

## Выживаемость NGF-модифицированных эмбриональных стволовых клеток мышцы в составе многоклеточной бластоцисты

Л.М. Межевикина, Е.А. Храмцова, Е.Е. Фесенко

ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Московская область

Контактная информация: Межевикина Людмила Михайловна, [mezhevikina@rambler.ru](mailto:mezhevikina@rambler.ru)

Исследовано влияние микроокружения на рост и выживаемость NGF-модифицированных эмбриональных стволовых клеток (NGF-ЭСК) мышцы с экспрессией зеленого флуоресцирующего белка GFP в составе многоклеточной бластоцисты. Показано, что после микроинъекции NGF-ЭСК мигрируют и встраиваются преимущественно в область расположения клеток внутренней клеточной массы (ВКМ). Они продуцируют NGF и GFP и могут пролиферировать в составе химерной бластоцисты. При увеличении длительности культивирования химерных бластоцист до 120 ч наблюдается снижение интенсивности флуоресценции белка GFP, секреция NGF не обнаруживается.

Полагаем, что это происходит в результате перепрограммирования NGF-ЭСК под влиянием клеток ВКМ, в результате чего подавляется экспрессия NGF/GFP и, следовательно, преждевременная дифференцировка ЭСК в направлении нейроэктодермы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что микроокружение и клеточные взаимодействия играют решающую роль в процессах перехода NGF-ЭСК из состояния плюрипотентности к нейральной дифференцировке, которая является базой на ранних стадиях развития.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, микроинъекция, бластоциста, плюрипотентность, дифференцировка, фактор роста нервов (NGF).

### Введение

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мышцы и их клональные потомки, полученные путем генетических модификаций, служат моделями для изучения механизмов роста и дифференцировки, получения химерных и трансгенных животных, исследования функций генов. Являясь производными клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) на стадии бластоцисты, ЭСК сохраняют в культуре *in vitro* и после микроинъекции (МИ) в бластоцисту свой плюрипотентный потенциал, могут дифференцироваться в клетки и ткани взрослого организма [7-9, 12, 17]. Метод МИ ЭСК в бластоцисты является одним из приемов для обновления линии и получения

гомогенной клеточной популяции [1, 24]. Он нашел применение и для изучения пластичности тканеспецифичных стволовых клеток [14, 21]. В частности, установлено, что нейральные стволовые клетки встраиваются преимущественно в гемопоэтическую линию клеток зародышей и взрослых мышей, в меньшей степени – в ткани нервной системы [11].

На данный момент получены клоны нейральных и мезенхимных стволовых клеток костного мозга, модифицированные геном *Ngf*, ответственным за продукцию фактора роста нервов NGF (Nerve Growth Factor) [26]. Этот фактор необходим для поддержания жизнеспособности периферических нейронов, происходящих из нервного гребня, и

нейронов головного мозга [22]. Он участвует в формировании болевой чувствительности [16] и в процессах обучения [6]. Во взрослом организме NGF является регулятором воспалительных процессов [20]. Клетки-продуценты NGF после трансплантации могут выживать и дифференцироваться в нейронаподобные производные [13]. Такие культуры могут представлять интерес для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

**Целью** данной работы было исследование особенностей встраивания NGF-модифицированных ЭСК мыши (NGF-ЭСК) в состав многоклеточной бластоцисты, а также влияния эндогенной продукции NGF на рост эмбриональных клеток после выхода бластоцисты из оболочки.

Для выявления динамики распределения NGF-ЭСК на разных стадиях предимплантационного развития мы провели модельные эксперименты *in vitro*.

### Материалы и методы

**Объекты исследования.** В опытах использовали инбредных мышей линии NMRI, полученных из питомника филиала Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Пушино, Московская обл.). Клоны NGF-ЭСК были получены с любезного разрешения зав. лабораторией генетики соматических клеток, д.б.н., проф. И.А. Гривенникова (Институт молекулярной генетики РАН, Москва). 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).

**Выделение зародышей на стадии бластоцисты.** Для выделения бластоцист использовали метод гормональной стимуляции самок в возрасте 8-10 недель путем введения 10 ед. фолликуло-стимулирующего (Мосагроген, Россия) и, через 52 ч, 10 ед. хорионического гонадотропного гормона (ХГГ) человека (Московский эндокринный завод). После введения ХГГ самок подсаживали к самцам из расчета 1:1. Утром на следующий день отбирали животных с копулятивными пробками. День обнаружения пробки считали первым днем беременности. Зародыши на стадиях бластоцисты выделяли из рогов матки на 3,5 день после обнаружения копулятивной пробки.

Выделение и культивирование бластоцист проводили в среде Виттена на основе бикарбонатного буфера [18], модифицированной с помощью органического буфера HEPES для стабилизации pH 7,2 при работе с эмбрионами на открытом воздухе (модифицированная среда Виттена, МСВ). Отбор эмбрионов на стадии средней и поздней бластоцисты проводили под инвертированным микроскопом с модификацией объектива по Хоффману (Olympus, тип IX-70, Япония). При этом учитывали размеры полости бластоцист, наличие неповрежденной блестящей оболочки (*zona pellucida*), прозрачность перивителлинового пространства, расположение клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофобласта (ТБ) относительно друг друга.

