

ЭМБРИОЛОГИЯ

УДК 599.3:591.31:578.61

ТРЕХМЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ДВУХКЛЕТОЧНОГО ЭМБРИОНА МЫШИ ПОСРЕДСТВОМ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ**М.А. Погорелова, В.А. Голиченков, В.А. Яшин*, А.Г. Погорелов*****(кафедра эмбриологии, e-mail: agpogorelov@rambler.ru)*

Разработана технология прямого измерения объемных характеристик раннего эмбриона млекопитающих. В основу подготовки препарата положена сверхбыстрая низкотемпературная фиксация зародыша с последующей лазерной сканирующей микроскопией образца. Цифровую обработку серии оптических срезов и трехмерную реконструкцию объекта проводили с помощью стандартных компьютерных программ. На примере двухклеточного эмбриона мыши демонстрируется возможность применения разработанной технологии для изучения физиологии клетки в условиях культивирования.

Ключевые слова: *двухклеточный эмбрион мыши, осмотический шок, лазерная сканирующая микроскопия, трехмерная реконструкция.*

Трудно переоценить вклад осмотического фактора и механизмов его компенсации в регуляцию физиологии клетки (Macknight, 1988; Lang et al., 1998). Изменение объема индуцирует трансформации на молекулярно-клеточном уровне, в их ряду: синтез белков (Anbari, Schultz, 1993), экспрессия гена (Benzeev, 1991, Rinaudo, Schultz, 2004), активация ионных каналов (Kolajova et al., 2001). Особенно подвержены осмотическому шоку клеточные системы, существующие автономно, например клетка в культуре или изолированный ранний эмбрион.

Даже кратковременное действие гиперосмотического шока вызывает нарушение развития эмбриона (van Winkle et al., 1990; Biggers et al., 1993). По этой причине пристальное внимание уделяется подбору среды инкубирования, которая по своим характеристикам должна быть изотонична клеточному содержанию. В биотехнологии, например криоконсервировании, объемные характеристики используют как интегративный параметр, описывающий травматическое действие на зародыш экспериментального протокола. Изменение эмбрионального объема оценивают качественно посредством визуального наблюдения или псевдоколичественно. В последнем случае, предполагая наличие у эмбриона сферической формы, в фокусе экваториальной плоскости измеряют эффективный диаметр (площадь) сечения и, исходя из него, рассчитывают объем.

Отметим, что выбор фокусной плоскости достаточно субъективен. Кроме того, указанная методика становится некорректной уже после перво-

го клеточного цикла, когда форма и размер сечения бластомера являются переменной величиной, которая зависит от пространственной ориентации эмбриона в момент наблюдения. Поэтому актуальным представляется развитие подходов прямого измерения объема как всего эмбриона, так и его компартментов. Данное исследование посвящено разработке технологии количественной томографии раннего зародыша млекопитающих на основе низкотемпературной фиксации его формы, последующей лазерной сканирующей микроскопии и трехмерной реконструкции объекта.

Методика

Исследования проводили на мышах F₁ (СВАхС57В1). Во время эксперимента животных содержали в стандартных условиях: температура в комнате 20 ± 2°, гранулированный корм ПК-121-2, питье *ad libitum*. Воду, корм и подстилку меняли ежедневно без предварительной стерилизации. Двухклеточные эмбрионы получали в соответствии с методикой, описанной ранее (Манк, 1990). Вымытые зародыши инкубировали в среде Дюльбекко. В качестве контрольного образца использовали эмбрионы, взятые непосредственно после выделения из яйцевода. Направленность осмотического шока моделировали изменением концентрации соли NaCl в среде инкубирования.

Принципы методики, основанной на криофиксации биологической ткани, описаны нами ранее

* Институт биофизики клетки РАН, г. Пушкино.

** Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушкино.

(Pogorelov et al., 1991; Погорелов, Гольдштейн, 2006). Начальным этапом является сверхбыстрое замораживание объекта в жидком пропане, охлажденном жидким азотом до температуры -188° . Замороженные образцы лиофилизировали в вакууме ($\sim 10^{-5}$ Pa) при низкой температуре (-90°), используя установку MBA 5 (Balzers, Лихтенштейн). По завершении низкотемпературной дегидратации высушенный объект заключали в среду, приготовленную на основе эпоксидной смолы Epon 812. Детали подготовки раннего эмбриона в соответствии с описанной методикой обсуждали в текущих публикациях (Pogorelov et al., 2006, Гольдштейн и др., 2007, Pogorelov et al., 2007).

