.37$  ( $p < 0.01$ ). При P1 аналогично се наблюдаваше тенденция към увеличение на експресията, но статистически незначимо ( $1.38 \pm 0.3$ ) ( $p < 0.07$ ). Тази доза, инжектирана на 4 ден от бременността, показва най-силен ефект върху експресията на P2 и P3 промотори на *Igf2* ген. P2 показва най-силно увеличение на експресията от всички промотори, спрямо контролите ( $4.38 \pm 1$ ) ( $p < 0.01$ ). При P3 се отбелязва статистически значимо увеличение с  $3.1 \pm 1.1$  ( $p < 0.01$ ). При експресията на *H19* отново беше отчетен обратен ефект, като експресията се намалява до  $0.65 \pm 0.12$  ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 15).



**Фигура 15.** Сравнителна характеристика на експресията на промотори P0, P1, P2 и P3 на *Igf2* и *H19* в ембриони на 11.5 ден след третиране с 5.8 g/kg етанол.

IV.3.2.5. Експресия в плаценти на ембриони, получени от трансплантирани бластоцисти, третирани с 0.2% етанол

Анализът на експресията на промоторите на *Igf2* не показва никакво отклонение в експресионните нива спрямо контролите в плацентите, с изключение на промотор P3, при който беше отчетено статистически значимо намаление с  $0.8 \pm 0.14$  ( $p < 0.05$ ). При *H19* експресията също беше непроменена (Фиг. 16).

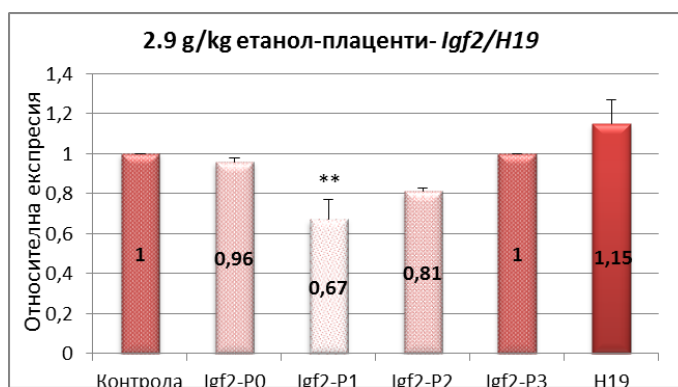


**Фигура 16.** Сравнителна характеристика на експресията на промотори P0, P1, P2 и P3 на *Igf2* и *H19* в плаценти на ембриони на 11.5 ден, получени от трансплантирани бластоцисти, третирани с 0.2% етанол.

IV.3.2.6. Експресия в плаценти след третиране с 2.9 g/kg етанол

Ниската доза от 2.9 g/kg етанол промени експресионните нива на локуса на 11.5 гестационен ден както следва: промотор P0 показва тенденция към намаляване на експресията, но статистически незначимо с  $0.96 \pm 0.02$  ( $p < 0.4$ ); P1 беше промоторът, при

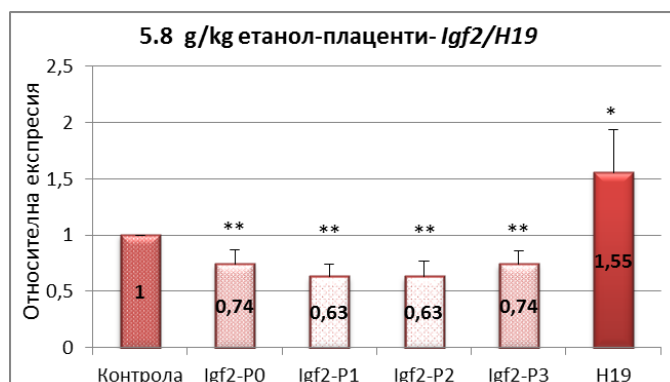
който имаше най-силно намаление в експресията, както спрямо контролите, така и спрямо останалите три промотора на *Igf2* (с  $0.67 \pm 0.1$ ) ( $p < 0.01$ ); при P2 също имаше тенденция към намаляване на експресията, но статистически незначимо с ( $0.81 \pm 0.02$ ) ( $p < 0.08$ ); P3 промотор показва експресионни нива, еднакви с контролите. При *H19* се наблюдаваше тенденция към увеличение на експресията, но отново статистически незначимо (с  $1.15 \pm 0.12$ ) ( $p < 0.3$ ) (Фиг. 17).



**Фигура 17.** Сравнителна характеристика на експресията на промотори P0, P1, P2 и P3 на *Igf2* и *H19* в плаценти на ембриони на 11.5 ден след третиране с 2.9 g/kg етанол.

#### IV.3.2.7. Експресия в плаценти след третиране с 5.8 g/kg етанол

При високата доза от 5.8 g/kg етanol е установена статистически значима промяна в експресията на промоторите на целия locus на 11.5 гестационен ден. При промотор P0 на *Igf2* се наблюдаваше намаление в експресионните нива до  $0.74 \pm 0.13$  ( $p < 0.01$ ). Нивото на експресия на промотор P1 показва значимо намаление до  $0.63 \pm 0.11$  ( $p < 0.01$ ). Подобно намаление до  $0.63 \pm 0.14$  ( $p < 0.01$ ) беше установено и за промотор P2. За промотор P3 отчетеното намаление беше  $0.74 \pm 0.12$  ( $p < 0.01$ ), докато при за експресията на *H19* беше отчетено статистически значимо повишение с  $1.55 \pm 0.39$  ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 18).

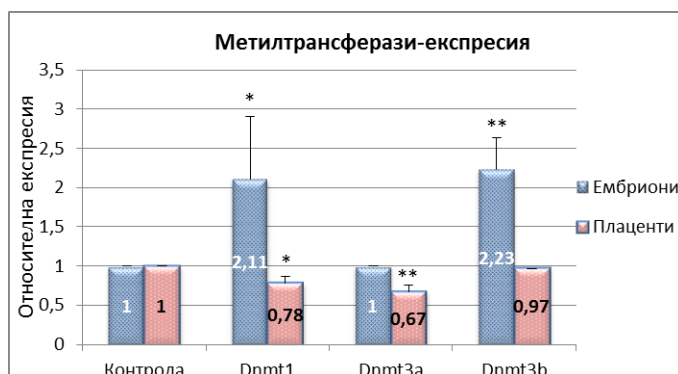


**Фигура 18.** Сравнителна характеристика на експресията на промотори P0, P1, P2 и P3 на *Igf2* и *H19* в плаценти на ембриони на 11.5 ден след третиране с 5.8 g/kg етанол.

#### IV.3.3. Анализ на експресията на метилтрансферази *Dnmt1*, *Dnmt3a* и *Dnmt3b*

Анализите показаха, че дозата от 5.8 g/kg етанол, приложена на четвъртия ден, променя нивата на експресия на метилтрансферазите на 11.5 гестационен ден по различен начин в ембрионите и плацентите. В ембрионите беше установено статистическо значимо увеличение на експресията на метилтрансферази *Dnmt1* с  $2.11 \pm 0.8$  ( $p < 0.05$ ) и на *Dnmt3b* с  $2.23 \pm 0.4$  ( $p < 0.01$ ), докато при метилтрансфераза *Dnmt3a* не беше отчетена промяна.

Нивата на *Dnmt1* в плацентите отново показаха промяна, изразяваща се в намаление до  $0.78 \pm 0.08$  ( $p < 0.05$ ). За разлика от ембрионите, установено е изменение при *Dnmt3a*, като експресията беше намалена до  $0.67 \pm 0.08$  ( $p < 0.01$ ). Съвсем слаба, статистически незначима тенденция към намаляване на нивата беше отчетена за *Dnmt3b* ( $0.97 \pm 0.01$ ) ( $p < 0.8$ ) (Фиг. 19).



