



## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ДЛЯ ВОДЫ У ДВУХКЛЕТОЧНОГО ЭМБРИОНА МЫШИ<sup>1</sup>

**В.Н. Погорелова**<sup>1</sup>  
**Е.В. Корниенко**<sup>1,2</sup>  
**М.А. Погорелова**<sup>1</sup>  
**А.И. Панаит**<sup>1</sup>  
**И.В. Маликов**<sup>1</sup>  
**А.Г. Погорелов**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН  
Россия, 142290, Московская обл.,  
г. Пущино, ул. Институтская 3  
Email: agrogorelov@rambler.ru

<sup>2</sup> Пущинский государственный  
университет, УЦ биофизики и  
биомедицины  
Россия, 142290, Московская обл.,  
г. Пущино

В работе изучали ответ двухклеточного эмбриона мыши на гиперосмотический стресс. Используя лазерную микротомографию (LSM) двухклеточного эмбрионы мыши с последующей его количественной трехмерной реконструкцией (3 DR), измеряли объем отдельной эмбриональной клетки. На основе полученных данных значение мембранной проницаемости для воды в гиперосмотических условиях оценили величиной  $0.1 \text{ мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{атм}^{-1}$ , что ниже значения ( $0.3 \text{ мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{атм}^{-1}$ ), полученного при гипоосмотическом стрессе. Выдвинуто предположение, что относительно низкий транспорт воды из клетки при сжатии blastomera обусловлен частичной компенсацией осмотических сил за счет адгезии клеточной мембраны и зоны пеллюцида, окружающей ранний эмбрион.

Ключевые слова: мембранная проницаемость для воды, двухклеточный эмбрион мыши, гиперосмотический стресс, количественная лазерная микротомография.

### Введение

Постоянство объема blastomera рассматривается как ключевой фактор нормального течения раннего эмбриогенеза [1, 2]. Даже кратковременное осмотическое воздействие вызывает в эмбриональной клетке увеличение активности р38 MAPK на фоне роста уровня ССМ2 [3]. При культивировании зародышей многих видов млекопитающих наблюдается блок развития, например для мыши, на стадии двух blastomeres [4, 5]. Предполагается, что отмеченный эффект индуцирован осмотическим стрессом, возникающим в момент выделения эмбриона из яйцевода [6].

Изменению клеточного объема всегда сопутствует осмотический шок, который непосредственно связан с механической деформацией мембраны и цитоскелета. Адаптивный ответ клетки представляет собой интегральную реакцию ряда мембранных систем, транспортирующих осмотически активные электролиты и органические осмолиты [7]. В цитируемой работе обсуждаются компенсаторные механизмы, направленные на восстановление цитоплазматического объема. Однако, в любом случае, изменение пространственного размера клетки обусловлено перераспределением воды через ее мембрану [8].

Количественным показателем, характеризующим мембранный транспорт воды, является эффективная проницаемость растворителя, но определить данный параметр для раннего эмбриона не удастся. Основная причина состоит в отсутствии методов измерения объема blastomera млекопитающих. Указанная проблема решается посредством количественной микротомографии [9]. Используя лазерную сканирующую микроскопию двухклеточного зародыша мыши с последующей его трехмерной реконструкцией, в данном исследовании определяли мембранную проницаемость для воды в гиперосмотических условиях.

<sup>1</sup> Работа выполнена при частичной поддержке Госконтракта 14.740.11.0956 от 29.04.2011 г.

