

••• БІОТЕХНОЛОГІЯ •••

УДК: 57.08:632.082

ДИНАМИКА ЭЛЕКТРОСЛИЯНИЯ БЛАСТОМЕРОВ ДВУХКЛЕТОЧНОГО ЭМБРИОНА МЫШИ В.А.Шигимага

Институт животноводства УААН (Харьков, Украина)

В статье представлены видеок cadры (из полной видеозаписи) динамики этапов слияния двухклеточного эмбриона мыши после электропробоя мембран в месте контакта blastомеров. Электрослияние проведено с помощью аппаратуры собственной разработки. Показана динамика процесса перестройки цитоскелетов сливающихся blastомеров в фазовом контрасте. Проведена проверка целостности общей мембраны слитого эмбриона.

Ключевые слова: *электрослияние, динамика, эмбрион, цитоскелет, мышь.*

Введение

Широкое распространение получила методика слияния клеток животных с использованием явления электропробоя мембран контактирующей пары в импульсном электрическом поле - метод электрослияния (Zimmermann, Neil, 1996; Черномордик, 1984; GENETRONICS inc., catalog, 2000). Обычно исследователей интересует только конечный результат применения метода (слились клетки или нет), выход слитых пар, успех дальнейшего развития слитого гибрида и другие прикладные аспекты. При этом часто не принимаются во внимание морфологические особенности слияния клеток после электропробоя, которое длится довольно долго (в случае слияния эмбриональных клеток животных это десятки минут). Поэтому предполагается, что эти особенности, будучи зафиксированы на видеозаписи в динамике, помогут лучше отразить этапы объединения мембран и преобразования цитоскелетов сливающейся пары. А это, в свою очередь, даст возможность более глубокого понимания процесса объединения двух клеток.

В качестве объекта для видеозаписи удобно использовать двухклеточные эмбрионы мыши по ряду причин: у них довольно крупные blastомеры, для них хорошо известна методика электрослияния (GENETRONICS inc., catalog, 2000), эти клетки достаточно устойчивы к внешним воздействиям (микроманипуляции, среда и т.п.). К тому же, динамика электрослияния blastомеров двухклеточных эмбрионов мыши остается все еще мало изученной. Среди немногих аналогичных работ можно отметить исследование, проведенное на двухклеточных эмбрионах хомяка (Suzuki, Ogasawara, Takahashi et al., 2001), по морфологии близких мышинным.

Таким образом, представляется целесообразным рассмотреть этапы слияния blastомеров двухклеточных эмбрионов мыши, представленные видеокadрами последовательно друг за другом в динамике.

Методика

Электрослияние blastомеров проведено с помощью аппаратуры собственной разработки (Шигимага, 2001) по модифицированной методике (GENETRONICS inc., catalog, 2000). Модификация заключалась в следующем. Во-первых, применен щадящий режим электрослияния мембран blastомеров. Это удалось сделать за счет отказа от электрического способа предварительной ориентации blastомеров ВЧ полем в пользу ручного. Во-вторых, снижена напряженность поля почти в два раза и применена пара импульсов, следующих с большой скважностью. В результате применения такого режима удалось снизить энергию электропробоя более чем на порядок при той же эффективности. Кроме того, благодаря естественному тесному контакту blastомеров в одной зоне пеллюцида, этап предварительного их сближения ВЧ полем был исключен, тем самым упрощена процедура слияния (GENETRONICS inc., catalog, 2000).

Аппаратура для электрослияния включала следующие элементы: генератор одиночного импульса, напряжение которого подавалось на микроэлектроды из тонкой золотой нити, запаянной в стеклянный капилляр по методике (Лисин, 2001). Микроэлектроды закреплены в микроманипуляторах и юстированы соосно в поле зрения инвертированного микроскопа "БИОЛАМ-П1" ("ЛОМО", Россия). Объект исследования размещался в среде 0,3М маннита между микроэлектродами на предметном стекле микроскопа. Видеозапись объектов проведена видеокadмой, вмонтированной нами в микроскоп, на видеоманитофон с визуальным контролем по монитору. Для подробного рассмотрения

ракурсов сливающейся пары бластомеров использована микроигла с затупленным концом (чтобы случайно не повредить клетку), с помощью которой поворачивали эмбрион под разными углами зрения. Микроигла приводилась в действие посредством электромеханического манипулятора ("OPTON", Германия).