**Культивирование NGF-ЭСК.** Для культивирования использовали среду ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы 4,5 г/л (Биолот, Россия),

2 mM L-глутамина (Helicon); 1 mM Напирувата; 0,1 mM 2-меркаптоэтанола (Gibco, США); 1 mM заменимых аминокислот (ПанЭко, Россия) и 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США). В среду дополнительно добавляли 10 нг/мл рекомбинантного белка LIF мыши (Sigma, США). Культивирование проводили на 60 мм чашках Петри (Nunc), предварительно покрытых 0,1% р-ром желатина. Максимальная длительность культивирования стволовых клеток в CO<sub>2</sub>-икубаторе (Sanyo, Япония) составляла 72 ч. Клетки перед МИ оценивали по морфологии и по максимальной GFP-флуоресценции при длине волны 488 нм. Интенсивность флуоресценции GFP определяли с помощью встроенного светофильтра для Axiovert 40 CFL (Германия).

**Микроинъекция (МИ) ЭСК.** В полость каждой бластоцисты вводили по 50 нл МСВ (контроль) и/или 10-12 стволовых клеток в таком же объеме МСВ (опыт). Процедуру МИ проводили на микроманипуляторе «TransferMan NK» (Eppendorf, Германия), совмещенным с инвертированным микроскопом Olympus (Япония) с настройками объективов по Хоффману. Использовали стандартные капилляры VacuTips и TransferTips (ES) с внутренним диаметром 15 мкм для переноса ЭСК в полость бластоцисты (Eppendorf, Германия).

**Морфофункциональная оценка бластоцист после МИ.** Морфологию бластоцист оценивали через каждые 24 ч культивирования в МСВ путем прямых микроскопических наблюдений. Максимальная длительность культивирования бластоцист до образования первичных колоний (ПК) составляла 120 ч. Регистрировали число эмбрионов, вышед-

ших из *z. pellucida* и сформировавших ПК, локализацию инъецированных клеток в бластоцисте и ПК, размеры и количество клеток ВКМ и ТБ. В качестве контроля использовали интактные бластоцисты, не подвергавшиеся МИ.

**Цитохимическое выявление эндогенных щелочных фосфатаз (ЭЩФ).** Для этого ПК фиксировали охлажденным ацетоном в течение нескольких секунд, подсушивали на воздухе, после чего инкубировали в течение 1 ч при 37°C в р-ре с  $\alpha$ -нафтол-AS-BI-фосфатом (ICN, Calbiochem) и красителем ВВ синим (ICN, Calbiochem). Окрашивание колоний свидетельствовало о высоком плюрипотентном потенциале клеток.

**Дифференцировка клеток в ПК.** Дифференцированные клетки в составе ПК выявляли через 72, 96 и 120 ч культивирования по экспрессии тканеспецифических маркера NGF и фактора плюрипотентных клеток Nanog. Исследования проводили под инвертированным микроскопом Axiovert 40 CFL (Zeiss, Германия). Число клеток, меченных FITC, относили к общему числу клеток в ПК, меченных Hoechst33258, их соотношение выражали в процентах.

**Выявление Nanog и FGF.** Колонии фиксировали в 2,5% р-ре глутарового альдегида на фосфатном буфере (PBS) при температуре 37°C в течение 60 мин. Затем фиксированные препараты трижды промывали в PBS и дополнительно фиксировали в течение 30 мин охлажденным до -20°C абсолютным этиловым спиртом. После фиксации препараты тщательно промывали в PBS, покрывали блокирующим р-ром (5% р-р бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере с добавлением флуоресцентного красителя Hoechst33258 в разведении 1:1000).

В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела кролика против факторов Nanog и NGF (Santa Cruz Biotechnology, США, 1:500). В качестве вторичных антител использовали козы антитела против кролика, конъюгированные с флуоресцентным красителем FITC (Jackson ImmunoResearch laboratories, США, 1:200). После каждой процедуры клетки отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Клетки, меченные антителами, выявляли с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DM6000B» с использованием лазеров 494-518 нм для FITC и 353-365 нм для Hoechst33258. В качестве позитивного контроля для флуоресценции FITC использовали первичные эмбриональные фибробласты мыши. Для отрицательного контроля первичные антитела заменялись фетальной бычьей сывороткой.

**Анализ изображения.** Подсчет клеток в ПК производили с помощью про-

граммы «ImageJ» версии 1.48 (<https://imagej.nih.gov/ij/>) с дополнительной установкой инструментов для автоматизации анализа изображений. Размеры ПК определяли с помощью программ «PhotoM» и «Photoshop SC6». Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.0. Для сравнения средних значений использовали двухфакторный дисперсионный анализ (тест Холм-Сидака). Цифровые данные представлены в виде относительных величин, их средних значений и указания стандартной ошибки (SE). Динамику развития эмбрионов оценивали с помощью критерия Пирсона (метод  $\chi^2$ ).