### Объекты и методы исследования

Исследования проводили на мышах SHK из питомника ИТЭБ РАН (г. Пущино). Во время эксперимента животных содержали в стандартных условиях: температура в комнате  $20 \pm 2^\circ$ , гранулированный корм ПК-121-2, питье *at libitum*. Воду, корм и подстилку меняли ежедневно без предварительной стерилизации. Двухклеточные эмбрионы получали в соответствии с методикой, описанной ранее [10, 11]. Вымытые зародыши инкубировали в среде Дульбекко. В качестве контрольного образца использовали эмбрионы, взятые непосредственно после выделения из яйцевода. Осмотический шок моделировали изменением концентрации соли  $NaCl$  в среде Дульбекко, которая исходно содержит следующие компоненты:  $NaCl$  (130 мМ),  $KCl$  (2.7 мМ),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0.5 мМ),  $KH_2PO_4$  (1.5 мМ),  $CaCl_2$  (0.9 мМ),  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (7.0 мМ),  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  (1.3 мМ),  $pH=7.4$ .

Принципы методики подготовки препарата, основанной на сверхбыстрой криофиксации биологической ткани, описаны нами ранее [12-16]. Начальным этапом является криофиксация объекта в жидком пропане ( $85^\circ K$ ). Замороженные образцы лиофилизировали в вакууме ( $\sim 10^{-3}$  Па) при низкой температуре ( $173^\circ K$ ), используя установку МВА 5 (Balzers, Лихтенштейн). По завершении низкотемпературной дегидратации высушенный объект заключали в заливочную среду, приготовленную на основе эпоксидной смолы Epon 812 [17].

Измерение объема отдельного бластомера проводили посредством количественной микротомографии [9, 18]. После термополимеризации ( $330^\circ K$ ) заливочной смолы поверхность полученного блока затачивали стеклянным ножом. Подготовленный препарат изучали в конфокальном лазерном микроскопе (Leica, Австрия). В режиме прошедшего света получали вертикальную стопку оптических срезов с шагом 1 мкм.

Учитывая низкий контраст полученного цифрового изображения, каждый срез дополнительно обрабатывали по унифицированному алгоритму, для чего можно использовать среду Adobe Photoshop 6.0 или GIMP 2.2.17 [<http://gimp-win.sourceforge.net/>]. На микрофотографии эмбриона в плоскости каждого оптического среза обрисовывали контуры бластомеров и затем по серии последовательных контуров восстанавливали трехмерный вид эмбриональной клетки. Трехмерную реконструкцию проводили посредством стандартного графического редактора, например 3ds max [<http://www.discreet.com/>].

### Результаты и их обсуждение

На базе LSM нами была разработана технология создания компьютерной модели пространственного образа отдельного бластомера [18, 19]. Подход 3 DR, применительно к эмбриональной клетке, позволяет не только визуализировать объект сложной формы, но и определить его объемные характеристики (рис. 1).

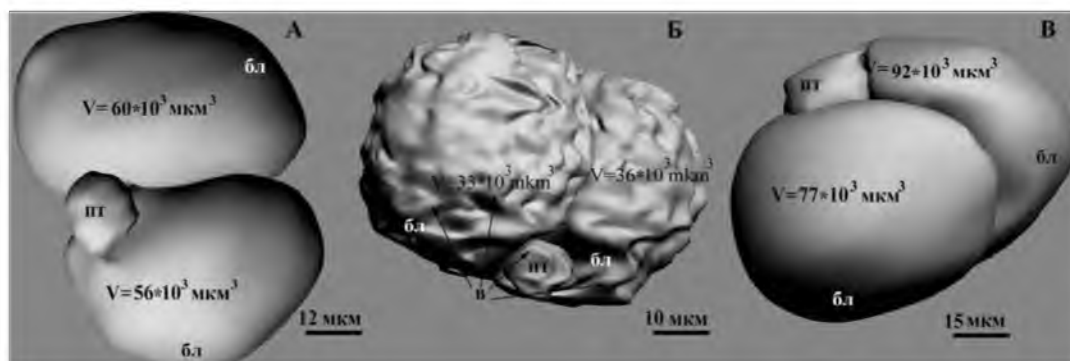


Рис. 1. Изображение двухклеточного эмбриона мыши, полученное посредством метода количественной LSM (фотография взята из [9]): (А) – сразу после выделения из яйцевода; (Б) – после 10 минут инкубации в гиперосмотической среде Дульбекко; (В) – после 10 минут инкубации в гипотонической среде Дульбекко. Обозначения: бл – бластомер, в – выросты, пт – полярное тельце, V – объем бластомера