**Фигура 19.** Сравнителна характеристика на експресията на метилтрансферазите *Dnmt1*, *Dnmt3a* и *Dnmt3b* в ембриони и плаценти след третиране с 5.8 g/kg етанол през четвъртия ден.

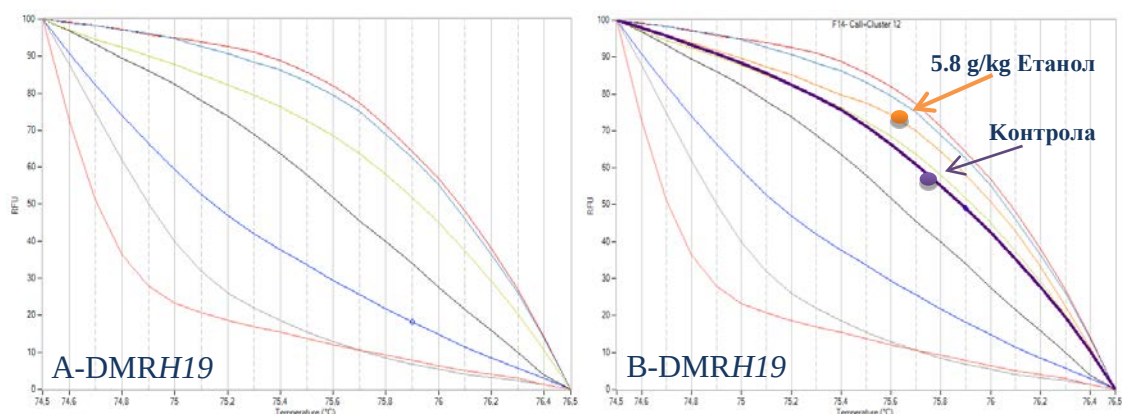
#### IV.4. Анализ на метилационен статус с MS-HRM

##### IV.4.1. Метилационен статус на импринтиран локус *Igf2/H19*

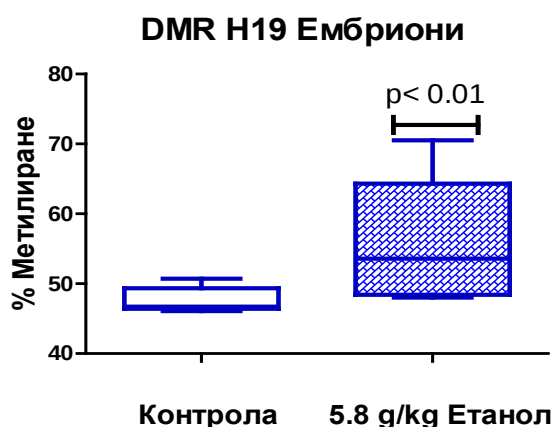
Изследван е статус на всичките четири диференциално метилирани района на локус *Igf2/H19* - DMR0, DMR1, DMR2 и DMRH19 в ембриони и в техните плаценти на 12-ти ден (11.5 dpc) след инжектиране с 5.8g/kg етанол на 4-ти ден (3.5 dpc) от бременността. За анализа са използвани 5 контроли и 15 третирани ембриона и техните плаценти.

##### IV.4.1.1. Промяна в метилирането на *Igf2/H19* локус в ембриони

При ембрионите в изследваните участъци от диференциално метилираните райони на локус *Igf2/H19* беше отчетена промяна в метилационния статус на *DMRH19*. Контролните ембриони показаха средна стойност на метилиране  $47.64 \pm 0.82\%$ , като варираше в границите 46.1-50.7%. При третираните ембриони средната стойност беше  $56.63 \pm 2.2\%$ , като варираше в границите 48.0-70.5% (Фиг. 20). Отчетено беше повишение в нивото на метилиране средно с 9.0% ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 21). При останалите три DMRs не беше отчетена никаква промяна в статуса спрямо контролните ембриони.



**Фигура 20.** Нормализирани данни от HRM за *DMRH19*: метилационен стандарт в диапазон на метилиране 0-100% (A); метилационен стандарт с включени криви на топене на контрола и ембрион, третиран с 5.8 g/kg етанол (B).

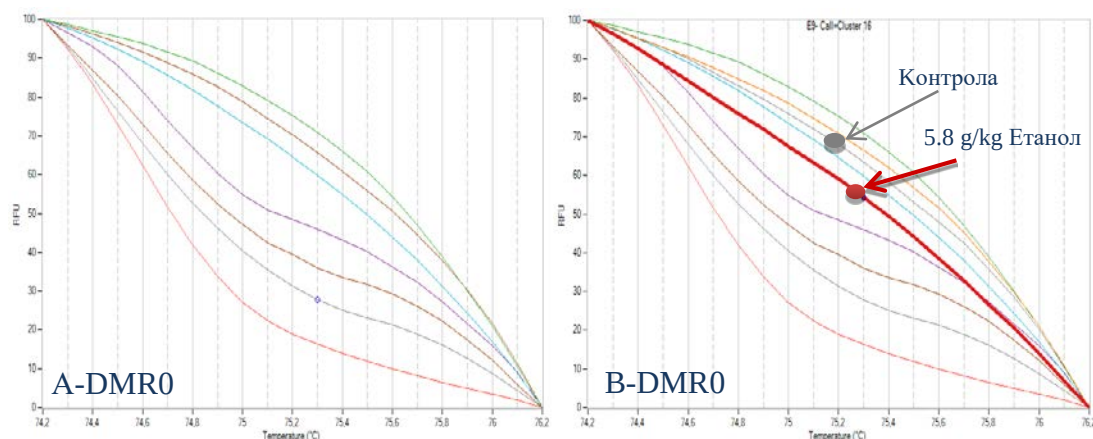


**Фигура 21.** Сравнителна характеристика на нивата на метилиране на *DMRH19* в нетретиран и третиран с 5.8 g/kg етанол ембриони.

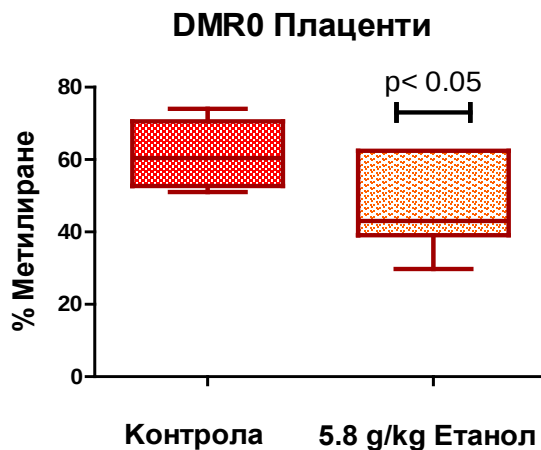
#### IV.4.1.2. Промяна в метилирането на *Igf2/H19* локус в плаценти

Анализът на четирите DMRs на импринтирания локус при плаценти показаха промяна в метилационния статус на *DMR0* и *DMRH19*. При *DMR0* беше отчетена средна

стойност на метилиране в контролните плаценти  $59.75 \pm 3.4\%$ , като се наблюдаваше вариабилност в границите 51.0-73.2%. За третираните плаценти отчетената средна стойност беше  $44.2 \pm 4.2\%$ , варирайки в границите 29.8-62.4% (Фиг. 22). Отчетено беше намаление в нивото на метилиране средно с 15.55% ( $p < 0.02$ ) (Фиг. 23).



**Фигура 22.** Нормализирани данни от HRM анализ за DMR0: метилационен стандарт в диапазон на метилиране 0-100% (A); метилационен стандарт с включени криви на топене на плаценти от контролен и третиран с 5.8 g/kg ембрион (B).