После термополимеризации (63°) заливочной смолы поверхность полученного блока затачивали стеклянным ножом. Подготовленный препарат изучали в конфокальном микроскопе (Zeiss LSM 510 Axioplan 2 imaging, Germany), используя HeNe 633 нм лазер (Zeiss, Germany). В режиме на просвет получали стопку оптических срезов с шагом 1 мкм в вертикальном направлении. Учитывая низкий контраст полученного цифрового изображения, каждый срез дополнительно обрабатывали по унифицированному алгоритму, для чего можно использовать среду Adobe Photoshop 6.0 или GIMP 2.2.17 [<http://gimp-win.sourceforge.net/>]. На микрофотографии эмбриона в плоскости оптического среза обрисовывали контуры бластомеров и затем по серии последовательных контуров восстанавливали трехмерный вид эмбриональной клетки (Погорелов и др., 2005). 3-D реконструкцию проводили с помощью стандартного графического редактора, например 3ds max [<http://www.discreet.com/>], который позволяет измерять объемные характеристики анализируемого объекта.

Результаты

Лиофилизированные ранние эмбрионы мыши, погруженные в заливочную среду (Epon 812), хорошо видны под обычным стереомикроскопом. На рис. 1 представлена микрофотография группы зародышей, помещенных в эпоксидную смолу Epon 812.

Отметим, что на изображении (рис. 1) наблюдаются характерные морфологические признаки эмбриона. Для подготовки препарата, используемого нами в лазерной сканирующей микроскопии, из группы эмбрионов отбирали двухклеточные зародыши. На рис. 2 показан вид сестринских бластомеров, полученный в результате объемной реконструкции раннего эмбриона мыши.

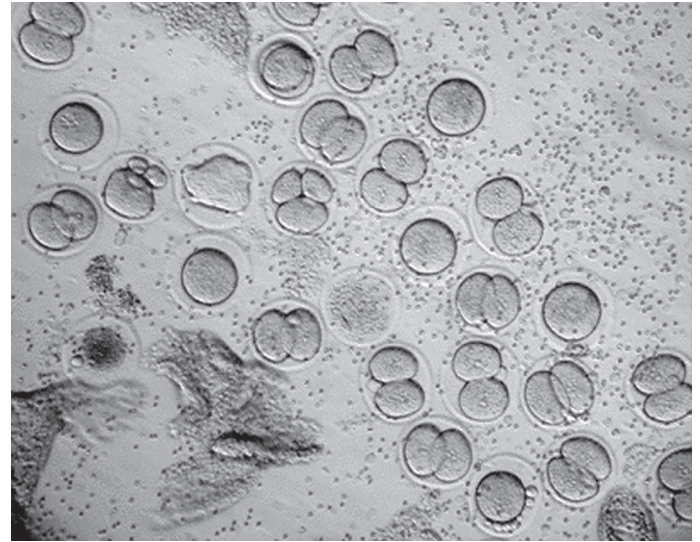


Рис. 1. Характерное изображение группы лиофилизированных эмбрионов мыши, заключенных в заливочную среду Epon 812. Микрофотография получена в стереомикроскопе (лабораторная бинокулярная лупа)

3D реконструкция позволяет проводить прямые измерения объемных характеристик реконструируемого объекта. На рис. 3 суммированы результаты количественного анализа изменения объема бластомера для разных условий инкубирования эмбриона мыши. Все данные нормированы к объему клетки контрольного эмбриона, взятого сразу после выделения из яйцевода.