В данной работе изолированный эмбрион инкубировали при осмотических условиях от 290 мОсм до 470 мОсм при 130 мМ и 220 мМ концентрации соли  $NaCl$  в среде Дульбекко, соответственно. Полагают, что размеры зародыша в первые минуты после его вымывания в среду с осмотичностью, близкой к физиологической величине, незначительно отличаются от интактного состояния [20]. Поэтому за начальную (контрольную) точку брали объемные характеристики эмбриональной клетки сразу после вымывания зародыша из яйцевода в обычный раствор Дульбекко (290 мОсм). В этом случае между получением эмбриона и его криофиксацией проходило не более 2 минут.

В течение осмотического стресса активизируются адаптивные механизмы, направленные на восстановление объема клетки. Другими словами, включаются системы компенсации осмотической силы, что может трансформировать как скорость, так и направление обмена воды между клеткой и внеклеточной средой. Поэтому транспорт воды обусловлен исключительно осмотическими условиями, задаваемыми в эксперименте, только в самом начале осмотического воздействия. В этой фазе минимальны сигнальные составляющие осмотического стресса (деформация мембраны, напряжение цитоскелета, изменение концентрации цитоплазматических веществ).

Для расчета эффективной проницаемости –  $L_p$  ( $\text{мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{атм}^{-1}$ ) мембраны бластомера для воды использовали известное выражение (1).

$$L_p = 0.0254(\Delta V/\Delta C)/(S t) \quad (1)$$

где  $\Delta V/\Delta C$  – приращение клеточного объема ( $\text{мкм}^3$ ) на единицу увеличения концентрации (мМ) соли  $NaCl$  в среде Дульбекко,  $S$  – площадь ( $\text{мкм}^2$ ) поверхности клетки,  $t$  – время (минуты) гиперосмотического воздействия.

В технологии LSM получить более короткий промежуток экспозиции затруднительно, что обусловлено ограничениями во времени, которые накладывают манипуляции с эмбрионом. Площадь поверхности клетки ( $S$ ) соответствует  $10^4 \text{ мкм}^2$  [9]. Отношение  $\Delta V$  к  $\Delta C$  определяли из экспериментальной зависимости, построенной для 5 минут осмотического стресса (рис. 2).

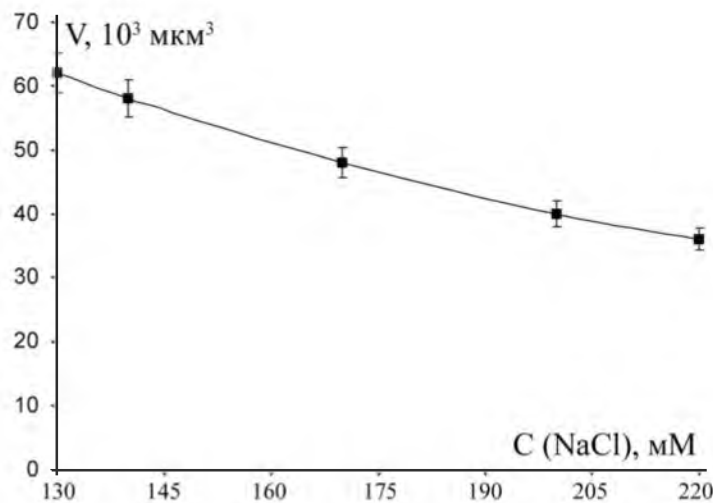


Рис. 2. Уменьшение на 5 минутах гиперосмотического стресса объема ( $10^3 \text{ мкм}^3$ ) бластомера двухклеточного эмбриона мыши в зависимости от увеличения концентрации (мМ) соли  $NaCl$  в среде Дульбекко. Сокращения:  $V$  – объем бластомера,  $C(NaCl)$  – концентрация соли в гипертонических условиях