### Результаты и их обсуждение

Для МИ использовали NGF-ЭСК с сопряженной экспрессией фактора роста нервов NGF и зеленого флуоресцирующего белка GFP (рис. 1Г). Было

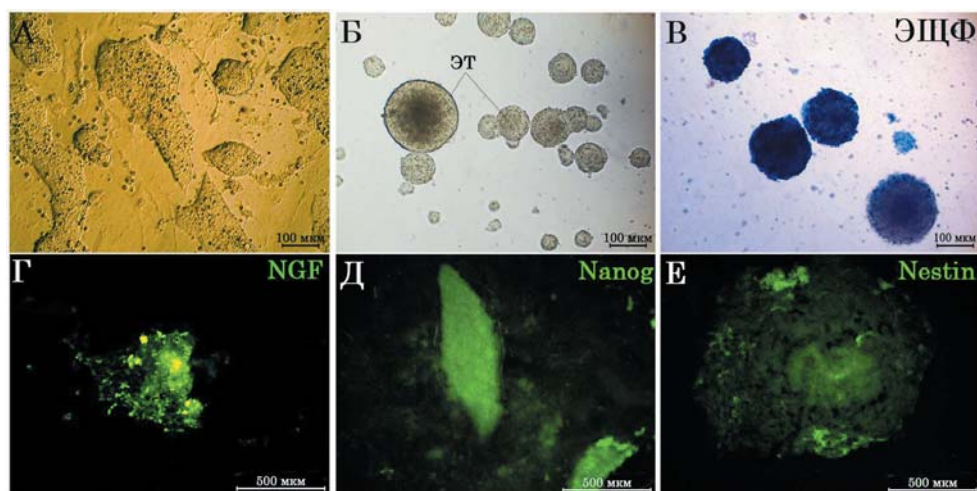


Рис. 1. Морфология эмбриональных стволовых клеток мыши линии R1 (А) и их NGF-трансфицированных потомков (Б) через 72 ч культивирования в среде для стволовых клеток с добавлением 10 нг/мл цитокина LIF. В – тест на активность эндогенной щелочной фосфатазы (ЭЩФ), Г, Д, Е – иммунофлуоресцентный анализ продукции NGF и специфических белков-маркеров Nanog и Nestin соответственно. Антитела меченные FITC. ЭТ – эмбрионное тело.

установлено, что в отличие от ЭСК линии R1, растущих в присутствии цитокина LIF колониями (рис. 1А), их трансфицированные NGF-потомки растут и размножаются *in vitro* в суспензии с образованием эмбриоидных тел (рис. 1Б). Через 72 ч культивирования эмбриоидные тела достигают сравнительно больших размеров (100-300 мкм), адгезируют на поверхности культуральной чашки и формируют колонию (рис. 1Г, Д, Е). В течение этого времени NGF-ЭСК обнаруживают положительную реакцию на выявление ЭЩФ (рис. 1В) и транскрипционного фактора плюрипотентных клеток Nanog (рис. 1Д), продуцируют фактор ранней нейральной дифференцировки – Nestin (рис. 1Е). Та-

кие клетки отбирали для МИ по морфологии и интенсивности флуоресценции GFP, что позволило контролировать их расположение в составе многоклеточной бластоцисты (рис. 2).

МИ проводили в полость средних и поздних бластоцист, поскольку на этих стадиях эмбрионы мышей устойчивы к механическому и осмотическому стрессу [1, 4]. Влияние NGF-ЭСК на развитие химерных бластоцист оценивали по двум основным критериям: 1) способности выходить из оболочки (хетчинг от англ. «hatching» – вылупление из яйца); 2) эффективности образования ПК, представляющей собой единую популяцию взаимодействующих клеток ВКМ и трофобласта (ТБ) в системе *in vitro*.