После проведения электропробоя клетки помещали в среду PBS, а процесс слияния наблюдали в окуляр микроскопа и на экране монитора, одновременно записывая видеоизображение, которое потом оцифровано на компьютере с помощью программы видеозахвата Video in видеоадаптером ATI Rage Fury Pro/Xpert 2000 Pro.

Двухклеточные эмбрионы мыши получены от самок линии СВА 6-8-недельного возраста. Гормональную стимуляцию овуляции осуществляли внутрибрюшинным введением животным гонадотропина сыворотки жеребых кобыл и через 46-48 ч хорионического гонадотропина человека (чХГ) в дозе 6 МЕ. Эмбрионы на стадии двух бластомеров получали из животных через 42-46 ч после инъекции чХГ путем промывания яйцепроводов средой M2 (Манк, 1990).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены видеокadres динамики слияния двухклеточного эмбриона мыши после электропробоя мембран в месте контакта бластомеров. Хорошо видны все классические этапы слияния: агглютинация, кадр 1, слияние и набухание мембран, кадр 2, стабилизация слитого эмбриона, кадры 3-6, описанные еще в ранних работах (Зеленин, Куц, Прудовский, 1982; Зеленин, Бандрина, 1984).

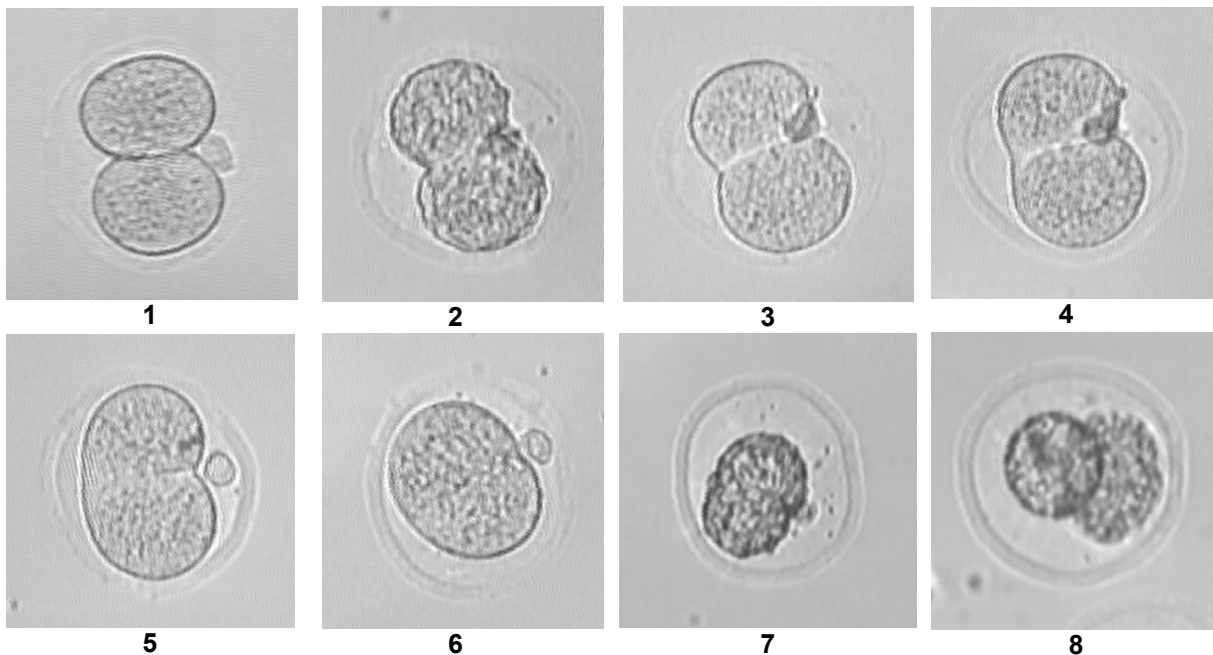


Рис.1. Динамика слияния двухклеточного эмбриона мыши (1-6) и проверка целостности мембран в гипертонической среде: 7 – слитого эмбриона, 8 – (для сравнения) неслитого эмбриона (x100)

