

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ДО СТАДИИ ДВУХ БЛАСТОМЕРОВ ПОСЛЕ МИКРОИНЪЕКЦИИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ

С.В. Максименко<sup>\*</sup>, Е.С. Савченко, Н.С. Огнева

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»  
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Преимплантационные эмбрионы мышей на сегодняшний день остаются самой популярной моделью, которая обычно используется для исследования раннего развития млекопитающих. Культивирование доимплантационных зародышей млекопитающих вне организма является необходимым звеном при проведении экспериментально-эмбриологических исследований, а также эмбриотехнологических работ по клонированию и получению трансгенных животных. Нормальный рост и дифференцировка эмбрионов млекопитающих *in vitro* во время доимплантационного периода зависят от наличия соответствующих метаболических субстратов. Вот почему так важно подобрать оптимальные условия культивирования при работе с микроинъекцированными эмбрионами, поскольку любые манипуляции снижают их жизнеспособность, что особенно важно при получении трансгенных животных.

Для определения наиболее эффективной культуральной среды нами было проведено исследование выживаемости эмбрионов мыши после микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы и дальнейшего культивирования на питательных средах M16 и Onestep. Было отмечено увеличение количества эмбрионов, развившихся до стадии двух бластомеров на среде Onestep, по сравнению со средой M16. Также были выявлены различия в двух контрольных группах, эмбрионы в которых не подвергались микроинъекции, но культивировались на этих же средах в тех же условиях, что и эмбрионы опытных групп. Более эффективной средой для культивирования интактных эмбрионов оказалась среда Onestep, в которой процент выживших эмбрионов был больше, чем в среде M16.

**Ключевые слова:** эмбрион, культуральная среда, микроинъекция в пронуклеусы зигот, трансгеноз  
**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Максименко С.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С. Культивирование эмбрионов мышей на различных питательных средах до стадии двух бластомеров после микроинъекции генно-инженерной конструкцией. *Биомедицина*. 2021;17(3E):53–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-53-58>

Поступила 25.04.2021

Принята после доработки 28.06.2021

Опубликована 20.10.2021

## CULTIVATION OF MICE EMBRYOS ON VARIOUS NUTRIENT MEDIA UP TO THE STAGE OF TWO BLASTOMERS AFTER THE MICROINJECTION OF A GENETICALLY-ENGINEERED CONSTRUCT

Sergey V. Maksimenko\*, Elena S. Savchenko, Nastasya S. Ogneva

*Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1*

The normal growth and differentiation of mammalian embryos *in vitro* during the pre-implantation period depends on the availability of appropriate metabolic substrates. Selection of optimal cultivation conditions when working with microinjected embryos is of significance, since any manipulations can reduce their viability. This is particularly important when obtaining transgenic animals. In order to determine the most effective culture medium, we studied the survival of mouse embryos after the microinjection of a genetically engineered construct into the pronuclei and further cultivation on the M16 and Onestep nutrient media. Compared to the M16 medium, an increase in the number of embryos that developed to the stage of two blastomeres on the Onestep medium was observed. Differences were also revealed in the two control groups, the embryos in which were not subjected to microinjection, but were cultured on the same media under the same conditions as the embryos of the experimental groups. We found that the Onestep medium, in which the percentage of survived embryos exceeded that in the M16 medium, is a more efficient medium for the cultivation of intact embryos.

**Keywords:** embryo, culture medium, microinjection into zygote pronuclei, transgenesis

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Maksimenko S.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S. Cultivation of Mice Embryos on Various Nutrient Media up to the Stage of Two Blastomeres after the Microinjection of a Genetically-Engineered Construct. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):53–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-53-58>

Submitted 25.04.2021

Revised 28.06.2021

Published 20.10.2021

### Введение

Качество эмбрионов является ключевым фактором для осуществления успешного экстракорпорального оплодотворения, поскольку преимплантационные эмбрионы млекопитающих оказываются чувствительными к среде, в которой они развиваются, и эта чувствительность может привести к долгосрочным изменениям характеристик роста и фенотипа плода в послеродовом периоде, что имеет значение для клинического здоровья животных [5, 8].

