

## Использование метода микроинъекции для повышения эффективности выделения первичных колоний из бластоцист инбредных мышей в условиях культуры *in vitro*

Л.М. Межевкина<sup>1,2</sup>, Е.В. Храмцова<sup>1</sup>, Т.И. Смолихина<sup>1</sup>,  
И.В. Капралова<sup>1</sup>, Г.Ю. Косовский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», Пущино

<sup>2</sup> – ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий», Москва

Контактная информация: д.б.н. Межевкина Людмила Михайловна, [mezhevikina@rambler.ru](mailto:mezhevikina@rambler.ru)

Оценены перспективы использования метода микроинъекции для выделения из бластоцист инбредных линий мышей клеток внутренней клеточной массы и трофобласта – источников новых линий стволовых клеток эмбрионального происхождения. Показано, что после микроинъекции в полость бластоцисты 10 нл модифицированной среды Виттена и/или витальных красителей (0,03% трипанового синего и 0,1% фенолового красного) повреждается не более 4-5% клеток по ходу прокола. При этом происходят видимые изменения морфологии бластоцисты, которые практически полностью нивелируются в течение первых 24 ч инкубирования в модифицированной среде Виттена. Показано, что процедура микроинъекции не влияет на последующее развитие инъецированных бластоцист до стадии формирования *in vitro* первичных колоний, представляющих собой единую популяцию взаимодействующих между собой клеток внутренней клеточной массы и трофобласта.

Показано также, что механический прокол блестящей оболочки (*zona pellucida*) и осмотический шок от введения избыточного количества жидкости во внутреннюю полость бластоцисты способствуют выходу бластоцисты из *z. pellucida* и колониеобразованию (для мышей линий NMRI и SHK – до 93 и 78%, против 47 и 44% в контроле, соответственно).

Таким образом, микроинъекция небольших объемов сбалансированных по солево-ионному составу сред и/или растворов витальных красителей (не более 10 нл) может служить вспомогательным приемом для более эффективного выделения первичных колоний из бластоцист мышей с разным генотипом и создания на основе клеток внутренней клеточной массы и трофобласта новых экспериментальных моделей для медико-биологических исследований.

**Ключевые слова:** микроинъекция, стадия бластоцисты, клетки внутренней клеточной массы, трофобласт.

### Введение

Метод микроинъекции (МИ) широко используется в биомедицинских исследованиях для создания экспериментальных моделей химерных и трансгенных животных, изучения функций генов, факторов клеточной пролиферации и дифференцировки. Для этих целей широко используются

эмбрионы на стадии бластоцисты, характеризующиеся рядом морфологических особенностей – прежде всего, строгой локализацией недифференцированных плюрипотентных клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и полярных клеток трофобласта (ТБ), наличием внутренней полости и внешней оболочки – *zona pellucida*.

В условиях культуры *in vitro* на стадии бластоцисты возможна детерминация клеток ВКМ в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), либо в производные ТБ – трофобластические линии стволовых клеток [6, 11, 17, 18]. После извлечения из бластоцисты клетки ВКМ и ТБ обнаруживают способность к росту, пролиферации и спонтанным дифференцировкам *in vitro*. Однако их потенциал к дифференцировкам в разные типы клеток и ткани взрослого организма существенно различается. Хорошо известно, что после МИ только ЭСК встраиваются в развитие эмбриона и передают ему свои признаки по наследству [8, 11, 18, 19]. Потенциальные возможности трофобластических линий стволовых клеток несколько ниже, они могут дифференцироваться *in vitro* и *in vivo* только во внезародышевые ткани и органы. Тем не менее, все типы стволовых клеток эмбрионального происхождения представляют интерес как экспериментальные модели и как перспективные источники для клеточной терапии и трансплантологии.

Для реализации плюрипотентного потенциала стволовых клеток *in vitro* и после МИ в бластоцисту реципиента существенное значение имеет генотип эмбриона, из которого эти клеточные культуры были первоначально выделены. В частности, большинство генетически стабильных линий ЭСК мыши получены из эмбрионов мышей линии 129/Sv или же их потомков от скрещивания – 129/Sv x 129/Sv-CP [9, 13, 14]. Полагают, что генетическая стабильность ЭСК связана с предрасположенностью самцов 129/Sv к спонтанным тестикулярным тератокарциномам (каталоги линий мышей: <http://www.jax.org>

и <http://www.taconic.com>). Другим лимитирующим фактором на этапе выделения стабильных линий ЭСК является количество «доступных» бластоцист. В первую очередь, это касается редких и особо ценных видов животных, а также человека, от которых получить большое количество эмбрионов на стадии бластоцисты достаточно проблематично из-за непростого решения ряда технических и этических вопросов.