Слияние записано полностью и по внешним признакам длилось около 2 часов до округления мембраны слитого эмбриона. На рис. 1 виден процесс перестройки цитоскелетов бластомеров в месте их бывшего контакта в виде светлой линии (кадр 3), которая раздваивается (кадр 4) и постепенно исчезает (кадры 5, 6). После округления общей мембраны слитого эмбриона была проверена ее целостность путем добавления гипертонической среды. Получена полная видеозапись процесса сжатия общей мембраны, конечный результат которого показан на рис. 1, кадр 7. На этом же рис. 1 для сравнения показан неслитый эмбрион, кадр 8. В последнем один из бластомеров оказался с поврежденной мембраной (сжатия не произошло). Далее была восстановлена изотоничность среды с этими объектами путем постепенного добавления соответствующего количества дистиллята. При этом получена динамика восстановления первоначального объема слитого и одного из бластомеров неслитого эмбрионов, что зафиксировано на видеозаписи.

Оказалось, однако, что в неслитом эмбрионе объем восстановил только сжатый (неповрежденный) бластомер, а поврежденный не изменился.

Процесс перестройки цитоскелетов лучше представлен в фазовом контрасте, рис. 2, где лучше видны и ядра бластомеров. Преобразование с объединением цитоскелетов, а также и место бывшего контакта бластомеров видны на рис. 2 в виде светлой перетяжки между ядрами и ореола под общей мембраной внутри зоны пеллюцида. Видна и небольшая уточка структурных элементов цитоскелета в перивителлиновое пространство, кадры 2, 3. Это произошло, скорее всего, вследствие электропробоя мембраны и электромеханического воздействия импульса (встряска заряженных групп белков цитоскелета с вероятной их деполимеризацией и частичным выбросом).

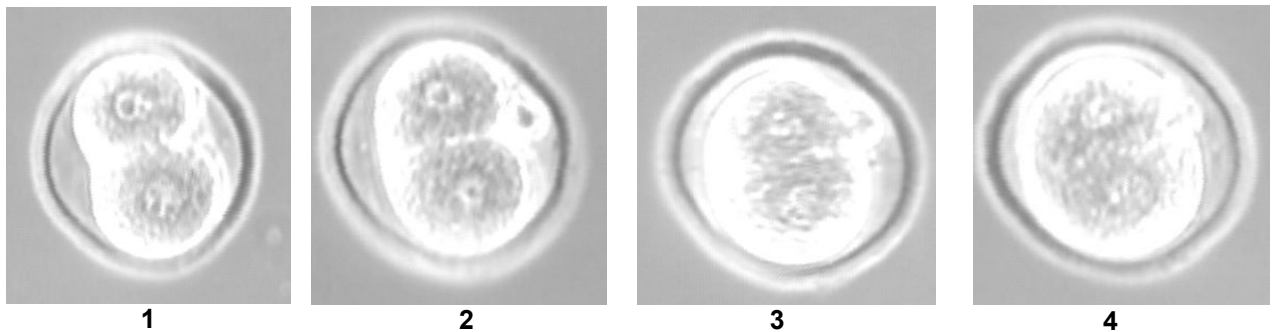


Рис.2. Динамика преобразования цитоскелетов сливающихся бластомеров (1-4), фазовый контраст (x100)

Интересно, что скелетные элементы крепления ядер в цитоплазме (Зеленин, Куш, Прудовский, 1982), по-видимому, оказались не затронутыми в процессе преобразования цитоскелетов обоих бластомеров, поскольку сами ядра не сливаются.