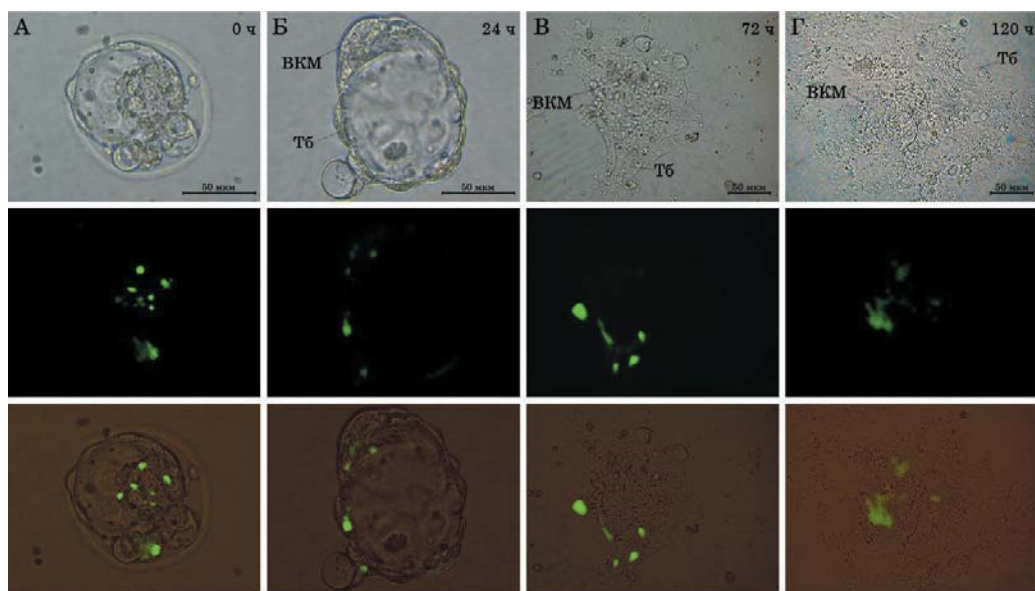


Рис. 2. Идентификация NGF-ЭСК мыши с экспрессией зеленого флуоресцентного белка GFP в химерной бластоцисте мыши: А – морфология бластоцисты сразу после микроинъекции; Б – через 24 ч после хетчинга *in vitro* (стадия расширенной или экспандированной бластоцисты без оболочки), В – через 72 ч и Г – 120 ч культивирования бластоцисты в виде первичной колонии. I ряд – бластоциста в проходящем свете, II ряд – флуоресценция белка GFP при длине волны синего света 488 нм, III ряд – проходящий свет и синий свет. ВКМ – клетки внутренней клеточной массы, ТБ – полярные клетки трофобласта. Ув. x20.

Результаты этих исследований показали, что сразу после МИ происходит резкое сокращение внутреннего объема бластоцисты за счет быстрого выхода избытка жидкости в перивителлиновое пространство (рис. 2А). При этом увеличивается объем перивителлинового пространства и наблюдается перераспределение клеток ТБ и ВКМ относительно друг друга. Клетки ВКМ, расположенные в виде компактной группы на одном из полюсов бластоцисты, перемешиваются с более крупными полярными клетками ТБ. Несмотря на такие серьезные нарушения морфологии, NGF-ЭСК обнаруживаются после МИ не в полости бластоцисты, а среди клеток ТБ и ВКМ (рис. 2А). Судя по нашим наблюдениям и расчетным данным, их число в составе химерных бластоцист не увеличивается в течение первых суток культивирования. В это время происходит восстановление морфологии бластоцисты и осуществляется их хетчинг, сопровождающийся потерей оболочки и накачиванием жидкости во внутренней полости (рис. 2Б).

В контрольной группе бластоцист, не подвергавшихся МИ, хетчинг происходит с задержкой по времени, как правило, на 2-3 сутки культивирования. Интактные и химерные бластоцисты различались между собой только по эффективности хетчинга и колониеобразования *in vitro* (рис. 2В). Через 72 ч культивирования NGF-ЭСК обнаруживались преимущественно в области расположения клеток ВКМ. Там они компактизовались в отдельную группу, и только небольшая их часть выявлялась в виде разрозненно светящихся 3-4 клеток на периферии колонии, образованной более крупными

клетками ТБ (рис. 2В). При увеличении длительности культивирования до 120 ч в химерных бластоцистах обнаруживались, с одной стороны, более слабая интенсивность флуоресценции белка GFP, с другой, – явное увеличение количества NGF-ЭСК в области расположения клеток ВКМ (рис. 2Г).

В этих экспериментах не было выявлено негативного влияния продукции белка GFP и NGF на развитие химерных бластоцист *in vitro*. Прямой подсчет клеток ВКМ и ТБ в первичных колониях показал, что процедура МИ оказывает стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию (табл.). Введение в полость бластоцисты 50 мкл МСВ (контроль) или в таком же объеме 10-12 стволовых клеток (опыт) способствовало более активному росту клеток ВКМ и ТБ по сравнению с интактными бластоцистами. Разрастание интактных бластоцист осуществлялось в основном за счет более интенсивной пролиферации ТБ, о чем свидетельствовало изменение соотношения клеток ТБ/ВКМ с 4,9 до 7,2 в течение 24 ч инкубирования *in vitro* (119/24 и 276/38 соответственно). После инъекции МСВ этот показатель оставался практически без изменений в пределах 6,0-6,25. В опытной группе бластоцист, напротив, показатель соотношения ТБ/ВКМ снижался с 6,0 до 5,3 (218/36 и 328/61 соответственно). Такая ситуация возможна в результате стимулирующего влияния NGF-ЭСК на рост клеток ВКМ в составе ПК (табл.).

Мы предположили, что в этом случае возможно как индукционное действие клеток ВКМ на митотическую активность NGF-ЭСК в составе химерной бластоцисты, так и влияние эндогенной продукции NGF на клеточную

Таблица

**Число клеток ТБ и ВКМ в первичных колониях, развившихся из бластоцист мышей линии NMRI в культуре *in vitro***

| Количество бласто-<br>цист      | Клетки ТБ                 |                         | Клетки ВКМ            |                        |
|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                 | 72 ч                      | 96 ч                    | 72 ч                  | 96 ч                   |
| Контроль<br>(МИ МСВ, n=8)       | 202,8±29,0 <sup>a</sup>   | 261,5±21,3              | 33,4±5,1              | 41,8±8,7               |
| Опыт<br>(МИ NGF-ЭСК, n=7)       | 218,4±28,9 <sup>b</sup>   | 328,0±20,8 <sup>c</sup> | 36,4±5,7              | 61,8±10,7 <sup>c</sup> |
| Интakтная бластоциста<br>(n=10) | 119,4±44,7 <sup>a,b</sup> | 276,5±31,6              | 24,2±1,9 <sup>c</sup> | 38,48±3,2              |

*Примечание:* контроль – микроинъекция в полость бластоцисты 50 мкл модифицированной среды Виттена (МСВ, рН=7,2), опыт – микроинъекция 10-12 NGF-ЭСК в таком же объеме МСВ. ТБ – клетки трофобласта, ВКМ – клетки внутренней клеточной массы, n – количество инъецированных бластоцист. <sup>a,b,c</sup> – достоверность различий (p < 0,05).