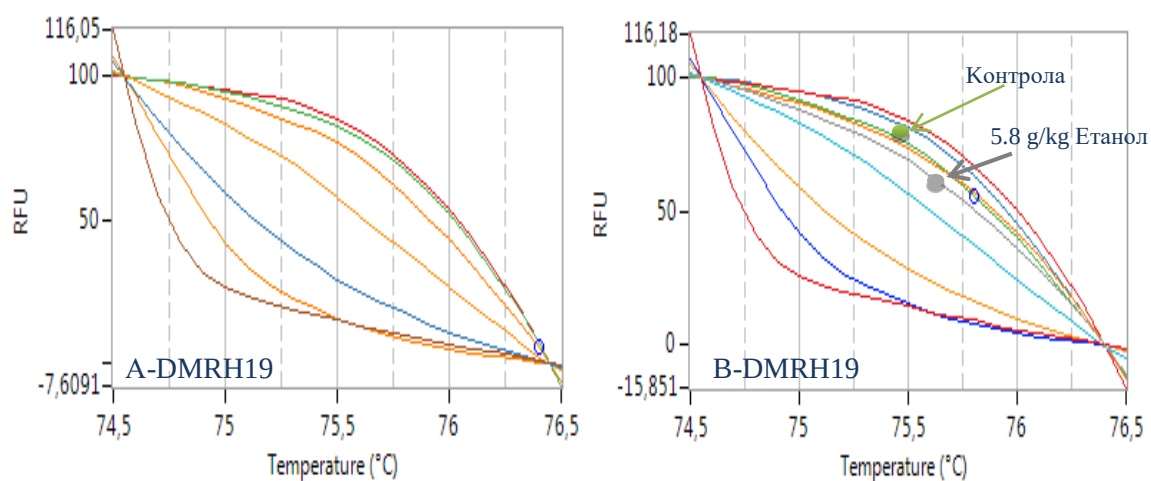


**Фигура 23.** Сравнителна характеристика на нивата на метилиране в DMR0 в плаценти на нетретиран и третиран с 5.8 g/kg етанол ембриони.

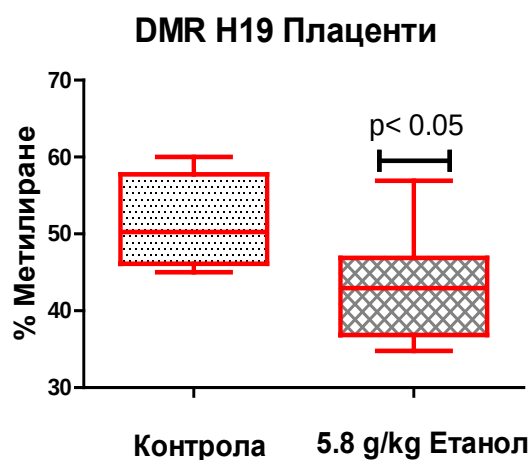
При DMRH19 беше отчетена средна стойност на метилиране в контролните плаценти  $50.3 \pm 2.8\%$ , като варираше в границите 45.6-60%. При третираните плаценти средната стойност беше  $42.8 \pm 1.86\%$ , като варираше в границите 34.8-56.9% (Фиг. 24). Отчетено беше намаление в нивото на метилиране средно със 7.5% ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 25).



При DMR1 и DMR2 не беше установена никаква разлика в метилирането спрямо контролните плаценти (Фиг. 26).

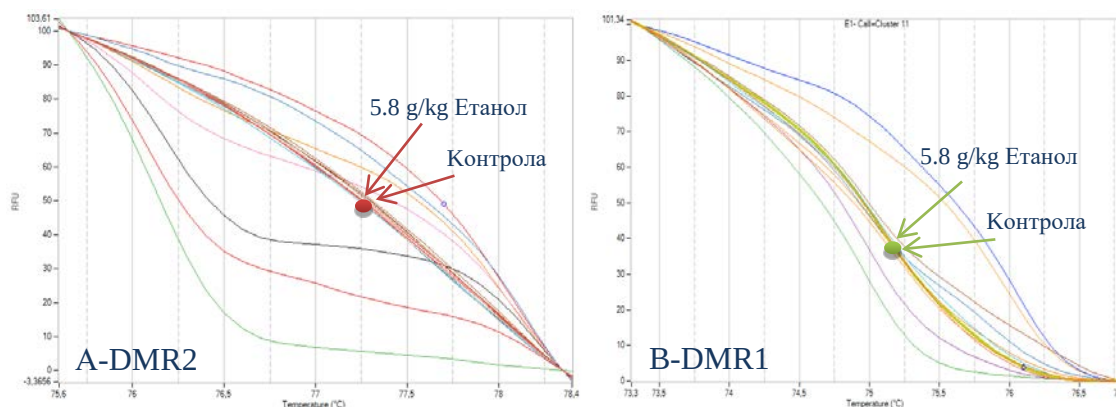


**Фигура 24.** Нормализирани данни от HRM анализ за *DMRH19*: метилационен стандарт в диапазон на метилиране 0-100% (А); метилационен стандарт с включени криви на топене на плаценти от контролен и третиран с 5.8 g/kg ембрион (В).



**Фигура 25.** Сравнителна характеристика на нивата на метилиране в *DMRH19* в плаценти на нетретирани и третирани с 5.8 g/kg етанол ембриони.





**Фигура 26.** Нормализирани данни от HRM анализ на метилационни стандарти в диапазон на метилиране 0-100% с включени криви на топене на контроли и третирани с 5.8 g/kg плаценти за DMR2 (A) и DMR1 (B).

## IV.5. Статистически анализи на резултатите

### IV.5.1. Корелационни зависимости

IV.5.1.1. Корелационна зависимост между тегло на ембриони и плаценти, и етанол

-Зависимост между теглото на ембрионите и етанол

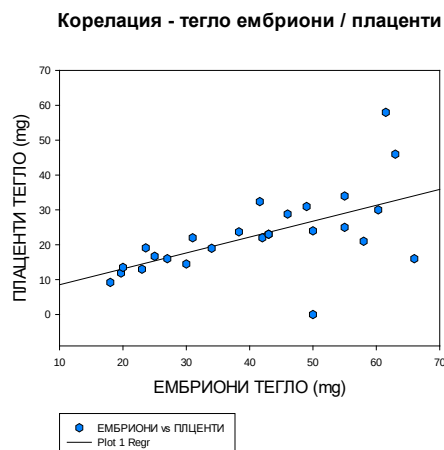
Корелацията е отрицателна, Spearman  $r = -.676$  с приблизително Гаусоново разпределение, статистически значима ( $p < 0.001$ ). 95% confidence interval  $-.846$  до  $-.381$

-Зависимост между теглото на плацентите и етанол

Корелацията е отрицателна, Spearman  $r = -.509$  с приблизително Гаусоново разпределение, статистически значима ( $p < 0.001$ ). 95% confidence interval  $-.754$  до  $-.139$

IV.5.1.2. Корелационна зависимост между теглото на ембрионите и техните плаценти

Корелацията е положителна, Spearman  $r = .546$  с приблизително Гаусоново разпределение, статистически значима ( $p < 0.001$ ). 95% confidence interval  $.351$  до  $.836$  (Фиг. 27).