Со стволовыми клетками эмбрионального происхождения в настоящее время сложилась парадоксальная ситуация, когда прикладные исследования значительно опережают фундаментальные знания о молекулярных механизмах их роста и дифференцировки. Несмотря на достигнутые успехи, многие вопросы в изучении ЭСК в системах *in vitro* и *in vivo* остаются нерешенными. Не определены факторы предварительного генотипирования эмбрионов для успешного выделения и создания генетически стабильных клеточных линий, не найдены универсальные индукторы дифференцировки ЭСК в одном направлении. Это создает проблемы на этапе получения монокультур для клеточной терапии и трансплантологии.

В связи с вышесказанным, разработка экспериментальных подходов для повышения эффективности выделения из доимплантационных эмбрионов клеток ВКМ и ТБ – предшественников ЭСК и трофобластических линий стволовых клеток – может иметь фундаментальное и прикладное значение для создания новых клеточных технологий для медицины и сельского хозяйства. Ранее нами было показано [1], что под влиянием цитокина LIF (leukemia inhibitory factor) у инбредных линий мышей повышается

эффективность выхода (hatching, «хетчинг») из *z. pellucida* с последующим формированием в культуре *in vitro* первичных колоний (ПК), представляющих собой единую популяцию клеток ВКМ и ТБ. Показано также, что ПК служат простой и адекватной моделью для изучения механизмов действия физических и химических факторов на процессы пролиферации, дифференцировки и гибели эмбриональных клеток *in vitro* [1, 3].

**Целью** настоящей работы явилась оценка перспектив использования метода МИ в качестве вспомогательного приема для повышения эффективности культивирования эмбрионов линейных мышей линий 129/Sv, NMRI и SHK. В связи с этим мы исследовали влияние процедуры МИ, сопряженной с механическим и осмотическим стрессом, на морфологию и жизнеспособность бластоцист до стадии хетчинга и образования ПК в зависимости от линейной принадлежности мышей.

### **Материалы и методы**

**Объекты исследования.** Для экспериментов использовали мышей инбредных линий 129/Sv и NMRI (коллекционный фонд ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) и SHK (питомник ФИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) средней массой 18-20 г в возрасте 6-8 недель. Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA). Для кормления использовали гранулированный пол-

норационный комбикорм для мышей (ООО «Лабораторкорм», Москва).

**Выделение эмбрионов на стадии бластоцисты.** Для выделения большого количества бластоцист применяли метод гормональной стимуляции самок гонадотропными гормонами: Фоллимаг, 10 ед. подкожно («Мосагроген», Россия), и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) (Московский эндокринный завод, Москва), 10 ед. внутривбрюшинно. Гормоны вводили с интервалом в 52 ч. Сразу после введения второго гормона (ХГЧ) самок подсаживали к самцам из расчета 1:1. Утром следующего дня отбирали животных с копулятивными пробками. День обнаружения пробки считали первым днем беременности.

Бластоцисты выделяли из рогов матки на 3,5 день беременности под контролем бинокулярной лупы Stemi DV4 (Zeiss, Германия). Эмбрионы отбирали без видимых признаков нарушения морфологии на стадиях средней и поздней бластоцисты. Для выделения и культивирования бластоцист использовали модифицированную среду Виттена (МСВ) с добавлением органического буфера NEPES.

**Микроинъекция (МИ).** Для МИ использовали микроманипулятор TransferMan NK (Eppendorf, Германия), оснащенный стандартными инъекционными капиллярами TransferTip-XR и VacuTip (Eppendorf, Германия). Все манипуляции проводили под инвертированным микроскопом IX-70 (Olympus, Япония) с объективами в модификации Хоффмана для лучшей визуализации прозрачных объектов. Во время проведения процедуры МИ поддерживали тургор на стадии бластоцисты путем разбавления МСВ дистиллированной

водой (10%). Для визуального контроля прокола внешней оболочки (*z. pellucida*) и плотного слоя клеток ТБ использовали витальные красители: 0,03% трипановый синий (Fluka, Швейцария) и 0,1% феноловый красный (Sigma, США). Растворы красителей и МСВ вводили во внутреннюю полость бластоцисты в объеме не более 10 нл.

**Оценка жизнеспособности.** Жизнеспособность бластоцист оценивали по изменению морфологии в ходе проведения процедуры МИ, а также по результатам культивирования инъецированных бластоцист *in vitro* до стадии хетчинга и последующего образования ПК. Внимание обращали на следующие характеристики: эффективность выхода бластоцист из *z. pellucida* (хетчинг), адгезия, количество и расположение в составе ПК клеток ВКМ и ТБ. Поврежденные клетки с нарушенными барьерными свойствами плазматических мембран выявляли с помощью 0,5% витального красителя трипанового синего (Fluka, Швейцария).

**Культивирование бластоцист.** Для культивирования бластоцист использовали 4-луночные эмбриологические чашки Петри (Nunc, Швейцария). В каждую лунку помещали по 5-6 бластоцист. Интактные бластоцисты, не подвергавшиеся МИ (контроль), и бластоцисты после МИ (опыт) культивировали в 200 мкл МСВ при 37°C и повышенной влажности в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе MC-15 (Sanyo, Япония). Через 48 ч культивирования в МСВ дополнительно вносили 10 нг/мл рекомбинантного белка LIF мыши (Sigma, ICN) и 10% инактивированной фетальной сыворотки телят (Sigma, HyClone, США). Длительность культивирования бластоцист в опыте и контроле составляла 7 суток.