На рис. 3 видно, что в начале гипотонической инкубации, когда наблюдается набухание бла-

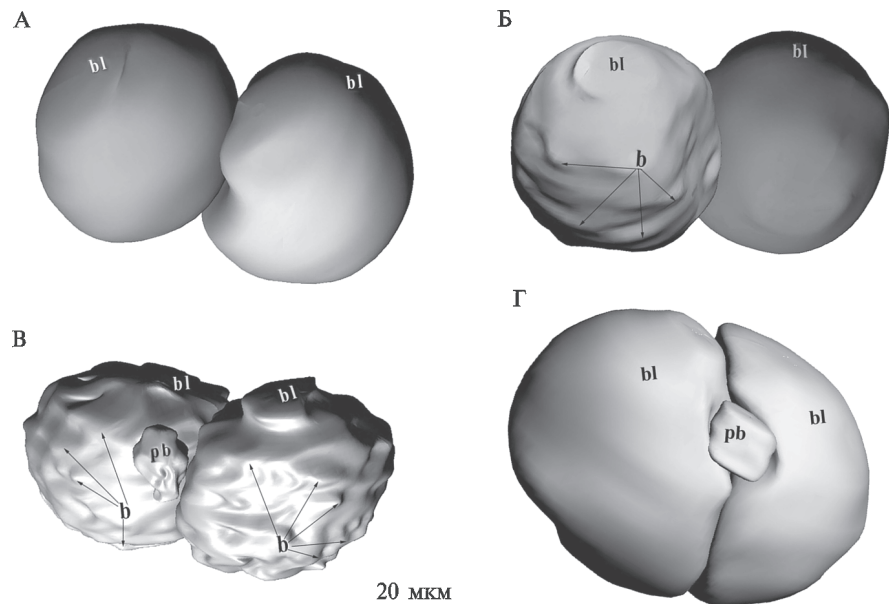


Рис. 2. Изображение сестринских бластомеров после 3D реконструкции двухклеточного эмбриона мыши.

А — контрольный эмбрион, приготовленный непосредственно после выделения из яйцевода; Б — эмбрион после 15 мин инкубирования в нормальной среде Дюльбекко, содержащей 140 мМ NaCl; В — эмбрион после 15 мин инкубирования в гипертонической среде Дюльбекко, содержащей 280 мМ NaCl; Г — эмбрион после 15 мин инкубирования в гипотонической среде Дюльбекко, содержащей 70 мМ NaCl.

Обозначения: bl — бластомер; b — выросты; pb — полярное тельце

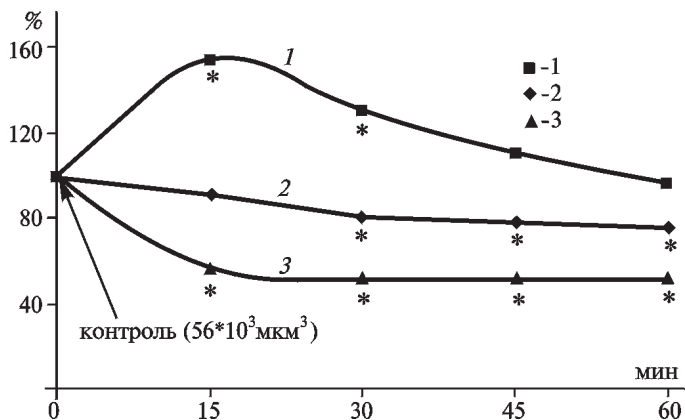


Рис. 3. Относительное (%) изменение объема бластомера в течение инкубирования двухклеточного эмбриона мыши при разных осмотических условиях.

Обозначения: 1 — обработка в гипотонической среде Дюльбекко, содержащей 70 мМ NaCl; 2 — обработка в нормальной среде Дюльбекко, содержащей 140 мМ NaCl; 3 — обработка в гипертонической среде Дюльбекко, содержащей 280 мМ NaCl.

* — $p < 0,05$ по сравнению с начальным (контрольным) значением (рассчитано по t-критерию Стьюдента). Число в каждой точке, отмеченной на графиках, соответствует среднему значению, полученному для группы, состоящей не менее чем из 20 эмбрионов

стомера (рис. 2), клеточный объем увеличивается в 1,5 раза. Более продолжительное культивирование эмбриона в среде с низкой концентрацией (70 мМ) соли NaCl приводило к обратимому восстановлению объемных характеристик эмбриональной клетки. Гипертонические условия (280 мМ NaCl) индуцировали необратимое уменьшение почти в 2 раза объема бластомера (рис. 3). Отметим, что через 60 мин инкубирования эмбриона в нормальном растворе Дюльбекко, содержащем 140 мМ соли NaCl, регистрируется уменьшение почти на 20% объема клетки.