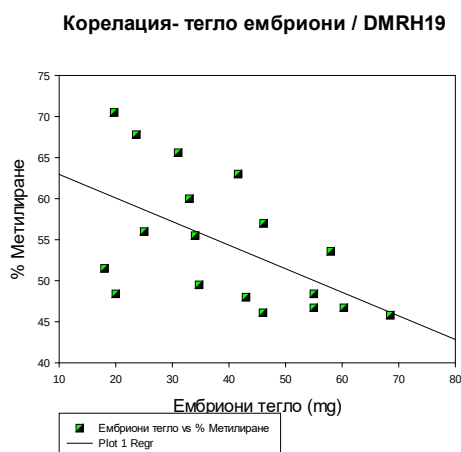


**Фигура 27.** Корелационни зависимости между променливите ембрионално тегло и плацентно тегло.

IV.5.1.3. Корелационна зависимост между теглото на ембриони и плаценти, и метилирането на DMRs на *Igf2/H19* локус

*Ембриони* - корелация между тегло и % метилиране на *DMRH19*

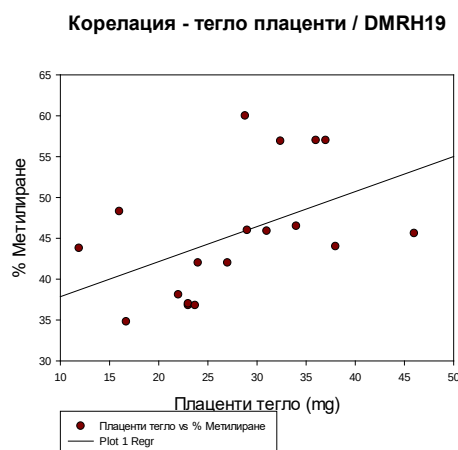
Отрицателна корелация, Spearman  $r = -.668$  с приблизително Гаусоново разпределение, статистически значима ( $p < 0.01$ ). 95% confidence interval  $-.883$  до  $-.220$  (Фиг. 28).



**Фигура 28.** Корелационни зависимости между променливите ембрионално тегло и процент метилиране на *DMRH19* в ембриони.

*Плаценти* - корелация между тегло и % метилиране на *DMRH19*

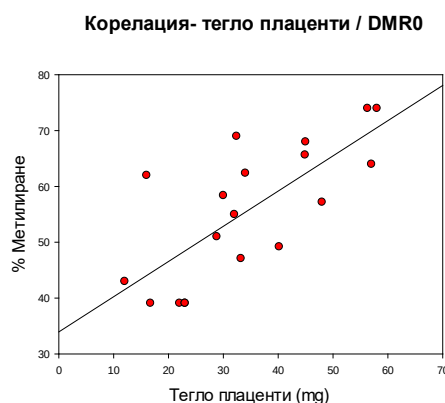
Положителна корелация, Spearman  $r = .395$  статистически незначима ( $p < 0.1$ ). 95% confidence interval  $.250$  до  $.797$  (Фиг. 29).



**Фигура 29.** Корелационни зависимости между променливите плацентно тегло и процент метилиране на DMRH19 в плаценти.

#### *Плаценти - корелация между тегло и % метилиране на DMR0*

Положителна корелация, Spearman  $r = .713$  с приблизително Гаусоново разпределение, статистически значима ( $p < 0.004$ ). 95% confidence interval .217 до .916 (Фиг. 30).



**Фигура 30.** Корелационни зависимости между променливите плацентно тегло и процент метилиране на DMR0 в плаценти.

Коефициентът на корелация на Spearman измерва силата и посоката на връзката между две променливи, но не дава информация за причинно-следствената връзка между променливите величини, което наложи въвеждането на метод за изчисление на частичната корелация или медиаторен ефект.

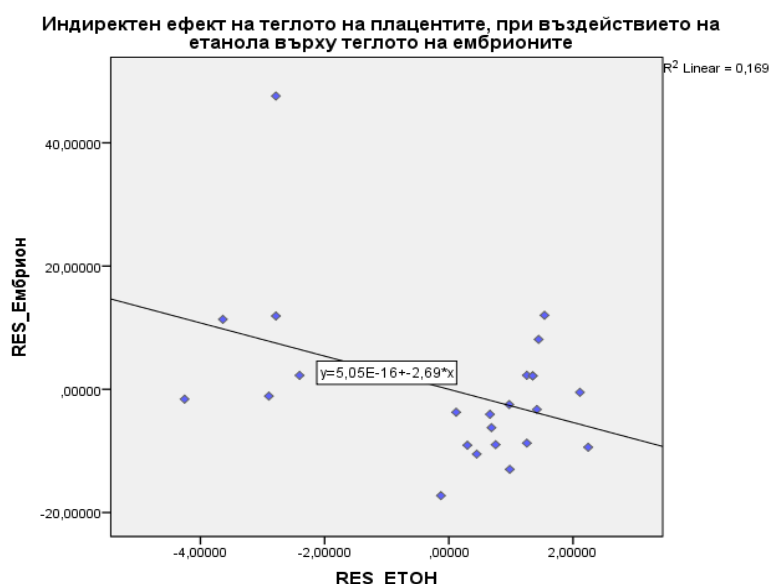
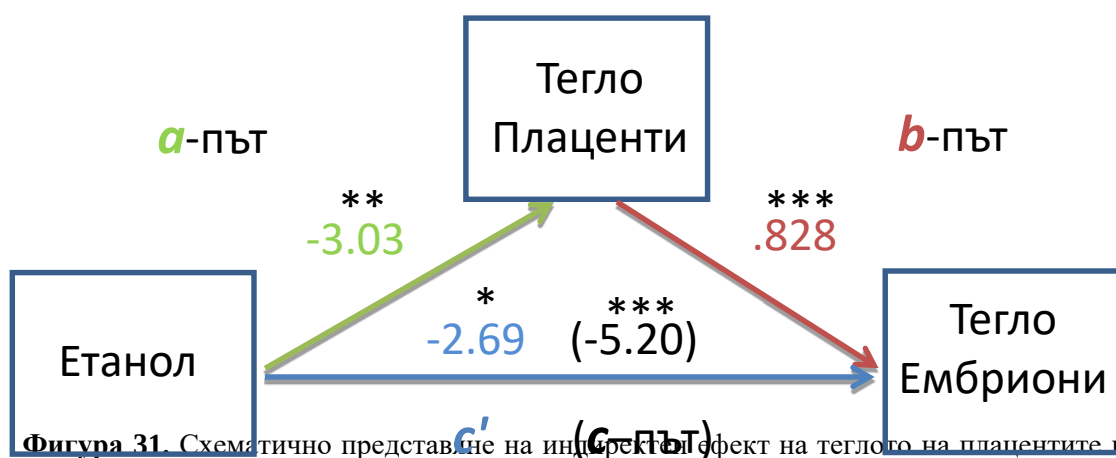
#### **IV.5.2. SPSS анализ за установяване на индиректен ефект**

Чрез този анализ се дава отговор на основния въпрос в модела на медиация - дали (или не), тоталният ефект на  $X$  върху  $Y$  статистически значимо се редуцира при добавяне

на медиатора  $M$  в модела. Този анализ е приложен към променливите, при които е открита статистически значима корелационна зависимост.

#### IV.5.2.1. Индиректен ефект на теглото на плацентите при въздействие на етанола върху теглото на ембрионите

Резултатите от медиаторния анализ потвърдиха, че има статистически значим индиректен ефект на медиатора (тегло на плацентите) при въздействието на етанола върху теглото на ембрионите ( $P_M = .482$ ,  $CI = -5.73$  до  $-1.02$ ), като доверителният интервал не съдържа 0 (Фиг. 31 и Фиг. 32; Таблица 5).



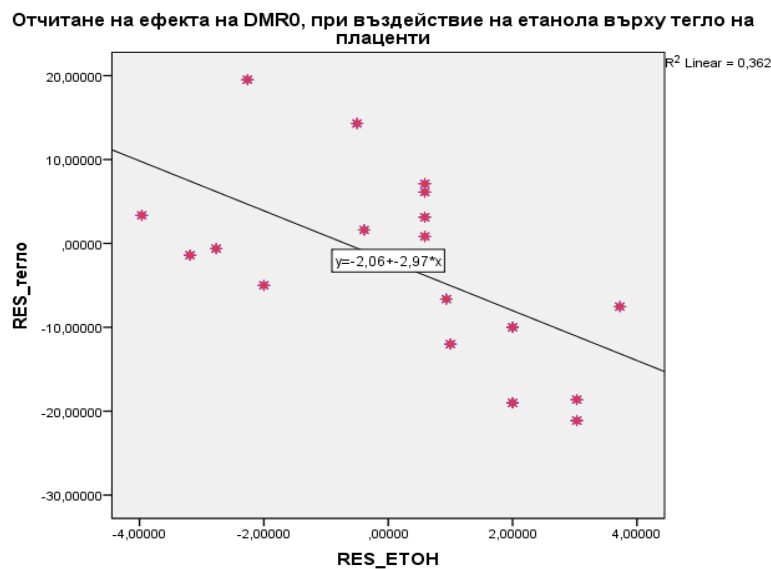
Фигура 32. Индиректен ефект на теглото на плацентите при въздействие на етанола върху теглото на ембрионите.