Условия культивирования глубоко влияют на регуляцию эпигенетических генов у эмбрионов и могут иметь серьёзные последствия для здоровья потомства во взрослом возрасте. Качество и количество куль-

тивируемых эмбрионов, концентрация кислорода, наличие кумулюсных клеток и энергетических субстратов оказывают влияние на жизнеспособность и развитие эмбрионов [7].

Потенциал развития и жизнеспособность эмбрионов, культивируемых *in vitro*, постепенно снижается в процессе культивирования, несмотря на огромные достижения в области культуральных сред и условий культивирования. Разработка предимплантационных питательных сред для эмбрионов оказала существенное влияние на технологии вспомогательной репродукции и на исследования физиологии ранних эмбрионов. С помощью культивирования эмбрионов в условиях *in vitro* были описаны множество

аспектов эмбрионального развития млекопитающих, относящихся к морфологии, физиологии и молекулярным аспектам эмбриогенеза [3]. Помимо улучшения питательных сред, относительно мало исследований проводится по определению физических требований эмбрионов, культивируемых *in vitro*. Поэтому исследования, которые проводятся в этой области, до сих пор считаются актуальными. В настоящее время предпочтительной системой является культивирование в каплях, покрытых слоем минерального или парафинового масла на поверхности чашки Петри [4]. Для обеспечения развития преимплантационных эмбрионов *in vitro* важно использовать растворы с правильно подобранными компонентами в оптимальных концентрациях, а также наиболее приемлемый газовый состав атмосферы, в которой осуществляется данный процесс [2]. Основные направления развития методов культивирования эмбрионов млекопитающих включают в себя тщательный подбор условий *in vitro* для максимального повторения условий, окружающих эмбрион *in vivo* [3]. При создании питательных сред исследователи используют два основных подхода: «back-to-nature», когда компоненты и их концентрации стараются сделать максимально приближенными по составу к таковым репродуктивных путей, и «let embryo choose», когда их состав подбирают эмпирическим путём [9].

**Целью** этого исследования являлось сравнение эффективности двух коммерческих питательных сред — M16 и Onestep — при культивировании интактных эмбрионов мыши и эмбрионов после микроинъекции генно-инженерной конструкцией.

## Материалы и методы

### Гормональная подготовка самок-доноров

В качестве самок-доноров были использованы самки F1 мышей-гибридов C57BL/6 × CBA/Jac в возрасте 3 недели и массой 18–

20 г, полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Мышей содержали в виварии с контролируемой температурой и освещением, на стерилизованной подстилке, со свободным доступом к пище и воде, при световом периоде 12 ч света и 12 ч темноты.

Для вызывания суперовуляции использовали метод гормональной стимуляции — самкам в первый день в 14<sup>00</sup> внутрибрюшинно вводили по 7,5 Ед препарата, содержащего сыворотку жеребых кобыл (Сергон, Чехия), а через 47 ч внутрибрюшинно вводили 7,5 Ед хорионического гонадотропина человека («Московский эндокринный завод», Россия). После введения хорионического гонадотропина подсаживали самок к плодовитым самцам-гибридам из расчёта 1:1. Результативность оплодотворения определяли по наличию копуляционной пробки на следующий день. Самок с копуляционными пробками считали оплодотворёнными.

### Получение зигот

#### от самок-доноров эмбрионов

Самок-доноров умерщвляли путём дислокации шейных позвонков и обрабатывали 70% р-ром этилового спирта. Избыток спирта удаляли с помощью стерильной фильтровальной бумаги и стерильными инструментами производили послойное рассечение кожи и брюшной стенки для получения доступа к яичникам. С помощью стерильных ножниц и пинцета извлекали яйцеводы с ооцит-кумулюсными комплексами и помещали их в каплю манипуляционной среды M2 (“Sigma Aldrich”) объёмом 50 мкл. Далее под малым увеличением светового микроскопа стерильной инъекционной иглой вскрывали ампулярное пространство, извлекали ооцит-кумулюсные комплексы и помещали их в отдельную каплю с гиалуронидазой, активность которой составляла 50 МЕ/мл, для удаления кумулюсных масс. После очистки от кумулюс-

ных масс эмбрионы последовательно отмывали в трёх каплях с манипуляционной средой M2 и помещали в каплю под слоем лёгкого минерального масла.