Отметим, что уменьшение клеточного объема носит практически линейный характер в зависимости от увеличения концентрации соли  $NaCl$  в среде инкубации, т.е. от осмотичности среды. На основе полученных данных, была определена эффективная проницаемость мембраны бластомера для воды в гипертонических условиях, которая составляет  $0.1 (\text{мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{атм}^{-1})$ . Порядок величины свидетельствует о том, что транспорт воды идет посредством специфических аквапориновых каналов. Отметим, что значение эффективной проницаемости для воды при гипертоническом стрессе в

несколько раз меньше того, что было оценено применительно к гипотоническим условиям [21, 22].

То, что вода из клетки раннего эмбриона выходит медленнее, чем она транспортируется внутрь blastomera можно объяснить пространственной асимметрией аквапоринового канала. В этом случае скорость переноса воды будет зависеть от направленности вектора транспорта. Однако, при гипертонии более реальным представляется механизм частичной компенсации осмотических сил гидростатическими, возникающими за счет адгезии клеточной мембраны и оболочки эмбриона (рис. 3).

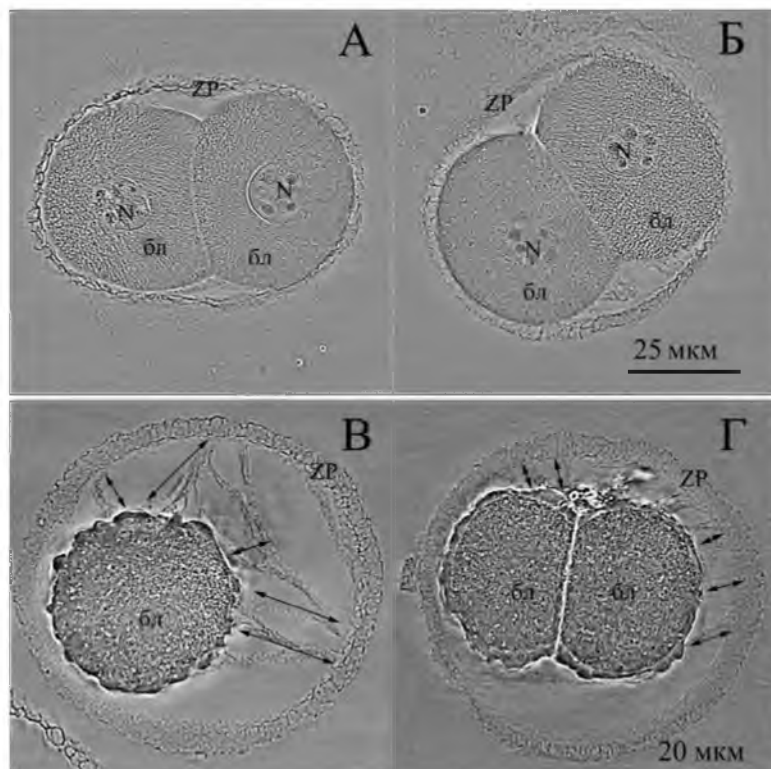
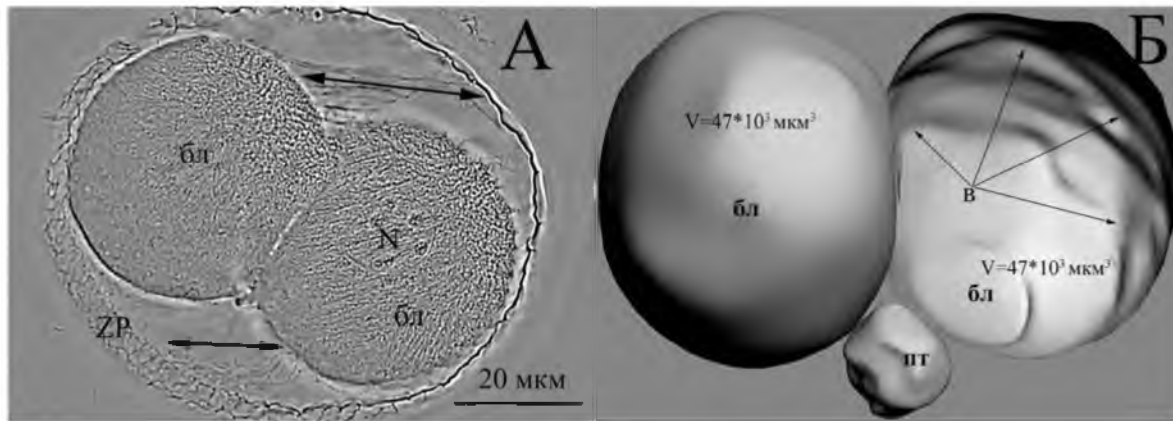