#### IV.5.2.2. Индиректен ефект на % метилиране на *DMRH19* в ембриони при въздействие на етанола върху теглото на ембрионите

Резултатите от медиаторния анализ потвърдиха, че няма статистически значим индиректен ефект на медиатора (% метилиране на *DMRH19*) в ембрионите при въздействието на етанола върху теглото на ембрионите ( $P_M=.528$ ,  $CI=-6.24$  до  $.084$ ), като доверителният интервал съдържа 0! Това показва, че етанолът влияе директно върху намаляването на теглото на ембрионите и повишаването на % метилиране на *DMRH19* в ембрионите не е медиатор при този процес.

#### IV.5.2.3. Индиректен ефект на % метилиране на *DMR0* в плаценти при въздействие на етанола върху теглото на плацентите

Резултатите от медиаторния анализ потвърдиха, че се наблюдава статистически значим индиректен ефект на медиатора- % метилиране на *DMR0* в плацентите при въздействието на етанола върху теглото на самите плаценти ( $P_M=.357$ ,  $CI = -34.83$  до  $-.38$ ), като доверителният интервал не съдържа 0 ( Фиг 33. Таблица 5).



**Фигура 33.** Графично представяне на индиректен ефект на промяната в метилирането на *DMR0* при въздействие на етанола върху теглото на плацентите.

**Таблица 5.** Данни за стандартизиран индиректен ефект, съотношение между индиректен и тотален ефект и 95% CI от SPSS анализите за индиректен ефект на: медиатор- DMR0 (в червено), при влиянието на етанола върху теглото на плацентите; медиатор- DMRH19 (в синьо) при влияние на етанола върху теглото на ембрионите; медиатор - тегло на плаценти. (в синьо) при влияние на етанола върху теглото на ембрионите. Забележка: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

| Медиатор       | Влияние<br>на Етанол<br>върху<br>тегло<br>плаценти | Влияние<br>на Етанол<br>върху<br>тегло<br>ембриони | Стандартизиран<br>индиректен<br>ефект | Съотношение<br>индиректен<br>ефект<br>/тотален<br>ефект | 95% CI   |          |
|----------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------|----------|
|                |                                                    |                                                    |                                       |                                                         | BootLLCI | BootULCI |
| DMR0           |                                                    |                                                    | -.267                                 | -.36**                                                  | -34.83   | -.39     |
| DMRH19         |                                                    |                                                    | -3.34                                 | .53**                                                   | -6.24    | .08      |
| ТЕГЛО ПЛАЦЕНТИ |                                                    |                                                    | -.304                                 | .482**                                                  | -5.73    | -1.02    |

## V. ОБСЪЖДАНЕ

Излагането на алкохол през вътреутробното развитие може да има многобройни неблагоприятни ефекти върху развитието на плода (Abel et al., 1990; Day et al., 1991). Децата с изява на определен фенотип, за които са характерни лицево-черепни аномалии, изостаналост в растежа и развитието преди и след раждане, както и нарушения на централната нервна система и др., са определени като носители на ФАС (Manning and Hoyme, 2007). Следва да се отбележи, че не всички деца развиват пълният спектър аномалии, или трите основни характеристики на ФАС нямат пълна корелация, което предполага, че вероятно в основата на тяхната етиология стоят различни механизми. Анормалният растеж и развитие на ембриона и плацентата по време на бременността корелират основно с три пика на тератогенност на етанола: предимплантационен период, гаструлация и органогенез при изследвания с животни (Checiu and Sandor, 1986; Padmanabhan and Hameed, 1988 Mitchell et al., 1994), както и при човешките етиологични изследвания (Rosett et al., 1980; Yang et al., 2001). Предимплантационният период е особено чувствителен към всякакви промени на условията поради жизненоважните процеси, които протичат в развиващия се ембрион на този етап. В този начален и кратък отрязък от бременността, геномът на ембриона се активира и постепенно променя своята функционалност, като преминава от тотипотентно състояние при зиготата към плурипотентно състояние на вътрешноклетъчната маса, и впоследствие към насочена диференциация на клетките по време и след имплантация. Това е резултат от пълното репрограмане на генома на този етап, като промените засягат и епигенетичния статус на малка част от импринтираните гени (Lopes et al., 2003). Тези гени са жизненоважни регулатори за растежа на ембриона и плацентата, и дисрегулацията на техните функции води до анормално развитие при различни животински видове и при човек (Thomson et al., 2001). Тяхната моноалелна експресия ги прави още по-чувствителни към всякакви промени в околната среда.

Въз основа на тези факти беше оформена целта на дисертационният труд: да се изследва връзката между етанол-индуцирания аберантен растеж и промените във функцията и епигенетичния статус на импринтиран locus *Igf2/H19* след третиране с етанол в четвъртия ден от предимплантационния период на бременността при мишки. Изследванията бяха фокусирани върху промяната в експресията на всичките четири промотора на *Igf2* - P0, P1, P2, P3 както и *H19*, и върху промени в нивата на метилиране на четирите DMRs на локуса DMR0, DMR1, DMR2 и DMRH19.

На базата на досегашни изследвания в тази област беше съставена работната хипотеза, според която на четвъртия ден от предимплантационния период, когато започва имплантацията на бластоцистите и стартира процеса на *de novo* метилиране, етанолът ще има деметилиращ ефект върху статуса на импринтирания локус. Понижение в метилационните нива ще доведе до намалени нива на експресия на *Igf2* и до увеличение в нивата на *H19*, което впоследствие ще доведе до нарушение в нормалните процеси на ембрионален растеж и развитие.

#### **V.1. Анализ на факторите, оптимизиращи *in vitro* култивационната среда**

Съставът на културалната среда, киселинността, газовата смес и влажността са различни фактори, от които зависи оптималният ембриогенез.

Подобно на други изследвания, добавянето на оптимални концентрации ЕДТА в средата подобрява доимплантационното развитие и в нашето изследване. В етапа между осемклетъчни и морули започна да се очертава рамката, в която концентрациите ЕДТА стимулират развитието - между 10 и 100  $\mu\text{M/l}$ . При преминаване от морули към фаза бластоцист, статистически значимо се различават от контролите концентрации от 50 и 100  $\mu\text{M/l}$ , като оптималната доза е 100  $\mu\text{M/l}$ . Получените данни напълно съответстват на резултати от предишни изследвания, доказващи, че диапазонът на ЕДТА между 10 и 100  $\mu\text{M/l}$  е оптималният (Mehta, 1990).

#### **V.2. Стимулиращ и инхибиращ ефект на етанола, приложен *in vitro* в предимплантационния период**

Резултатите показаха, че влиянието на различни дози етанол върху развитието на бластоцисти в среда *in vitro* през 4-ия ден от бременността за 4 часа е дозово зависимо. Ниските дози (до 0.01%) етанол не оказаха ефект върху развитието, но повишаването на концентрацията до 0.1% води до стимулиращ ефект, като процентът късни бластоцисти се повишава и статистически значимо се различава от контролите. При дозата от 0.2% (v/v) етанол в културалната среда, стимулиращият ефект се повишава и достига максимум. Увеличаването на дозата етанол над 0.2% има за резултат намален процент бластоцисти, като концентрацията от 1.0% показва инхибиторен ефект. При дозата от 0.2% през изследвания кратък четиричасов период, се развиха големи разширени бластоцисти с прозрачен бластоцъол, стигнали до фаза на „излюпване“, което не беше наблюдавано при нито една друга доза, както и при контролите. Такива бластоцисти обикновено са характерни *in vivo* за 5-ти гестационен ден, когато се извършва



същинското имплантиране. В подкрепа на получените резултати са и данните на Leach и съавт. (1993).