### **Микроинъекция генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот**

Для микроинъекции отбирали оплодотворённые эмбрионы хорошего качества с двумя чётко просматриваемыми пронуклеусами. Эмбрионы были помещены в камеру Фон-Брюна с каплей манипуляционной среды M2, окружённой минеральным маслом (“Sigma Aldrich”), чтобы предотвратить испарение.

Микроинъекцию проводили в более крупный мужской пронуклеус зиготы иглой диаметром до 1 мкм на световом инвертированном микроскопе Nikon, оснащённом оптикой Номарского и микроманипуляторами Eppendorf InjectMan 4. Генно-инженерная конструкция содержалась в буфере TE для инъекций (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4), рабочая концентрация составляла 5–6 нг/мкл. Степень наполнения пронуклеуса определяли визуально.

### **Культивирование эмбрионов**

После микроинъекции эмбрионы помещали в предварительно загазованные культуральные среды M16 (“Sigma Aldrich”) и Onestep (“Vitromed”) в каплях среды объёмом 36 мкл под лёгким минеральным ма-

слом в газовой фазе, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, при температуре 37°C и культивировали в течение 24 ч до стадии двух бластомеров. Культуральные среды не менялись в течение культивирования.

### **Результаты и их обсуждение**

Для выявления эффективности культивирования все эмбрионы были разделены на четыре группы (две опытные и две контрольные). Эмбрионы первой опытной группы в количестве 159 штук были микроинъецированы генно-инженерной конструкцией и поставлены на культивирование в среде M16, а эмбрионы второй опытной группы в количестве 158 штук — в среде Onestep. Среда M16 была выбрана как наиболее часто используемая стандартная среда для культивирования эмбрионов мыши *in vitro* [6].

В контрольных группах эмбрионы культивировались в тех же средах, но микроинъекция не проводилась. Количество эмбрионов контрольной группы в среде M16 составило 165 штук, а в среде Onestep — 156 штук соответственно (табл.).

Таким образом, среда Onestep эффективнее M16 на 3,1% при культивировании микроинъецированных эмбрионов, и на 2,2% — при культивировании интактных эмбрионов. Из этого следует, что культуральная среда Onestep эффективнее, чем среда M16, и является более предпочти-

**Таблица.** Сравнение эффективности культуральных сред при культивировании микроинъецированных и интактных эмбрионов

**Table.** Comparison of the efficiency of culture media during the cultivation of microinjected and intact embryos

| Экспериментальная группа                                  | Количество эмбрионов, поставленных на культивирование | Количество прородившихся эмбрионов после культивирования | Процент прородившихся эмбрионов |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Опытная № 1 (среда M16, микроинъецированные эмбрионы)     | 159                                                   | 145                                                      | 91,2                            |
| Опытная № 2 (среда Onestep, микроинъецированные эмбрионы) | 158                                                   | 149                                                      | 94,3                            |
| Контрольная № 1 (среда M16, интактные эмбрионы)           | 166                                                   | 159                                                      | 95,8                            |
| Контрольная № 2 (среда Onestep, интактные эмбрионы)       | 156                                                   | 153                                                      | 98,0                            |

тельной для использования при получении трансгенных мышей.

## Заключение

Чтобы успешно реализовывать биотехнологические программы, а также для проведения фундаментальных исследований на эмбрионах необходимо создание оптимальных культуральных систем, обеспечивающих полноценное развитие эмбрионов вне организма.

В настоящее время существует разнообразие питательных сред для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих. Качественный

и количественный состав этих сред может оказывать существенное влияние на пре- и постимплантационное развитие [2].