Представленная динамика электрослияния напоминает результаты, полученные в работе (Suzuki, Ogasawara, Takahashi et al., 2001) на двухклеточных эмбрионах хомяка, морфология которых подобна мышинным. В этой работе с помощью флуоресцентных красителей показано, что слияние бластомеров сопровождалось аналогичной реорганизацией цитоскелета и динамическими изменениями, которые происходят также и в различных режимах электрослияния зародышей. Особенно впечатляющими, на наш взгляд, являются видеокдры, где хорошо заметен частичный выброс элементов цитоскелета, подтвержденный с помощью красителей разного цвета.

В заключении целесообразно привести имеющиеся на видеозаписи интересные ракурсы сливающейся пары бластомеров, в которых видно, благодаря прозрачности цитоплазмы, некоторые структурные элементы клеток, ядра, полярное тело и общую округляющуюся мембрану (рис. 3).

На рис. 3 видно, как в неслитом эмбрионе сквозь цитоплазму хорошо просматривается мембрана соседнего бластомера, а также полярное тело. В то же время, на проекции сливающегося эмбриона (правый кадр) просматривается "перетяжка" между бластомерами, неопровержимо подтверждающая факт наличия общей мембраны, находящейся в стадии округления. На этом же кадре сквозь ставшую прозрачной цитоплазму видно полярное тело и одно из ядер, а также структурные элементы повернутого к наблюдателю бластомера, вследствие того, что в таком ракурсе оптическая плотность цитоплазмы меньше. Причиной последнего может быть, вероятно, изменение кривизны преломляющей поверхности бластомера.

Полученные видеозаписи могут быть полезными для лучшего понимания прямого процесса – деления бластомеров развивающегося эмбриона, а также могут иметь значение в качестве учебного материала по морфологии эмбрионов мыши.