### **V.3. Етанол-индуцирана промяна в растежа и развитието на ембрионите**

В настоящето изследване беше установено, че третирането с етанол през 4-ия ден от предимплантационния период води до промяна в растежа и развитието на ембрионите и при условия *in vivo* и *in vitro*. При трансплантираните ембриони произхождащи от третираните с оптималните дози от 0.2% етанол бластоцисти, на 11.5 ден се наблюдава слабо завишаване на нивата на резорбция и тенденция към намаляване на средното тегло на ембрионите. Не се наблюдава тератогенен ефект, но липсваха и данни за стимулация. При ембрионите третирани с дозата от 2.9 g/kg етанол не беше наблюдавана статистически достоверна разлика с контролите, а само тенденция към понижаване на теглото, както и многократно повишаване на процента на резорбирани ембриони. За разлика от тях, при третираните с високата доза (от 5.8 g/kg етанол) ембриони, освен отчетеното намаление в теглото, се наблюдаваха и лицево-черепни аномалии, асинхронност в растежа на частите на тялото, особено изоставане в растежа в лицево-черепната област и вътрешни кръвоизливи най-вече в областта на мозъка. Тези изследвания са в подкрепа на получените по-рано резултати (*Padmanabhan and Hameed, 1988*), показващи, че след третиране със същата доза етанол се наблюдават широк спектър от патологии в развиващите се ембриони.

### **V.4. Етанол-индуцирана промяна в растежа и развитието на плацентите**

При изследване на връзката между различните концентрации етанол и теглото на плацентите беше установено, че влиянието зависи от приложената доза. Теглото на плацентите на трансплантираните ембриони показва статистически незначима тенденция към намаление със 7.2% ( $p < 0.4$ ) спрямо средното тегло на контролните плаценти. При средната доза от 2.9 g/kg етанол, намалението на теглото беше с 30%, а при доза от 5.8 g/kg - с 36.5% спрямо средното тегло на контролните плаценти, като и при двете дози разликите бяха статистически значими. Тези данни потвърждават резултати по темата на други автори (*Haycock, 2007; Padmanabhan and Hameed, 1988*)

### **V.5. Модулиране на експресията на импринтирани и неимпринтирани гени**

#### ***V.5.1. Оценка на референтните гени *Gapdh* и *ActB* като ендогенни стандарти***

В нашите експериментални условия, експресията на *Gapdh* се повлияваше значително след въздействие с изследваните дози етанол. Нивата му на експресия се

повишаваха с порядък, близък до този на анализирания *Igf2* както при бластоцистите, така и при ембрионите, и подобно на *Igf2* намаляваха в плацентите. Разлика в ефекта при двата гена имаше само при ембрионите и техните плаценти, получени след *in vitro* култивиране и трансплантиране, където за разлика от *Igf2*, не беше отчетена промяна при *Gapdh*. *ActB* показва много по-стабилна експресия, като само при високите дози от 2.9 и 5.8 g/kg имаше увеличение на експресията при 22% от ембрионите. При 20% от плацентите само най-високата доза от 5.8 g/kg доведе до значително намаляване в експресията. Нашите резултати са в съгласие с данните, получени при мащабно изследване за търсене на кандидат референтни гени за анализ след въздействието на различни дози етанол на ембрионални и плацентни клетъчни модели (Mindy et al., 2013).

#### **V.5.2. Промяна в експресията на *Igf2/H19* импринтиран локус**

Въздействието с етанол върху развиващите се бластоцисти в 4-ия ден от бременността оказва влияние и върху експресията на импринтиран локус *Igf2/H19*. След четири часа, в среда с концентрация 0.2% етанол с оптимален стимулиращ ефект, беше отчетено повишение в експресията на P0 и тенденция към повишение на P1 от промотрите на *Igf2*. Експресия на *H19* не беше отчетена нито при третираните, нито при контролите.

При ембрионите, получени след *in vitro* култивиране, повишените нива на P0 се запазиха с малко по-високи стойности, спрямо бластоцистите от които произхождат, като освен при този промотор нивата на експресия и на промоторите P2 и P3 показаха статистически значимо увеличение. Въздействието с 2.9 и 5.8 g/kg етанол повиши нивата на експресия на *Igf2* в ембрионите на 11.5 ден, като реципрочно се намали и експресията на *H19*.

При плацентите ефектът на етанола е обратен - наблюдава се зависимо от дозата намаление на нивата на *Igf2*. При високата доза има изменение в нивата на всички промотори на *Igf2* както и на P0. Макар че експресията на промотора съставлява около 10% от общата експресията на гена, счита се, че той е основен модулатор на плацентния и ембрионален растеж. *H19* има реципрочна експресия на *Igf2*, която се повишава с увеличаването на концентрациите етанол.

В резюме, етанолът действа тъканно-специфично и ефектът му върху експресията на импринтирани и неимпринтирани гени в плацентата и ембриона е различен. *Igf2* и *Gapdh* са по-чувствителни и се влияят и от по-ниски концентрации етанол, за разлика от *ActB* и *H19*, за които са нужни по-високи дози за подобен ефект. Промяната в експресията

на импринтирания *Igf2* е с дълготраен ефект, за разлика от неимпринтирания *Gapdh*. Това е първият сравнителен анализ на ефекта на етанола върху експресията на импринтиран и неимпринтиран ген, проследен от фаза бластоцист до средата на бременността. След трансплантация неимпринтираният ген възстановява нормалните си нива, докато импринтираният ген ги запазва и дори увеличава. Резултатите показват бърза промяна на моноалелната експресия, и по-бавното и възвръщане към нормалните нива и граници, като дори ниски дози етанол и краткотрайна експозиция, водят до дълготрайни промени. Тези данни разкриват голямата чувствителност на импринтираните гени към въздействието на тератогенни агенти през ранната бременност.

## **V.6. Етанол-индуцирани епигенетични промени**

### ***V.6.1. Модулиране на експресията на ДНК метилтрансферази***

В настоящото изследване, след третиране с високата доза от 5.8 g/kg етанол, на 11.5 ден беше отчетена промяна в нивата на експресия на трите основни метилтрансферази при бозайниците- *Dnmt1*, *Dnmt3a* и *Dnmt3b* и при ембрионите, и при плацентите. При ембрионите нивата на експресия се повишиха, като освен при *Dnmt1*, значително увеличение беше отчетено и при *Dnmt3b*. При плацентите високата доза етанол имаше обратен ефект - нивата на *Dnmt1* намаляваха вследствие въздействието, като паралелно намаление беше отчетено и при *Dnmt3a*.

### ***V.6.2. Промени в метилационния статус на Igf2/H19***

#### **V.6.2.1. Повишени нива на метилиране при ембриони**

При направения анализ на четирите DMRs - DMR0, DMR1, DMR2, DMRH19 на локуса е открита промяна в метилирането само при DMRH19. Промяната беше само в рамките на 9%, но статистически значима, като нивата на метилиране са повишени в етанол-третираните ембриони. Резултатите за експресията при ембрионите са в съгласие с резултатите при ембрионални и трофобластни култури, стволови клетки (*Khalid et al., 2014*), както и при изследвания на мозъка (*Zhou et al., 2016*).