Обсуждение

В настоящем исследовании использовали сверхбыструю криофиксацию раннего эмбриона мыши. Нашей целью было сохранить прижизненные характеристики зародыша, которые могут меняться при химической фиксации. К таким параметрам относится внутриклеточное распределение легко диффундирующей компоненты цитоплазмы, например ионов (K^+ , Na^+ , Cl^- и др.), или, как в данной работе, объем и форма эмбриона. В указанных случаях использование химических агентов приводит к неконтролируемому изменению анализируемых величин и, как следствие, необратимой инактивации мембранных белков, ответственных за транспорт воды (аквапорины) и ионов (ионные каналы и насосы).

Наши качественные (рис. 2) и количественные (рис. 3) данные соответствуют визуальным наблюдениям реакции раннего эмбриона на действие осмотического шока. Однако разработанная техно-

логия количественной томографии позволила выявить детали пространственного строения раннего эмбриона млекопитающего и непосредственно измерить его объемные характеристики в динамике. Например, нами показано появление выростов на поверхности бластомера в гиперосмотических условиях, при этом сестринские клетки могут по-разному реагировать на осмотический шок.

Особо следует отметить слабую гиперосмотичность нормальной среды Дюльбекко, что вызывало уменьшение объема бластомера (рис. 3). Со временем этот эффект компенсируется транспортом основных клеточных ионов (K^+ , Na^+ , Cl^-), направленным на адаптацию к осмотическому шоку. Однако даже кратковременное сжатие эмбриональной клетки повышает активность белка p38 MAPK и уровень CCM2 (Fong et al., 2007), что приводит к нарушению эмбриогенеза. К тому же компенсаторное восстановление объема будет означать нарушение ионного микроклимата в клетке.

Изменение внутриклеточного ионного гомеостаза, установившегося de novo в результате адаптивной реакции на гиперосмотическое воздействие среды Дюльбекко, может быть существенным фактором в регуляции состояния клетки. Например, в результате изменения цитоплазматической концентрации иона K^+ происходит рекомбинация ДНК (Parkinson et al., 2002), экспрессия генов (Taurin et al., 2002), деполимеризация актина (Goldmann, 2003). Именно необратимое нарушение цитоплазматического Na/K баланса регистрировали при осмотическом шоке, индуцированном криопротекторами (Pogorelov et al., 2006; Pogorelov et al., 2007). По-видимому, не следует исключать из рассмотрения фактор хемотоксичности высоких концентраций осмотически активных молекул и/или ионов (Katkov, Pogorelov, 2007).