пролиферацию. Из литературных данных известно, что клетки ВКМ играют важную роль в поддержании стабильности свойств ТБ [18]. При нарушении их взаимодействия с ТБ происходит потеря пролиферативной активности в результате эндорепликации ДНК, приводящей к полиплоидии и трансформации в первичные гигантские клетки трофобласта.

Детальный анализ химерных бластоцист подтвердил, что через 72 ч культивирования NGF-ЭСК локализуются в непосредственной близости от клеток ВКМ (рис. 3а), сохраняют способность продуцировать NGF (рис. 3б) и фактор Nanog (рис. 4а, б). По расположению NGF-ЭСК на очень близком расстоянии друг от друга можно судить о митотической активности (рис. 4б). Через 120 ч

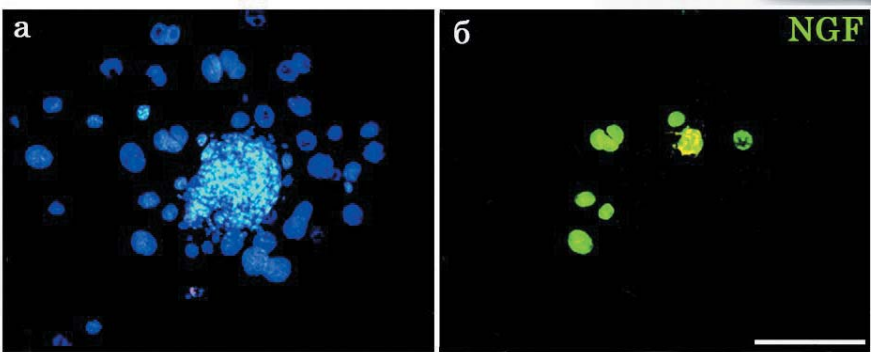


Рис. 3. NGF-позитивные стволовые клетки, встроенные в эмбриональную колонию после микроинъекции: а – ядра клеток, меченные флуоресцентным красителем Hoechst 33258; б – NGF-позитивные клетки, экспрессирующие зеленый флуоресцирующий белок GFP, меченые FITC. Длительность культивирования первичных колоний – 72 ч. Шкала – 50 мкм.

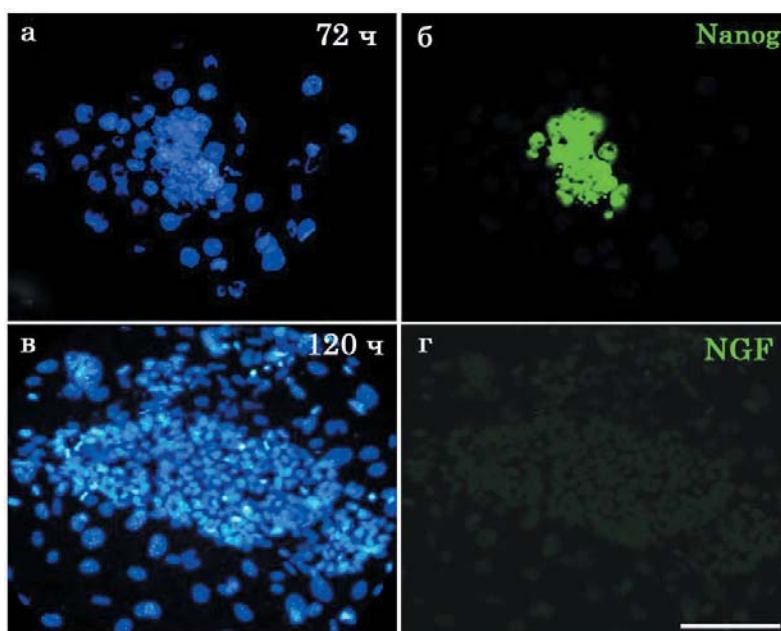


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркера плюрипотентности *Nanog* и нейротрофического фактора *NGF* в первичных колониях, развившихся из химерных NGF-ЭСК бластоцист: а, б – колония через 72 ч после хетчинга бластоцисты из *z. pellucida*; в, г – отсутствие экспрессии NGF через 120 ч культивирования *in vitro*. Ядра клеток, меченые Hoechst 33258 (а, в); антитела, меченые FITC (б, г). Шкала – 100 мкм.

культивирования продукция эндогенного белка NGF в химерных бластоцистах не обнаруживалась (рис. 4г).