#### **V.6.2.2. Деметилиращ ефект на етанола в плаценти**

В настоящето изследване, ефектът от излагане на 5.8 g/kg етанол в предимплантационния период е различен при плацентите и ембрионите. Единственото сходство беше наличие на промяна в ICRH19. Докато при ембрионите се наблюдаваха повишени нива в този район, при плацентите имаше намаление в метилирането, близко по стойности с тези при ембрионите. При плацентите обаче, беше отчетена и промяна в още един DMR. Най-висока степен на намаление в метилирането показва DMR0. В

останалите два района на локуса - DMR1 и DMR2, подобно на ембрионите, не беше отчетена никаква промяна в изследваните райони. В съгласие с нашите данни, докладвана е промяна в метилирането на DMRs на локуса и значително намаляване в ICRH19 в плацентите след третиране с етанол (Zhou1 et al., 2016; Haycock and Ramsay, 2009).

#### **V.7. Промени в модела на метилиране и функционалност на *Igf2/H19* локус като основа в етиологията на ФАС**

Работната хипотеза напълно съвпада с получените резултати, като описва ефекта на дозата от 5.8 g/kg етанол върху промените в импринтирания локус и теглото при плацентите. Етанолът или неговите метаболити (като ацеталдехид) след въздействие на четвъртият ден от бременността причиняват инхибиране на експресията на основната метилтрансфераза *Dnmt1*, както и на *де ново* поддържащата *Dnmt3a*, което вероятно води до намаление в нивата на метилиране на два DMRs на локуса. Намаленото метилиране корелира с намалена експресия на всичките промотори при *Igf2* - един от основните модулатори на ембрионалния и плацентен растеж, и повишена при ген *H19*, водещо до допълнителна редукция в теглото на плацентите. От двата DMRs, промяната в метилационния статус на DMR0 е достоверен, статистически значим медиатор на етанол-индуцираното намаление в теглото на плацентите в средата на бременността. Редукция в теглото на плацентите впоследствие се явява медиатор при въздействието на етанола върху теглото на ембрионите.

При ембрионите обаче ефектът на алкохола беше противоположен, като се изразява в повишени нива на метилтрансферазите, последващо увеличение в нивата на метилиране на ICRH19, корелиращо с повишени нива на експресия на *Igf2* и намалени при *H19*. Независимо, че беше установена корелация между промяната в метилирането и теглото на ембрионите, медиаторният анализ показва, че етанолът директно намалява теглото на ембрионите, и повишаването на % метилиране на ICRH19 в ембрионите не се явява един от механизмите, лежащи в основата на този процес.

Противоположните резултати при ембрионите и техните плаценти показват, че механизмите, стоящи в основата на действието на етанола, са много разностранни. Действието на алкохола, освен че зависи от дозите и времето, е и тъканно-специфично. В подкрепа на това твърдение са и последните аналогични изследвания на Zhou1 и съавт. (2016), където ефектът на етанола е с различен характер в три отделни органа на ембриона (сърцето, мозъка и плацентата).

## **V.8. Заключение**

Представеното проучване е първият задълбочен анализ, изследващ връзката между въздействието на етанола върху епигенетичния статус и експресията на импринтиран locus *Igf2/H19* в предимплантационния период, и етанол-индуцирана физическа характеристика на ФАС като намалено тегло на ембриони и плаценти в средата на бременността.

Доскоро се смяташе, че предимплантационният период не е чувствителен към въздействието на тератогени. Нашите изследвания са фокусирани именно върху този ключов период от бременността. Получените резултати показват, че епигенетичният статус и функционалността на импринтираните гени са много чувствителни към въздействието на етанола като тератогенен фактор. Настъпилите промени в периода на имплантацията водят до аномално ембрионално развитие в средата на бременността, което прави този кратък отрязък от ембриогенезата силно уязвим и податлив към вредни фактори.

Изучаването на основните механизми на действието на етанола, освен разбиране на етиологията на синдрома, в бъдеще може да послужи за превенция, както и за възстановяване на нормалните епигенетични нива и преодоляване на вредното му въздействие.

## VI. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Въз основа на получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Етанолът действа и активиращо и инхибиращо на развитието на бластоцисти в среда *in vitro* в зависимост от дозите. Оптималната активираща доза при бластоцисти от линия C57BL/6 е 0.2%.
2. Активиращият ефект на етанола, приложен *in vitro* в предимплантационния период, не се запазва в средата на бременността, но не се отчитат и инхибиторни или тератогенни ефекти при ембриони и плаценти, получени от трансплантирани бластоцисти, третирани с 0.2% етанол.
3. Приложен *in vivo* на четвъртия ден от бременността, етанолът проявява инхибиторен, зависим от дозата ефект върху нормалния растеж и развитие на ембрионите и техните плаценти. Ефектът е по-силно изразен при високата доза от 5.8 g/kg, при която се наблюдават и тератогенни ефекти. Етанолът повишава значително нивата на ембрионална резорбция в третираните групи.
4. Етанолът, приложен в условия *in vivo* и *in vitro* в предимплантационния период, променя нивата на експресия на *Igf2/H19* локус:
  - i. повишава нивата на експресия на *Igf2* в бластоцисти и ембриони, като паралелно намалява експресията на *H19*.
  - ii. намалява нивата на експресията на *Igf2* в плаценти, съчетано с паралелно повишаване на експресията на *H19*.
5. Въздействието с 5.8g/kg етанол води до промяна в нивата на експресия на ДНК метилтрансферазите и нивата на метилиране на DMRs на *Igf2/H19* локус:
  - i. повишени са нивата на експресия на *Dnmt1* и *Dnmt3b*, и нивата на метилиране в DMRH19 при ембриони.
  - ii. при плаценти етанолът има деметилиращ ефект, като се наблюдава намаление в нивата на експресия на метилтрансферазите *Dnmt1* и *Dnmt3a*, и намалени нива на метилиране в DMR0 и DMRH19.
6. Референтните гени *Gapdh* и *ActB* имат подобен на импринтирания *Igf2* ген профил на експресия в ембриони и плаценти след въздействие с етанол.
7. Моноалелната експресия на импринтирания ген *Igf2* показва силна чувствителност към тератогенни агенти като етанол в предимплантационния период.

Променената експресия на гена не се нормализира към средата на бременността, за разлика от експресията на „housekeeping“ гена *Gapdh*, който възстановява нивото си.

8. Намалените нива на метилиране на DMR0 на *Igf2/H19* локус медираат алкохол-индуцираното намаление в теглото на плацентите, което е един от механизмите при алкохол-индуцираното намаление в теглото на ембрионите.

## ПРИНОСИ

➤ Оптимизираната среда за култивиране P1 дава възможност за оптимално развитие на витални ембриони в условия *in vitro* до нива близки до условия *in vivo*.

➤ В определени оптимални дози в *in vitro* условия етанолът променя хода на предимплантационното развитие, като повишава нивата на експресия на *Igf2* като растежен фактор и действа стимулиращо на растежа на бластоцистите.

➤ Това са първите данни за оценка на *Gapdh* и *ActB* като ендогенни стандарти след въздействие с етанол в моделни системи - бластоцисти, ембриони и плаценти. И двата гена не са резистентни към влиянието на етанола и не са подходящи за анализ.

➤ Установена е аберантна експресия на метилтрансфери в плаценти с изоставащ растеж след въздействие с етанол в предимплантационния етап на бременността.

➤ Ефектът на етанола приложен в началото на имплантацията е тъкан и ген-специфичен, изразяващ се в диференциална промяна в експресията и нивата на метилиране на *Igf2/H19* локус при плаценти и ембриони в средата на бременността.

➤ За първи път са представени данни, показващи, че етанолът, приложен в началото на имплантацията, модулира метилационния статус на DMR0 на *Igf2/H19* локус в плаценти, и тази промяна е медиатор на физическа характеристика на ФАС.