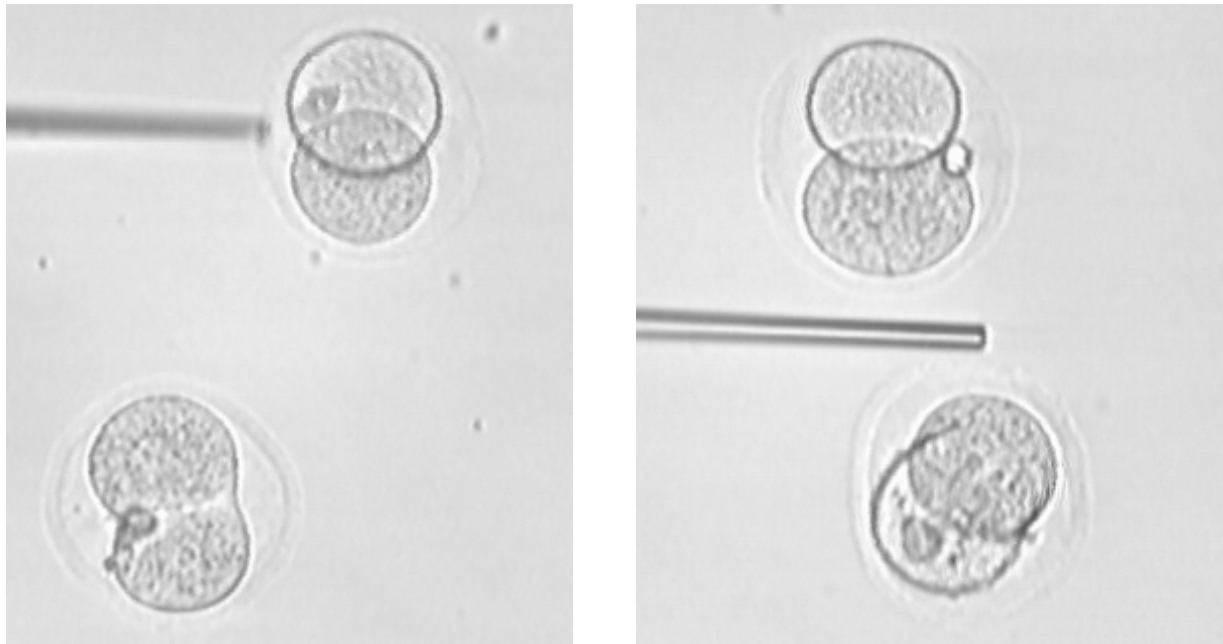


Рис.3. Ракурсы сливающегося эмбриона, внизу: кадр слева - план, кадр справа - аксонометрическая проекция, вверху на обоих кадрах неслитый эмбрион, слева в кадрах стеклянная микроигла (x100)

Вывод

Динамика электрослияния бластомеров двухклеточного эмбриона мыши, представленная видеокдрами, позволяет различить все этапы этого процесса, в том числе и реорганизацию цитоскелета сливающейся пары.

Благодарности

Автор благодарит И.В.Пинигина за помощь в подготовке эмбрионов и н.с. В.И.Лисина за помощь в проведении микроманипуляций с эмбрионами.

Список литературы

- Биология развития млекопитающих. Методы: Пер. с англ. / Под ред. М. Манк. - М.: Мир, 1990. - 406с.
Зеленин А.В., Куц А.А., Прудовский И.А. Реконструированная клетка. - М.: Наука, 1982. - 207с.
Зеленин А.В., Бандрина И.Н. Ранние этапы слияния клеток // Биофизика мембран (Сер. Биология / ВИНТИ Т. 3). - М., 1984. - С. 218-242.
Лисин В.И. Методика изготовления металлических микроэлектродов // Вісник Полтавського ДСГІ. - Полтава. - 2001. - № 2-3. - С. 41-42.
Черномордик Л.В. Электростимулируемое слияние клеток // Успехи совр. биол. - 1984. - Т.98, вып.3 (6). - С. 395- 408.
Шигімага В.О. Апаратура для електрозлиття та вивчення провідності клітин // Вісник Харків. держ. техн. ун-ту с/г-ва. - Харків. - 2001. - Вип.6. - С. 386-389.
Suzuki H., Ogasawara I., Takahashi H.-et al. Electrofusion of blastomeres of hamster 2-cell embryos and dynamic changes of the cytoskeletal distribution // J. Reprod. Dev. - 2001. - Vol.47, №4. - P. 227-235.
 GENETRONICS inc., BTX division products catalog. - 2000. Protocol 01 17 BTX.
Zimmermann U., Neil G.A. Electromanipulation of cells. - N.Y.: CRC Press, 1996. - 375p.

ДИНАМІКА ЕЛЕКТРОЗЛИТТЯ БЛАСТОМЕРІВ ДВОКЛІТИННОГО ЕМБРІОНА МИШІ
В.О.Шигимага

У статті представлені відеокадри (з повного відеозапису) динаміки етапів злиття двоклітинного ембріона миші після електропробою мембран у місці контакту бластомерів. Електрозлиття проведено за допомогою апаратури власної розробки. Показано динаміку процесу перебудови цитоскелетів бластомерів, що зливаються, у фазовому контрасті. Проведено перевірку цілісності загальної мембрани злитого ембріона.

Ключові слова: *електрозлиття, динаміка, ембріон, цитоскелет, миша.*

DYNAMICS OF ELECTROFUSION OF MOUSE 2-CELL EMBRYO BLASTOMERES
V.A.Shigimaga

In article are presented video frames (from full video recording) of dynamics fusing stages of mouse 2-cell embryo after membrane breakdown in place of blastomeres contact. Electrofusion is carried out by means of own developed device. It is shown process of the cytoskeleton reorganization of fusing blastomeres in phase contrast. The continuity check of common membrane of fused embryo is conducted.

Key words: *electrofusion, dynamics, embryo, cytoskeleton, mouse.*

Представлено Ю.Є.Мегелем
Рекомендовано до друку Н.О.Бабенко