Таким образом, в ходе наших исследований было установлено, что NGF-ЭСК в составе многоклеточной бластоцисты обладают пролиферативной активностью, способны мигрировать после выхода бластоцисты из оболочки и встраиваться преимущественно в область расположения клеток ВКМ. Другое, не менее важное, наблюдение касается снижения интенсивности флуоресценции GFP и секреции NGF при увеличении длительности культивирования химерных бластоцист до 120 ч (рис. 2Г, рис. 4г). Белок GFP широко используется как прижизненный маркер для обнаружения клеток в гетерогенных

популяциях [25]. Известно также, что он нетоксичен и обладает стабильным свечением [2, 3, 5, 23]. Наблюдаемое в нашем случае снижение интенсивности флуоресценции GFP, по всей видимости, происходит под влиянием паракринной регуляции со стороны клеток ВКМ, которые могут перепрограммировать ЭСК со сменой паттернов экспрессии генов, ответственных за продукцию GFP и NGF. Такое предположение согласуется с данными о том, что встраивание чужеродных клеток в бластоцисту может приводить к изменению их эпигенетического статуса и, следовательно, профиля генетической экспрессии [17].

Очевидно, перепрограммирование NGF-ЭСК в составе химерной бластоцисты направлено на подавление экс-

прессии NGF и преждевременной нейральной дифференцировки до момента имплантации бластоцисты в матку. Этот фактор начинает синтезироваться в эмбриональных клетках только во время закладки нервной трубки [22]. Однако рецепторы к нейротрофинам обнаруживаются на более ранних стадиях развития, начиная с яйцеклетки [15, 19], что подтверждают наши данные о влиянии NGF-ЭСК на пролиферацию клеток ВКМ и ТБ (табл.). Ранние эмбрионы мышей, в т.ч. и бластоцисты, чувствительны к действию NGF, хотя этот фактор необходим в большей степени для поддержания жизнеспособности периферических нейронов, происходящих из нервного гребня, и нейронов головного мозга [22]. Эмбрионы мышей с нокаутом по гену *Ngf*<sup>-/-</sup> и дефицитом NGF могут имплантироваться в матку и выживать в организме матери. Их гибель происходит на 4-й неделе после рождения в результате задержки развития верхних цервикальных и спинных ганглиев (до 70%), значительного снижения диаметра нейронов [10].

### **Выводы**

NGF-модифицированные ЭСК в составе многоклеточной бластоцисты восстанавливают свойства плюрипотентности под влиянием паракринной регуляции клеток ВКМ. При этом ЭСК теряют способность продуцировать NGF. Исходя из вышесказанного, можно утверждать, что микроокружение и клеточные взаимодействия играют решающую роль в процессах перехода NGF-ЭСК из состояния плюрипотентности к нейральной дифференцировке, которая является базовой на ранних стадиях развития.

### **Список литературы**

1. *Межевикина Л.М., Храмцова Е.В., Смолихина Т.И., Капралова И.В., Косовский Г.Ю.* Использование метода микроинъекции для повышения эффективности выделения первичных колоний из бластоцист инбредных линий мышей в условиях *in vitro* // Биомедицина. - 2016. - № 1. - С. 25-36.
2. *Сахарова Н.Ю., Межевикина 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.
3. *Смирнов А.А., Шишова Н.В., Сахарова Н.Ю., Селезнева И.И., Малащенко А.М.* Локализация зеленого флуоресцирующего белка в доимплантационных зародышах мышей // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2008. - № 1. - С. 39-44.
4. *Храмцова Е.А., Межевикина 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. *Artus J., Hadjantonakis A.K.* Troika of the mouse blastocyst: lineage segregation and stem cells // Curr Stem Cell Res. Ther. - 2012. - V. 7. - No. 1. - Pp. 78-91.
6. *Berry A., Bundocci E., Alleva E.* NGF, brain and behavior plasticity // Neural. Plast. - 2012. - V. - 2012. - 784040 p.
7. *Bradley A.* Production and analysis of chimeric mice // In: Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach (ad. Robertson E.J.). - 1987. - Oxford, Washington, DS: IRL Press. - Pp. 113-152.
8. *Brook F.A., Gardner R.L.* The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. - V. 94. - Pp. 5709-5712.
9. *Cassidy R., Frisen J.* Stem cells on the brain // Nature. - 2001. - V. 412. - Pp. 690-691.
10. *Crowley C., Spencer S.D., Nishimura M.C., Chen K.S., Pitts-Meek S., Armanini M.P., Ling L.H., McMahon S.B., Shelton D.L., Levinson A.D., Philips H.S.* Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain

- cholinergic neurons // *Cell*. - 1994. - V. 76. - No. 6. - Pp. 1001-1011.
11. Harder F., Kirchhof N., Petrovic S., Wiese S., Müller A.M. Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts // *Exp. Hematol.* - 2004. - V. 32. - No. 7. - Pp. 673-682.
  12. Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency // *Nature*. - 2006. - V. 441. - Pp. 1061-1067.
  13. Hu Y., Zhang Y., Tian K., Xun C., Wang S., Li D. Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor dual gene modification on rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells *in vitro* // *Mol. Med. Rep.* - 2016. - V. 13. - No. 1. - Pp. 49-58.
  14. Jiang R., Huang B., Jin C., Song G., Zhong X., Yuan J., Xiang P., He Y., Liu B., Sun X., Zhang Y., Ge J. A potential model for studding the plasticity and reprogramming of human epidermal stem cells through preimplantation blastocyst microinjection // *Cell Biol. Int.* - 2008. - V. 32. - No. 12 - Pp. 1567-1573.
  15. Kawamura K., Kawamura N., Fukuda J., Kumagai J., Hsueh A.J., Tanaka T. Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor // *Dev. Biol.* - 2007. - V. 311. - No. 1. - Pp. 147-158.
  16. Kelleher J.H., Tewari D., McMahon S.B. Neurotrophic factors and their inhibitors in chronic pain treatment // *Neurobiol. Dis.* - 2016 (pii: S0969-9961(16)30071-7).
  17. Madich A., Richardson G.D., Jahoda C.A.B. Contribution of GFP Expressing Dermal Papillae Cells to the Formation of Chimeric Embryos and their Survival in Uterine Environment // *British Biotechnology J.* - 2016. - V. 12. - No. 2. - Pp. 1-12.
  18. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual // Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York. - 2003.
  19. Pei Y. Effect of nerve growth factor (NGF) on the development of preimplantation rabbit embryos *in vitro* // *Vet. Res. Commun.* - 2010. - V. 34. - No. 1. - Pp. 11-18.
  20. Pezet S., McMahon S.B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain // *Annu. Rev. Neurosci.* - 2006. - V. 29. - Pp. 507-538.
  21. Soncin F., Ward C.M. The function of E-cadherin in stem cell pluripotency and self-renewal // *Genes*. - 2011. - V. 2. - No. 1. - Pp. 229-259.
  22. Wyatt T.J., Rossi S.L., Siegenthaler M.M., Frame J., Robles R., Nistor G., Keirstead H.S. Human motor neuron progenitor transplantation leads to endogenous neuronal sparing in 3 models of motor neuron loss // *Stem Cells Int.* - 2011. - V. 2011. - Pp. 207230.
  23. Xenopoulos P., Nowotschin S., Hadjantonakis A.-K. Live imaging fluorescent proteins in early mouse embryos // *Methods Enzymol.* - 2012. - V. 506. - Pp. 361-389.
  24. Xu H., Yi B.A., Wu H., Bock C., Gu H., Lui K.O., Park J.H., Shao Y., Riley A.K., Domian I.J., Hu E., Willette R., Lepore J., Meissner A., Wang Z., Chien K.R. Highly efficient derivation of ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells with a distinct epigenetic signature // *Cell Res.* - 2012. - V. 22. - No. 1. - Pp. 142-54.
  25. Zhang S., Ma C., Chalfie M. Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins // *Cell*. - 2004. - V. 119. - No. 1. - Pp. 137-144.
  26. Zhu S.X., Huang S.Y., Su Y.M., Cai P. Growth and expression of rat bone marrow mesenchymal stem cells modified by nerve growth factor in diabetic rat bladders // *Mol. Med. Rep.* - 2013. - V. 7. - No. 6. - Pp. 1791-1799.

## References

1. Mezhevikina L.M., Hramcova E.V., Smolihina T.I., Kapralova I.V., Kosovskij G.Ju. Ispol'zovanie metoda mikroin#ekcii dlja povyshenija jeffektivnosti vydelenija pervichnyh kolonij iz blastocist inbrednyh linij myshej v uslovijah *in vitro* // *Biomedicina*. - 2016. - № 1. - C. 25-36.
2. Saharova N.Ju., Mezhevikina L.M., Smirnov A.A., Vihljanceva E.F. Analiz dejstvija sinego sveta na morfofunkcional'noe sostojanie blastocist pri kul'tivirovanii *in vitro* s ispol'zovaniem myshej, nesushhih gen uluchshennogo zelenogo fluorescirujushhego belka (EGFP) // *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine*. - 2014. - № 1. - C. 52-56.
3. Smirnov A.A., Shishova N.V., Saharova N.Ju., Selezneva I.I., Malashenko A.M. Lokalizacija zelenogo fljuorescirujushhego belka v doimplantacionnyh zarodyshah myshej // *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine*. - 2008. - № 1. - C. 39-44.
4. Hramcova E.A., Mezhevikina L.M., Fesenko E.E. Rol' kletok trofoblata v reguljacii vyzhivaemosti blastocist myshej *in vitro* posle mikroinjekcii i osmoticheskogo shoka // *Biofizika*. - 2014. - T. 49. - Vyp. 2. - S. 314-321.