## VII. ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Abel EL. (1990) Fetal Alcohol Syndrome. *Economic Books*. Oradel, NY.
2. Checiu M, Sandor S. (1986) The effect of ethanol upon early development in mice and rats. IX. Late effect of acute preimplantation intoxication in mice. *Morphol Embryol*. 32:5-11.
3. Day NL, Richardson GA. (1991) Prenatal alcohol exposure: A continuum of effects. *Semin Perinatol* 15:271-279.
4. Engber D. (2011). The Trouble With Black-6: A tiny alcoholic takes over [http://www.slate.com/articles/health\\_and\\_science/the\\_mouse\\_trap/2011/11/black\\_6\\_lab\\_mice\\_and\\_the\\_history\\_of\\_biomedical\\_research.html](http://www.slate.com/articles/health_and_science/the_mouse_trap/2011/11/black_6_lab_mice_and_the_history_of_biomedical_research.html).
5. Halliwell G and Gutteridge JM. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*. 219 1–14.
6. Haycock P and Ramsay M. (2009) Exposure of Mouse Embryos to Ethanol During Preimplantation Development: Effect on DNA Methylation in the *H19* Imprinting Control Region. *Biology of reproduction*. 81, 618–627.
7. Haycock P. (2007) Exposure of Mouse Embryos to Ethanol During Preimplantation Development: Effect on DNA-Methylation in the *H19* Imprinting Control Region. *Dissertation*. Johannesburg, South Africa.
8. Khalid O, Kima JJ, Kima HS, Hoanga M, Tua TG, Yong K. (2014) Gene expression signatures affected by alcohol-induced DNA methylomic deregulation in human embryonic stem cells. *Stem cell res*. Vol 12, Issue 3, 791-806.
9. Leach RE, Stachecki JJ, Armant DR. (1993) Development of in vitro fertilized mouse embryos exposed to ethanol during the preimplantation period: accelerated embryogenesis at subtoxic levels. *Teratology*. 47:57-64.
10. Lopes S, Lewis A, Hajkova P, Dean W, Oswald J, Forne T, Murrell A, Constancia M, Bartolomei M, Walter J, Reik W. (2003) Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet*. 12:295-305.
11. Manning MA, Hoyne HE. (2007) Fetal alcohol spectrum disorders: A practical clinical approach to Diagnosis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 31:230–238.
12. Mehta TS and Kiessling A. (1990) Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid wiii or without amino acids or serum. *Biol Reprod*. 43(4):600.
13. Mindy N, Carnahan A, Kylee J, Veazey A, Muller D, Tingling JD, Rajesh CM. (2013) Identification of cell-specific patterns of reference gene stability in quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction studies of embryonic, placental and neural stem models of prenatal ethanol exposure. *Alcohol*. 47 (2013) 109e120.
14. Mitchell JA. (1994) Effects of alcohol on blastocyst implantation and fecundity in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*. 18:29-34.
15. Padmanabhan R, Hameed M. (1988) Effects of acute doses of ethanol administered at pre-implantation stages on fetal development in the mouse. *Drug Alcohol Depend*. 22:91-100.
16. Penkov LI, Platonov ES, and New D. (1995) Prolonged Development of Normal and Parthenogenetic Postimplantation Mouse Embryos in vitro. *Int. J. Devel. Biol*. 1995, vol. 39, pp. 985–999.
17. Penkov LI. (1999) Effects of the transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) on the development of parthenogenetic mouse embryos. *The Wellcome Trust International Fellows Meeting*. Hinxton. UK. P. 20-21.



18. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30(9): e36.
19. Preacher KJ, Hayes AF. (2004) SPSS and SAS procedures for estimating indirect effects in simple mediation models. *Behav Res Methods Instrum Comput.* 36:717-731-13.
20. Rosett HL, Weiner L, Zuckerman B, McKinlay S, Edelin KC. (1980) Reduction of alcohol consumption during pregnancy with benefits to the newborn. *Alcohol Clin Exp Res* 4:178-184.
21. Thompson SL, Konfortova G, Gregory RI, Reik W, Dean W, Feil R (2001) Environmental effects on genomic imprinting in mammals. *Toxicol Lett.* 120:143-150.
22. Yang Q, Witkiewicz B, Olney R, Liu Y, Davis M, Khoury J, Correa A, Erickson D. (2001) A case-control study of maternal alcohol consumption and intrauterine growth retardation. *Ann Epidemiol.* 11:497-503.
23. Zhou J, Qian Y, Zhou Q, Xiong Y, Wang H. (2016) Tissue-specific differential DNA methylation at *Igf2/H19* locus in a mouse model for embryonal ethanol exposure. *Int J Clin Exp Pathol.* 9(4):4862-4871-2.

## VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ В ПЪЛЕН ТЕКСТ

- **Taseva TK**, Koycheva YM, Olova N, Popova SG, Penkov LI. (2015) Effects of alcohol on placental growth and *Igf2* expression. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Science.* Tome 68, 9.
- **Taseva TK**, Koycheva YM, Popova SG, Stoimenova DB, Penkov LI. (2015) Ethanol exposure during gestation alters *Igf2* expression in developing mouse embryos. *Genetics and Plant Physiology.* Vol. 5(1).

## IX. БЛАГОДАРНОСТИ

*ДЪЛЖА СПЕЦИАЛНА БЛАГОДАРНОСТ НА ДИРЕКТОРА НА ИФРГ ПРОФЕСОР Д-Р СНЕЖАНКА ДОНЧЕВА БЕЗ ЧИЯТО ПОМОЩ НЕ БИ БИЛО ВЪЗМОЖНО ОСЪЩЕСТВЯВАНЕТО НА ТАЗИ ДИСЕРТАЦИЯ.*

*С БЛАГОДАРНОСТ СЕ ОБРЪЩАМ, КЪМ НАУЧНИЯ СИ РЪКОВОДИТЕЛ ДОЦЕНТ Д-Р ЛЕОНИД ПЕНКОВ, КАКТО И КЪМ ЦЕЛИЯ КОЛЕКТИВ НА ЛАБОРАТОРИЯ „ГЕНОМНА ДИНАМИКА И СТАБИЛНОСТ“ ЗА ЦЕННИТЕ СЪВЕТИ, ПОМОЩТА И ПРИЯТЕЛСКАТА АТМОСФЕРА.*

*ПРИЗНАТЕЛНА СЪМ НА ПРОФЕСОР JO PETERS (MRC, MAMMALIAN GENETICS UNIT, HARWELL, UK), КАКТО И НА ПРОФЕСОР ANNE FERGUSON-SMITH (DEPARTMENT OF GENETICS, UNIVERSITY OF CAMBRIDGE, UK) ЗА ПРЕДОСТАВЕНАТА МИ ВЪЗМОЖНОСТ ДА СТАНА ЧАСТ ОТ ТЕХНИТЕ ЕКИПИ, ЗА ЦЕННИЯ ОПИТ И ОБУЧЕНИЕТО МИ В МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ АНАЛИЗИ.*

*БЛАГОДАРЯ НА ЕКИПА ЗА ОРГАНИЗАЦИЯ И УПРАВЛЕНИЕ НА ПРОЕКТ „ПОДКРЕПА ЗА ИЗГРАЖДАНЕ И РАЗВИТИЕ НА МЛАД КОНКУРЕНТОСПОСОБЕН НАУЧЕН ПОТЕНЦИАЛ В ОБЛАСТТА НА ФИЗИОЛОГИЯТА, ФИТОХИМИЯТА, ГЕНОМИКАТА, ПРОТЕОМИКАТА И БИОРАЗНООБРАЗИЕТО НА ЕУКАРИОТНИТЕ ОРГАНИЗМИ“ -ДОГОВОР BG051P0001-3.3.06-0025 ЗА ФИНАНСОВАТА ПОМОЩ.*

*СЪРДЕЧНО БЛАГОДАРЯ НА МОЯТА МАЙКА ЗА ПОМОЩТА, БЕЗРЕЗЕРВНАТА ВЯРА И ПОДКРЕПА, КАКТО И НА ПРИЯТЕЛИТЕ МИ С КОИТО ВЯРВАХМЕ, ЧЕ „ЩЕ СТАНЕ ЗАЩОТО ГО ПРАВИМ“.*