При получении трансгенных мышей необходимо проводить тщательное тестирование различных систем культивирования эмбрионов, а также осуществлять подбор культуральных сред, чтобы максимально эффективно использовать имеющийся биологический материал [1]. Поскольку на сегодняшний день исследователям может быть предложено большое количество различных питательных сред, необходимость выявления наиболее эффективной культуральной среды остаётся одной из главных задач.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Вильянович Л.И., Кривохарченко А.С. Культивирование двухклеточных эмбрионов мышей *in vitro* в среде DMEM без белка. *Проблемы репродукции*. 1999;4:22–25. [Vilyanovich L.I., Krivokharchenko A.S. Kul'tivirovanie dvukletochnykh embrionov myshey *in vitro* v srede DMEM bez belka [In vitro cultivation of two-cell mouse embryos in DMEM medium without protein]. *Reproduction problems*. 1999;4:22–25. (In Russian)].
2. Раннева С.В., Брусенцева Е.Ю., Игонина Т.Н., Параева Д.С., Рожкова И.Н., Ершова Н.И., Левинсон А.Л., Амстиславский С.Я. Влияние культивирования эмбрионов на онтогенез потомства у млекопитающих. *Онтогенез*. 2020;51(6):417–439. [Ranneva S.V., Brusentseva E.Yu., Igonina T.N., Ragaeva D.S., Rozhkova I.N., Ershova N.I., Levinson A.L., Amstislavsky S.Ya. Vliyanie kul'tivirovaniya embrionov na ontogenez potomstva u mlekopitayushchikh [The influence of embryo cultivation on the ontogeny of offspring in mammals]. *Ontogenesis*. 2020;51(6):417–439. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0475145020060075.
3. Baltz J.M. Connections between preimplantation embryo physiology and culture. *J. Assist Reprod. Genet.* 2013;30(8):1001–1007. DOI: 10.1007/s10815-013-0095-x.
4. Dai S.-J., Xu Ch.-L., Wang J., Sun Y.-P. Effect of culture medium volume and embryo density on early mouse embryonic development: Tracking the development of the individual embryo. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012;29(7):617–623. DOI: 10.1007/s10815-012-9744-8.
5. Fleming T.P., Wing Y.K., Porter R., Ursell E., Fesenko I., Wilkins A., Miller D.J., Watkins A.J., Eckert J.J. The embryo and its future. *Biology of Reproduction*. 2004;71(4):1046–1054. DOI: 10.1095/biolreprod.104.030957.
6. Hogan B., Costantini F., Lacy E. *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1986:332.
7. Khurana N.K., Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*. 2020;54(5):741–756. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00387-3.
8. Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed *in vitro*. *Genes (Basel)*. 2011;2(2):332–344. DOI: 10.3390/genes2020332.
9. Summers M.C., Biggers J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. *Hum. Reprod. Update*. 2003;9(6):557–582. DOI: 10.1093/humupd/dmg039.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Максименко Сергей Васильевич\***, к.б.н.,  
ФГБУН «Научный центр биомедицинских тех-  
нологий ФМБА России»;  
e-mail: [vx136@rambler.ru](mailto:vx136@rambler.ru)

**Sergey V. Maksimenko\***, Cand. Sci. (Biol.),  
Scientific Center of Biomedical Technologies  
of the Federal Medical and Biological Agency  
of Russia;  
e-mail: [vx136@rambler.ru](mailto:vx136@rambler.ru)

**Савченко Елена Сергеевна**, ФГБУН «Научный  
центр биомедицинских технологий ФМБА  
России»;  
e-mail: [savelaine@gmail.com](mailto:savelaine@gmail.com)

**Elena S. Savchenko**, Scientific Center  
of Biomedical Technologies of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [savelaine@gmail.com](mailto:savelaine@gmail.com)

**Огнева Настасья Сергеевна**, ФГБУН  
«Научный центр биомедицинских технологий  
ФМБА России»;  
e-mail: [ognevanastya@mail.ru](mailto:ognevanastya@mail.ru)

**Nastasya S. Ogneva**, Scientific Center  
of Biomedical Technologies of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [ognevanastya@mail.ru](mailto:ognevanastya@mail.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author