Завершая обсуждение результатов, можно прийти к следующему заключению. В нормальной среде Дюльбекко изменение объема раннего эмбриона протекает невыраженно, а его компенсаторное восстановление завершается на начальном этапе культивирования. При этом слабый пролонгированный осмотический эффект, как правило, маскируется механическими манипуляциями с эмбрионом, что не позволяет визуально оценить степень влияния среды на объем бластомера. Таким образом, наличие “интактной” формы у эмбриона на поздних стадиях культивирования не означает, что удалось избежать осмотического шока на этапе выделения зародыша. Разработанная нами технология дает подход для количественного анализа действия микроокружения на объемные характеристики эмбриональной клетки. В этом смысле ее следует рассматривать как инструмент для изучения травматического действия протокола культивирования и механизмов адаптации клетки к культуральной среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гольдштейн Д.В., Погорелова В.Н., Погорелов А.Г. 2007. Изменение цитоплазматического Na/K баланса двухклеточного эмбриона мыши под действием цитохалазина Б // Цитология. **49**. № 8. 680—684.
- Манк М. 1990. Биология развития млекопитающих (методы). М.
- Погорелов А.Г., Гольдштейн Д.В. 2006. Электронно-зондовый микроанализ цитоплазматической концентрации элементов в одиночной клетке культуры и суспензии // Клеточные технологии в биологии и медицине. № 2. 84—91.
- Погорелов А.Г., Кантор Г.М., Сахарова Н.Ю., Смирнов А.А., Чайлахян Л.М., Аксиров А.М. 2005. 3D реконструкция эмбриона мыши на ранних стадиях предимплантационного развития // Цитология. **47**. № 8. 686—691.
- Anbari K., Schultz R.M. 1993. Effect of sodium and betaine culture media on development and relative rates of protein in preimplantation mouse embryos in vitro // Mol. Reprod. **35**. 24—28.
- Benzeev A. 1991. Animal cell shape changes and gene expression // Bioassays. **13**. 207—212.
- Biggers J.D., Lawitts J.A., Lechene C.P. 1993. The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos in vitro // Mol. Reprod. Dev. **34**. 380—390.
- Cohen G.M., Sun X.M., Snowden R.T., Dinsdale D., Skilleter D.N. 1992. Key morphological features of apoptosis in the absence of internucleosomal DNA // Biochem. J. **286**. 331—334.
- Fong B., Watson P.H., Watson A.J. 2007. Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation // BMC Dev. Biol. **7**. N 2. 1—16.
- Goldmann W.H. 2003. Examination of actin polymerization and viscosity by cations and ionic strength when cross-linked by alpha-actin // Cell Biol. Int. **27**. 391—394.
- Katkov I.I., Pogorelov A.G. 2007. Influence of Exposition to Vitrification Solutions On 2-Cell Mouse Embryos: II. Osmotic Effects or Chemical Toxicity? // Cryo-Letters. **28**. N 6. 409—427.
- Kolajova M., Hammer M.A., Collins J.L., Baltz J.M. 2001. Developmentally regulated cell cycle dependence of swelling-activated anion channel activity in the mouse embryo // Development. **128**. 3427—3434.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. 1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms // Physiol. Rev. **78**. N 1. 247—305.
- Macknight A.D.C. 1988. Principles of cell volume regulation // Renal Physiol. Biochem. **11**. 114—141.
- Parkinson G.N., Lee M.P.H., Neidle S. 2002. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA // Nature. **417**. 876—880.
- Pogorelov A.G., Allachverdov B.L., Burovina I.V., Mazay G.G., Pogorelova V.N. 1991. Study of potassium deficiency in cardiac muscle: cryotechniques and X-ray microanalysis // J. Microscopy. **12**. 24—38.
- Pogorelov A.G., Katkov I.I., Smolyaninova E.I., Goldshtein D.V. 2006. Changes in Intracellular Potassium and Sodium Content of 2-Cell Mouse Embryos Induced by Exposition to Vitrification Concentrations of Ethylene Glycol // CryoLetters. **27**. N 2. 87—98.
- Pogorelov A.G., Katkov I.I., Pogorelova V.N. 2007. Influence of Exposition to Vitrification Solutions On 2-Cell Mouse Embryos: I. Intracellular Potassium and Sodium Content // CryoLetters. **28**. N 6. 403—408.
- Rinaudo P., Schultz R.M. 2004. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos // Reproduction. **128**. 301—311.
- Taurin S., Seyrantepe V., Orlov S.N., Tremblay T.L., Thibault P., Bennett M.R., Hamet P., Pshezhetsky A.V. 2002. Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells // Circ. Res. **91**. 915—922.
- Van Winkle L.J., Haghghat N., Campione A.L. 1990. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid // J. Exp. Zool. **253**. 215—219.

Поступила в редакцию
15.04.08

3 D RECONSTRUCTION OF 2-CELL MOUSE EMBRYO BY LASER SCANNING MICROSCOPY

M.A. Pogorelova, V.A. Golichenkov, V.A. Yashin, A.G. Pogorelov

The direct quantitation of volumetric parameters of early mammal embryo was designed. The sample technique was based on embryo cryofixation followed by laser scanning microscopy. 3 D reconstruction of embryo compartments was performed with standard graphic software. Approaches of developed technique were demonstrated on isolated 2-cell mouse embryo.

Key words: 2-cell mouse embryo, osmotic shock, laser scanning microscopy, 3 D reconstruction.

Сведения об авторах

Погорелова Мария Александровна — аспирант кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ. *Тел.:* (495)939-14-62; *e-mail:* rogm2007@rambler.ru

Голиченков Владимир Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой эмбриологии биологического факультета МГУ. *Тел.:* (495)939-14-62; *e-mail:* burlakovao@mail.ru

Яшин Валерий Александрович — гл. специалист Института биофизики клетки РАН. *Тел.:* 8-4967-73-92-00; *e-mail:* yashin@rambler.ru

Погорелов Александр Григорьевич — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаборатории энергетики биологических систем, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН. *Тел.:* 8-4967-73-91-28; *e-mail:* agpogorelov@rambler.ru