**Активность эндогенной щелочной фосфатазы (ЭЩФ).** Плюрипотентные клетки ВКМ выявляли в бластоцистах и в составе ПК по активности ЭЩФ. Для этого эмбрионы и колонии фиксировали охлажденным ацетоном, инкубировали в течение 1 ч с цитохимическим реагентом  $\alpha$ -нафтол-AS-фосфатом (ICN, США) и красителем ВВ синим прочным (ICN, США) при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Растворы цитохимических реагентов готовили перед началом фиксации эмбрионов и колоний из расчета: 5 мг субстрата  $\alpha$ -нафтол-AS-фосфата; 0,25 мл ДМСО; 25 мл деионизированной воды (milliQ); 25 мл буфера Трис-НСl (pH 8,5); 25 мг азокрасителя ВВ синего прочного. Перед использованием раствор цитохимических реагентов фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры.

Принцип метода ЭЩФ заключается в превращении субстрата  $\alpha$ -нафтол-AS-фосфата под действием ЭЩФ в нафтол-AS-В1, который после взаимодействия с солью азокрасителя ВВ синего прочного выпадает в осадок и дает нерастворимый пигмент. Плюрипотентные эмбриональные клетки с высокой активностью ЭЩФ после 1 ч инкубирования с цитохимическими реагентами окрашиваются в темно-синий цвет.

**Иммуноцитохимический анализ фактора плюрипотентных клеток Nanog.** ПК на стадии поздней бластоцисты фиксировали охлажденным ацетоном, затем инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными моноклональными антителами мыши против белка-маркера Nanog в разведении 1:500 (Sigma, США). После тщательной отмывки в растворе фосфатного буфера (pH 7,4) препараты в течение 2 ч инкубировали при комнатной температуре 20-22°C со

вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с флуоресцентным красителем FITC разведении 1:300 (ИМТЭК, Россия). Препараты заключали под покровное стекло в раствор глицерина и PBS (1:1) и анализировали под инвертированным микроскопом Axiovert 40CFL (Zeiss, Германия) при длине волны 488 нм.

**Статистическая обработка результатов.** Количество клеток в бластоцисте подсчитывали с помощью компьютерной программы анализа изображения для цитофотометрии PhotoM. Статистическую обработку результатов проводили путем вычисления средних арифметических значений и среднего квадратичного отклонения, используя компьютерные программы Sigma Plot и Microsoft Office Excel. Для оценки статистической значимости различий в группах сравнения использовали t-критерий Стьюдента.

### **Результаты и их обсуждение**

Для ответа на вопрос, влияет ли процедура МИ на развитие доимплантационных эмбрионов инбредных линий мышей *in vitro*, во внутреннюю полость бластоцисты вводили в небольшом объеме (10 нл) растворы витальных красителей и/или сбалансированную по химическому составу МСВ. Использование витальных красителей было обусловлено тем обстоятельством, что процедура МИ требует постоянного визуального контроля проникновения растворов и/или клеток во внутреннюю полость бластоцисты, поскольку на этой стадии развития *z. pellucida* обладает повышенной эластичностью [4, 16]. Это позволяет ей глубоко вытягиваться за инъекционным капилляром внутрь эмбриона без нарушения целостности структуры внешней

оболочки. Кроме того, во время прохождения капилляра через плотный слой клеток ТБ, окружающих полость бластоцисты, велика вероятность растяжения и залипания плазматической мембраны на кончике капилляра, что может препятствовать проникновению жидкости и/или клеток в полость бластоцисты.

Было показано, что на стадиях средней и поздней бластоцисты введение во внутреннюю полость 10 нл растворов витальных красителей с помощью микроманипулятора TransferMan NK и инъекционного капилляра типа TransferTip-XR сопровождается прокалыванием *z. pellucida* без значительного нарушения морфологии эмбриона (рис. 1а-г). При этом оба красителя, 0,03% трипановый синий (рис. 1а-б) и 0,1% феноловый красный (рис. 1в-г), обнаруживаются в полости бластоцисты. После удаления инъекционного капилляра из полости бластоцисты остаются хорошо различимыми наружный слой ТБ и компактно расположенная в полости бластоцисты группа мелких клеток ВКМ (рис. 1б, г). А это означает, что на стадии бластоцисты мышинные эмбрионы могут сами регулировать свой объем и поддерживать точную структуру. Избыток жидкости, который не вмещается в полости бластоцисты и/или является критичным для сохранения морфологии бластоцисты, выходит через отверстие в области прокола в перивителлиновое пространство, затем – в окружающую среду (рис. 1а, в). Можно предположить, что таким способом бластоцисты мышей уравнивают осмотическое давление во внутренней полости, перивителлиновом пространстве и во внешней среде, что является одним из условий поддержания морфологии во время проведения МИ.