5. **Artus J., Hadjantonakis A.K.** Troika of the mouse blastocyst: lineage segregation and stem cells // *Curr Stem Cell Res. Ther.* – 2012. – V. 7. – No. 1. – Pp. 78-91.
6. **Berry A., Bundocci E., Alleva E.** NGF, brain and behavior plasticity // *Neural. Plast.* – 2012. – V. – 2012. – 784040 p.
7. **Bradley A.** Production and analysis of chimeric mice // In: *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach* (ad. Robertson E.J.). – 1987. – Oxford, Washington, DS: IRL Press. – Pp. 113-152.
8. **Brook F.A., Gardner R.L.** The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – Pp. 5709-5712.
9. **Cassidy R., Frisen J.** Stem cells on the brain // *Nature.* – 2001. – V. 412. – Pp. 690-691.
10. **Crowley C., Spencer S.D., Nishimura M.C., Chen K.S., Pitts-Meek S., Armanini M.P., Ling L.H., McMahon S.B., Shelton D.L., Levinson A.D., Philips H.S.** Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons // *Cell.* – 1994. – V. 76. – No. 6. – Pp. 1001-1011.
11. **Harder F., Kirchhof N., Petrovic S., Wiese S., Müller A.M.** Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts // *Exp. Hematol.* – 2004 – V. 32. – No. 7. – Pp. 673-682.
12. **Hochedlinger K., Jaenisch R.** Nuclear reprogramming and pluripotency // *Nature.* – 2006. – V. 441. – Pp. 1061-1067.
13. **Hu Y., Zhang Y., Tian K., Xun C., Wang S., Li D.** Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor dual gene modification on rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells *in vitro* // *Mol. Med. Rep.* – 2016. – V. 13. – No. 1. – Pp. 49-58.
14. **Jiang R., Huang B., Jin C., Song G., Zhong X., Yuan J., Xiang P., He Y., Liu B., Sun X., Zhang Y., Ge J.** A potential model for studding the plasticity and reprogramming of human epidermal stem cells through preimplantation blastocyst microinjection // *Cell Biol. Int.* – 2008. – V. 32. – No. 12 – Pp. 1567-1573.
15. **Kawamura K., Kawamura N., Fukuda J., Kumagai J., Hsueh A.J., Tanaka T.** Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor // *Dev. Biol.* – 2007. – V. 311. – No. 1. – Pp. 147-158.
16. **Kelleher J.H., Tewari D., McMahon S.B.** Neurotrophic factors and their inhibitors in chronic pain treatment // *Neurobiol. Dis.* – 2016 (pii: S0969-9961(16)30071-7).
17. **Madich A., Richardson G.D., Jahoda C.A.B.** Contribution of GFP Expressing Dermal Papillae Cells to the Formation of Chimeric Embryos and their Survival in Uterine Environment // *British Biotechnology J.* – 2016. – V. 12. – No. 2. – Pp. 1-12.
18. **Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R.** Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual // Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York. – 2003.
19. **Pei Y.** Effect of nerve growth factor (NGF) on the development of preimplantation rabbit embryos *in vitro* // *Vet. Res. Commun.* – 2010. – V. 34. – No. 1. – Pp. 11-18.
20. **Pezet S., McMahon S.B.** Neurotrophins: mediators and modulators of pain // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2006. – V. 29. – Pp. 507-538.
21. **Soncin F., Ward C.M.** The function of E-cadherin in stem cell pluripotency and self-renewal // *Genes.* – 2011. – V. 2. – No. 1. – Pp. 229-259.
22. **Wyatt T.J., Rossi S.L., Siegenthaler M.M., Frame J., Robles R., Nistor G., Keirstead H.S.** Human motor neuron progenitor transplantation leads to endogenous neuronal sparing in 3 models of motor neuron loss // *Stem Cells Int.* – 2011. – V. 2011. – Pp. 207230.
23. **Xenopoulos P., Nowotschin S., Hadjantonakis A.-K.** Live imaging fluorescent proteins in early mouse embryos // *Methods Enzymol.* – 2012. – V. 506. – Pp. 361-389.
24. **Xu H., Yi B.A., Wu H., Bock C., Gu H., Lui K.O., Park J.H., Shao Y., Riley A.K., Domian I.J., Hu E., Willette R., Lepore J., Meissner A., Wang Z., Chien K.R.** Highly efficient derivation of ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells with a distinct epigenetic signature // *Cell Res.* – 2012. – V. 22. – No. 1. – Pp. 142-54.
25. **Zhang S., Ma C., Chalfie M.** Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins // *Cell.* – 2004. – V. 119. – No. 1. – Pp. 137-144.
26. **Zhu S.X., Huang S.Y., Su Y.M., Cai P.** Growth and expression of rat bone marrow mesenchymal stem cells modified by nerve growth factor in diabetic rat bladders // *Mol. Med. Rep.* – 2013. – V. 7. – No. 6. – Pp. 1791-1799.

## The survival of NGF-modified embryonic stem cell in mouse multicellular blastocyst

L.M. Mezhevikina, E.A. Khramtsova, E.E. Fesenko

We investigated the effect of the microenvironment on the growth and survival of NGF-modified embryonic stem cells (NGF-ESC) with the expression of green fluorescent protein GFP in mouse multicellular blastocyst. Our results show that after the microinjection (MI), NGF-ESC migrate and co-culture primarily in the region of inner cell mass (ICM). They produce NGF and GFP and are capable for proliferation in chimeric blastocyst. However, if the cultivation period is prolonged to 120 hours, the decrease in the intensity of GFP fluorescence strength and NGF secretion is observed. We conjecture that this occurs as a result of reprogramming of NGF-ESC under the influence of ICM leading to the suppression of NGF/GFP expression and, therefore, earlier differentiation of ESC towards the neuroectoderm. Obtained results indicate that the microenvironment and cellular interaction play a key role in transferring NGF-ESC from the state of pluripotency to the neutral differentiation which is basic during the early stages of development.

**Key words:** embryonic stem cells, microinjection, blastocyst, pluripotency, differentiation, nerve growth factor (NGF).