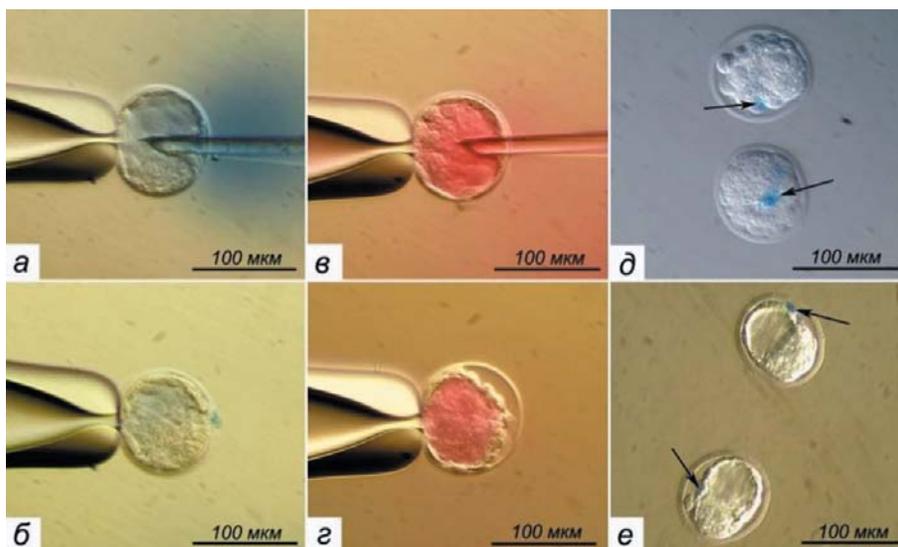


Рис. 1. Микроинъекция в полость бластоцисты витальных красителей (*a, б* – 0,03% трипанового синего; *в, з* – 0,1% фенолового красного); морфология бластоцисты сразу после микроинъекции 10 нл модифицированной среды Виттена (МСВ) (*д*) и через 24 ч культивирования (*е*) (тест с использованием 0,3% трипанового синего на выявление поврежденных клеток). Стрелками показаны нежизнеспособные клетки с поврежденными плазматическими мембранами по ходу прокола.

После снятия бластоцисты с фиксирующей присоски происходит резкое сокращение объема бластоцисты в результате быстрого выхода избытка жидкости из внутренней полости в перивителлиновое пространство. В этом случае наблюдаются структурные перестройки, сопровождающиеся исчезновением полости бластоцисты и перераспределением клеток ВКМ и ТБ относительно друг друга. На рис. 1д видно, что после МИ бластоцисты по своей морфологии соответствуют стадии компактной морулы: у них отсутствует полость, хорошо обозначено перивителлиновое пространство, отчетливо выделяются отдельные крупные клетки округлой формы – бластомеры. Аналогичные изменения происходят с бластоцистами после МИ в полость таких же объемов МСВ.

Наблюдаемые изменения морфологии после МИ растворов красителей (рис. 1д) нивелируют через 24 ч инкубирования в МСВ. В течение этого времени «компактные морулы» достигают стадии средней бластоцисты (рис. 1е). Восстанавливается полость, происходит разделение клеток на внешний слой ТБ и расположенную на одном из полюсов эмбриона группу клеток ВКМ. Было также установлено, что в ходе МИ повреждаются в основном клетки по ходу прокола (рис. 1д, обозначены стрелками). Другое, не менее важное, наблюдение касается автономной регуляции доимплантационного развития *in vitro*. Поврежденные и нежизнеспособные клетки, пропускающие витальный краситель трипановый синий, смещаются в направлении ТБ и через 24 ч инкубирования в МСВ обнаруживаются в перивителлиновом про-

странстве (рис. 1е). Они не принимают участия в дальнейшем развитии.

Изучение динамики восстановления морфологии инъецированных бластоцист путем их окрашивания трипановым синим свидетельствует о выходе этого красителя из полости бластоцисты в течение первых 3 ч инкубирования в МСВ (рис. 2). К этому времени в бластоцистах обнаруживается не более 10% поврежденных и нежизнеспособных клеток с нарушенными барьерными свойствами плазматических мембран. При увеличении длительности инкубирования их доля прогрессивно снижается, как мы полагаем, за счет отторжения в перивителлиновое пространство. При этом показано, что состав инъекционной среды (0,03% трипановый синий и/или МСВ) не влияет на физические характеристики восстановления морфологии бластоцист (рис. 2). В обоих вариантах МИ нежизнеспособные клетки обнаруживались только у 1/3 бластоцист ( $31,0 \pm 6,9\%$ ). Их количество из расчета на одну бластоцисту через сутки культивирования в МСВ составляет  $4,7 \pm 1,9\%$

от общей клеточной численности на этой стадии развития (рис. 2).

Динамика восстановления морфологии бластоцисты после МИ, место локализации поврежденных клеток по ходу прокола и последующее их отторжение в перивителлиновое пространство указывают на пластичность морфологии и устойчивость мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты к осмотическому и механическому стрессу, вызванному этой процедурой. Компенсаторные механизмы позволяют бластоцистам восстанавливать после МИ не только морфологию, но и устранять поврежденные клетки из участия в процессах развития. Специфика этой стадии такова, что сама процедура введения дополнительного объема жидкости во внутреннюю полость (в т.ч. и 0,03% раствора трипанового синего) не приводит к снижению потенциала к последующему развитию до стадии выхода бластоцисты из *z. pellucida* и образования ПК *in vitro* (табл. 1).

Из результатов, представленных в табл. 1, становится очевидным, что после МИ 0,03% раствора трипанового синего

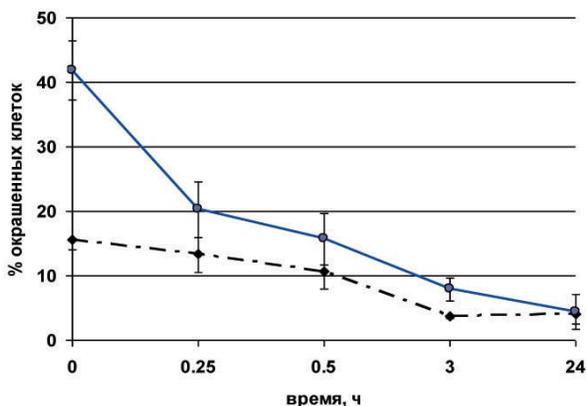


Рис. 2. Диффузия витального красителя трипанового синего и изменение количества окрашенных клеток после микроинъекции в полость бластоцисты среды Витгена (черная пунктирная линия) и 0,03% трипанового синего (синяя линия).

Таблица 1

Эффективность культивирования бластоцист мышей линии SHK после микроинъекции в полость 0,03% раствора трипанового синего

Группы	Количество бластоцист <i>in vitro</i>	% первичных колоний <i>in vitro</i>		
		48 ч	72 ч	96 ч
МИ, 0,03% трипановый синий (опыт)	56	65,5±1,7	70,1±1,9*	72,9±2,0*
Интактные бластоцисты (контроль)	38	61,2±3,7	45,8±2,1	43,8±3,1

Примечание: в полость каждой бластоцисты вводили 10 нл 0,03% раствора трипанового синего в модифицированной среде Виттена с органическим буфером Hepes (pH 7,2).

\* – различия между опытной и контрольной группами зародышей ( $t_s=2,6$ ;  $p<0,04$ ).

эффективность образования ПК повышается примерно в 2 раза по сравнению с интактными бластоцистами в контроле. Аналогичная картина выявляется у мышей линии NMRI после МИ в полость бластоцисты 10 нл МСВ (табл. 2).

Сравнительный анализ эмбрионов инбредных мышей линий NMRI, SHK и 129/Sv по их способности к хетчингу и продукции ПК в условиях *in vitro* (рис. 3А) свидетельствует о стимулирующем влиянии процедуры МИ на эти процессы (рис. 3Б). У разных

линий мышей механический прокол *z. pellucida* способствует выходу бластоцисты через поврежденную оболочку, в результате чего повышается вероятность образования ПК. Следует также отметить, что после МИ нивелируют межлинейные различия по способности бластоцист продуцировать ПК *in vitro*.

Обращает на себя внимание тот факт, что хетчинг у всех трех исследованных нами линий мышей в опыте и контроле происходит примерно в одно и то

Таблица 2

Эффективность культивирования *in vitro* бластоцист мышей линии NMRI после микроинъекции в полость модифицированной среды Виттена

Группы	Количество эксплантированных бластоцист в культуру	Доля бластоцист в виде первичных колоний <i>in vitro</i> , %		
		2 суток	3 суток	7 суток
Инъекция 10 нл МСВ (опыт)	147	97,6±2,4*	90,1±5,7*	88,7±7,0*
Интактные бластоцисты (контроль)	82	69,1±2,2	51,5±8,4	47,3±21,3

Примечание: МСВ – модифицированная среда Виттена.

\* – достоверность различий между бластоцистами в опытной и контрольной группах ( $t_s=2,0$ ;  $p<0,07$ ).

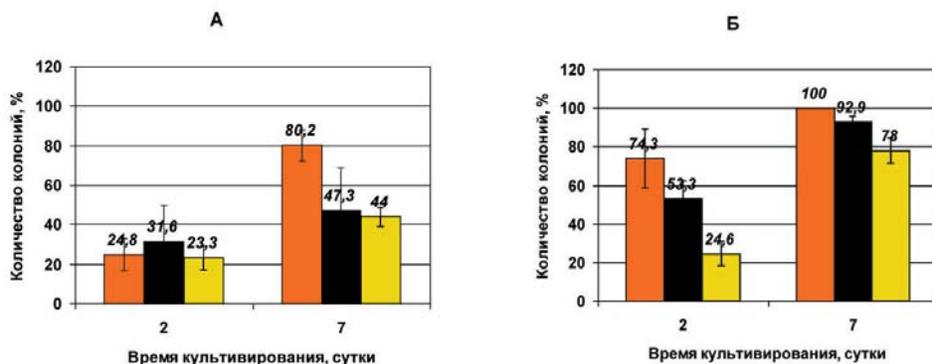


Рис. 3. Количество адгезивных бластоцист после выхода из *z. pellucida* и первичных колоний клеток ВКМ и ТБ на 2-е и 7-е сутки культивирования соответственно: А – интактные бластоцисты, Б – после микроинъекции в полость бластоцисты 10 нл модифицированной среды Виттена (МСВ).

■ – линия 129/Sv, ■ – NMRI, ■ – SHK.

же время – как правило, на 2-е сутки культивирования (рис. 3А, Б). К этому времени из оболочки выходит не более 20-30% интактных бластоцист, способных к адгезии и последующему росту в виде ПК. После МИ процессы хетчинга усиливаются у мышей 129/Sv и NMRI (74 и 53% соответственно). В контроле максимальное количество ПК обнаруживается на 7-е сутки культивирования у мышей 129/Sv (80,2±7,9%), что достоверно выше, чем у мышей линий NMRI и SHK ( $p < 0,01$ ). После МИ эффективность формирования ПК из бластоцист мышей линий NMRI и SHK достигает 93 и 78% соответственно, что близко к уровню колониеобразования (80-100%) у мышей линии 129/Sv (рис. 3Б).

Хетчинг и способность бластоцист инбредных линий мышей к адгезии и росту в виде ПК являются объективными характеристиками морфофункционального состояния *in vitro*. Оба показателя демонстрируют готовность эмбриона к имплантации. Согласно нашим наблюдениям, из адгезивных бластоцист, лишенных *z. pellucida* (рис. 4Б), вначале мигрируют

клетки ТБ. Они создают фидерную подложку для клеток ВКМ, расположенных в центре ПК (рис. 4а-в). Результаты тестирования на выявление факторов стволовых клеток, ЭЩФ и Nanog, подтверждают гетерогенность ПК по клеточному составу (рис. 4в-е). Полярные клетки ТБ не обнаруживают активности ЭЩФ (рис. 4г), но они продуцируют транскрипционный фактор плюрипотентных клеток Nanog (рис. 4е), указывающий на способность дифференцироваться в составе химерного эмбриона [7, 10, 15].

В литературных данных есть свидетельства о дифференцировке клеток ТБ в гигантские трофобластические клетки [11]. На стадии бластоцисты выделяют трофобластические линии стволовых клеток [6, 11, 18, 23]. Более того, усиление продукции транскрипционного фактора Nanog используют в трансгенных конструкциях для получения генетически стабильных линий ЭСК мыши и человека [7, 15]. Высокая активность этого фактора сдвигает развитие клеток ВКМ в направлении внезародышевой энтодермы [15]. Схожие процессы про-

исходят с клетками ВКМ в составе целого эмбриона в зависимости от места их расположения и локальных взаимодействий с клетками ТБ [20].

Таким образом, с помощью техники МИ и последующего культивирования инъецированных бластоцист в МСВ, можно значительно повысить эффективность образования в культуре ПК – источников Nanog-позитивных клеток ВКМ и ТБ (рис. 4е). В этом плане перспективы метода МИ очевидны (рис. 3Б) как для

создания новых экспериментальных моделей, так и для успешного выделения Nanog-позитивных клеточных линий из мышей с разным генотипом. Сама процедура МИ, сопровождающаяся проколом внешней оболочки и кратковременным механическим/осмотическим стрессом, вызывает обратимые структурные перестройки и не приводит к остановке развития (табл. 1, 2). К настоящему времени установлено, что нарушение целостности *z. pellucida* или даже отсутствие та-

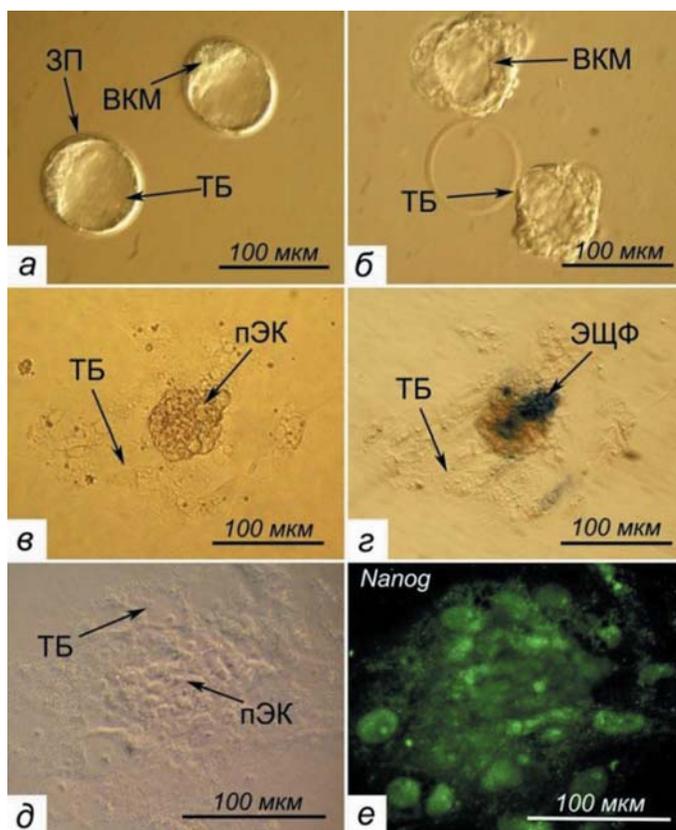


Рис. 4. Морфология эмбрионов мышей линии NMRI: а – интактные бластоцисты (стадия поздней бластоцисты); б – на 2-е и в, д – 7-е сутки культивирования в модифицированной среде Виттена с 10% фетальной сыворотки телят и 10 нг/мл рекомбинантного белка LIF мыши; г – окрашивание ЭЩФ; е – иммуноцитохимическое выявление транскрипционного фактора стволовых клеток Nanog.

ЗП – зона пеллюцида (*zona pellucida*), ВКМ – клетки внутренней клеточной массы, ТБ – клетки трофобласта, пЭК – первичные эмбриональные клетки – производные клеток ВКМ, ЭЩФ – эндогенная щелочная фосфатаза.

ковой не являются препятствием для успешного развития бластоцист после трансплантации в матку приемным матерям [12, 22]. В репродуктивной медицине известны приемы для создания механических отверстий в *z. pellucida*, чтобы облегчить хетчинг эмбрионов с целью повышения их выживаемости после низкотемпературной консервации в жидком азоте и трансплантации [2].

Прокол *z. pellucida* во время проведения МИ делает бластоцисты инбредных линий NMRI и SHK более доступными для выделения клеток ТБ и ВКМ с высокой активностью фактора Nanog (табл. 1 и 2, рис. 4е). В условиях *in vivo* хетчинг происходит на стадии бластоцисты при участии клеток ТБ, контролирующими ионный транспорт и перенос воды в полость бластоцисты [5, 21, 24]. Они играют ключевую роль в регулировании объемного гомеостаза после МИ и кратковременного осмотического стресса [4], первыми мигрируют из *z. pellucida* и формируют фидерную подложку для клеток ВКМ в составе ПК (рис. 4в-е). Высокая пролиферативная активность и миграционная способность клеток ТБ необходимы как для поддержания и восстановления морфологии бластоцисты после МИ, так и для последующего развития бластоцист *in vitro*.

### **Заключение**

Таким образом, МИ небольших объемов сбалансированных по солевому составу сред и/или растворов витальных красителей (10 нл) может служить вспомогательным приемом для более эффективного выделения ПК из бластоцист мышей с разным генотипом, а также делает процедуру выделения клеток ВКМ и ТБ более доступной и эффективной.

Такой подход может иметь решающее значение для создания новых клеточных линий и технологий для медико-биологических исследований.

### **Список литературы**

1. **Межевкина Л.М., Федорова В.В., Капралова И.В., Фесенко Е.Е.** Повышение выживаемости доимплантационных зародышей мыши в среде с рекомбинантным цитокином LIF // *Онтогенез*. 2006. Т. 37. № 1. С. 55-62.
2. **Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я.** Оболочки преимплантационных зародышей млекопитающих как мишень репродуктивных технологий // *Онтогенез*. 2012. Т. 43. № 5. С. 309-319.
3. **Сахарова Н.Ю., Межевкина Л.М., Смирнов А.А., Вихлянцева Е.Ф.** Анализ действия синего света на морфофункциональное состояние бластоцист при культивировании *in vitro* с использованием мышей, несущих ген улучшенного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2014. № 1. С. 52-56.
4. **Храмцова Е.А., Межевкина Л.М., Фесенко Е.Е.** Роль клеток трофобласта в регуляции выживаемости бластоцист мыши *in vitro* после микроинъекции и осмотического шока // *Биофизика*. 2014. Т. 49. Вып. 2. С. 314-321.
5. **Barcroft L.C., Offenberger H., Thomsen P., Watson A.J.** Aquaporin proteins in murine trophoblast mediate transepithelial water movements during cavitations // *Dev. Biol.* 2003. V. 256. Pp. 342-254.
6. **Buecker C., Chen H.H., Polo J.M., Daheron L., Bu L., Barakat T.S., Okwieka P., Porter A., Gribnau J., Hochedlinger K., Geijsen N.** A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. № 6. Pp. 535-546.
7. **Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A.** Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell*. 2003. V. 113. Pp. 643-655.
8. **Fedorov L.M., Haegel-Kronenberger H., Hirschenthal J.** A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants // *Transgenic Research*. 1997. V. 6. Pp. 223-231.
9. **Gao S., McGarry M., Ferrier T., Pallante B., Gasparini B., Fletcher J., Harkness L., De Sousa P., McWhir J., Wilmot I.** Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line // *Biol. reprod.* 2003 V. 68. № 2. Pp. 595-603.
10. **Guo J., Jauch A., Holtgreve-Grez H., Schoell B., Erz D., Schrank M., Janssen J.W.G.** Multicolor karyotype analyses of mouse embryonic stem cells *in vitro* // *Cell. devel. biol. animal*. 2005. V. 41. Pp. 278-283.

11. Hanna J., Chenga A.W., Saha K., Kim J., Lenger C.J., Soldner F., Cassidy J.P., Muffat J., Carey B.W., Jaenisch R. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 20. Pp. 9222-9227.
12. Hwang W.S., Lee E., Chung Y., et al. Intactness of zona pellucida does not affect the secretion of a trypsin-like protease from mouse blastocyst // J. Korean. med. sci. 2000. V. 15. № 5. Pp. 529-532.
13. Kawase E., Suemori H., Takahashi N., Okazaki K., Hashimoto K., Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines // Int. J. dev. biol. 1994. V. 38. № 2. Pp. 385-390.
14. Kim H.S., Oh S.K., Park Y.B., Ahn H.S., Kim S.H., Kim D.-W., Moon S.Y. Methods for derivation of human embryonic stem cells // Stem cells. 2005. V. 23. Pp. 1228-1233.
15. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells // Cell. 2003. V. 113. Pp. 631-642.
16. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual // Cold spring harbor laboratory press. - New York. 2003.
17. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor // Cell. 1998. V. 95. № 30. Pp. 379-391.
18. Rossant J. Stem cells from the mammalian blastocyst // Stem Cells. 2001. V. 19. Pp. 477-482.
19. Suzuki H., Kamada N., Ueda O., Jishage K., Kurihara Y., Kurihara H., Terauchi Y., Azuma S., Kadowaki T., Kodama T., Yazaki Y., Toyoda Y. Germ-line contribution of embryonic stem cells in chimeric mice: influence of karyotype and *in vitro* differentiation ability // Exp. Anim. 1997. V. 46. № 1. Pp. 17-23.
20. Tam P.P., Zhou S.X. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo // Dev. biol. 1996. V. 178. № 1. Pp. 124-132.
21. Watson A.J., Barcroft L.C. Regulation of blastocyst formation // Frontiers in Bioscience. 2001. V. 6. Pp. 708-730.
22. Wiemer K.E., Garrisi J., Steuerwald N., et al. Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in vitro fertilization patients // Hum. reprod. 1996. V. 11. № 11. Pp. 2429-2433.
23. Yagi R., Kohn M.J., Karavanova I., Kaneko K.J., Vullhorst D., DePamphilis M.L., Buonanno A. Transcription factor TEAD4 specifies the trophoblast lineage at the beginning of mammalian development // Development. 2007. V. 134. Pp. 3827-3836.
24. Yamanaka Y., Ralston A., Stephenson R.O., Rossant J. Cell and molecular regulation of mouse blastocyst // Developmental dynamics. 2006. V. 235. № 9. Pp. 2301-2314.

## Microinjection as a method to increase the efficiency of isolation of primary colonies from inbred mice blastocysts *in vitro*

L.M. Mezhevikina, E.V. Khramtsova, T.I. Smolikhina, I.V. Kapralova, G.Yu. Kosovsky

We have estimated a perspective of the microinjection (MI) for isolation from blastocysts inbred mouse cells of the innercell mass (ICM) and trophoblast (TB) – sources of new stem cell lines of embryonic origin. It is shown that microinjection into the cavity of the blastocyst 10nl Witten's medium and/or vital dyes (0.03% trypan blue and 0.1% phenol red) leads to damage of not more than 4-5% of the cells. In the process there are visible changes in the morphology of the blastocyst, which are almost completely leveled out during the first 24 h of incubation in the Witten's medium.

It was revealed that microinjection procedure doesn't affect the subsequent development of the injected blastocyst to stage of primary colonies formation *in vitro* as a single population of interacting innercell mass and trophoblast. It's also shown that the mechanical puncture of shiny shell (zona pellucida) and osmotic shock from the introduction of excessive amounts of fluid into the internal blastocyst cavity contribute to blastocyst outputting from zona pellucida and to colony formation (for NMRI and SHK cell lines up to 93 and 78 to 47 and 44% in control, respectively).

Thus, microinjection small volumes of medium balanced by salt composition and/or solutions of vital dyes (less than 10 nl) can serve a sauxiliary method to increase the efficiency of isolation of primary colonies from inbred mice blastocysts with different genotype and to create new experimental models for biomedical research.

**Key words:** microinjection, stage of blastocyst, cells of the inner cell mass, trophoblast.