Рис. 3. Микрофотография оптического среза двухклеточных эмбрионов в области экваториального сечения: (А-Б) - сразу после выделения из яйцевода в обычный раствор Дульбекко, содержащий 140 мМ соли  $NaCl$ ; (В-Г) – после 15 минут экспозиции в гипертоническом растворе Дульбекко, содержащем 220 мМ соли  $NaCl$ . Обозначения: бл – blastomere, N – ядро blastomera, стрелками указаны тяжи, соединяющие blastomere и оболочку эмбриона (zp)

В этом случае скорость сжатия эмбриональной клетки должно замедляться упругими свойствами зоны пелюцида. Действительно, на микрофотографиях в нижнем ряду, которые соответствуют гипертоническим условиям, визуально наблюдаются тяжи, соединяющие blastomere и оболочку эмбриона. Возможно, эти структуры возникают в местах слипания мембраны и зоны пелюцида при уменьшении клеточного объема.

Было показано, что обычный раствор Дульбекко, содержащий 140 мМ соли  $NaCl$ , должен оказывать гипертоническое действие на изолированный эмбрион [17, 19, 21]. В этом случае уменьшение объема гораздо менее выражено, чем в гипертонических условиях, и пролонгировано во времени поэтому, его трудно наблюдать под бинокулярным стереомикроскопом. Однако количественная LSM наглядно подтверждается сжатие двухклеточного эмбриона при осмолярности среды в 310 мОсм – нормальной для культур дифференцированных клеток (рис. 4).



*Рис. 4.* Изображение двухклеточного эмбриона мыши, инкубированного 30 минут в обычном растворе Дульбекко, содержащем 140 мМ соли *NaCl*: (А) – микрофотография оптического среза зародыша в области экваториального сечения и (Б) – компьютерная модель, полученная в результате 3 DR зародыша. Обозначения: бл – бластомер, *N* – ядро бластомера, стрелками указаны тяжи, соединяющие бластомер и оболочку эмбриона (*zр*), *в* – выросты, *пт* – полярное тельце, *V* – объем бластомера

На микрофотографии (рис. 4А) между оболочкой эмбриона и бластомером видны характерные тяжи, которые образуются в условиях гиперосмотического стресса. Пространственное изображение эмбриона также показывает наличие на поверхности одной из клеток выпячивания, характерные для гипертонических условий. Отметим, что сестринские клетки по-разному реагируют на осмотический шок.

В завершение обсуждения результатов можно сделать следующие выводы. Бластомер двухклеточного эмбриона мыши на начальном этапе гипертонического стресса ведет себя в соответствии с законом Вант Гоффа. Значение эффективной проницаемости для воды через мембрану бластомера составляет  $\sim 0.1$  мкм/(мин $\times$ атм), что свидетельствует о наличии компенсаторных сил, возможно, обусловленных адгезией между бластомером и оболочкой эмбриона. На начальной стадии экспозиции обычная среда Дульбекко, осмотичностью 310 мОм, вызывает сжатие ( $\sim 16\%$ ) эмбриональной клетки, объем которой восстанавливается при дальнейшей инкубации.

### Список литературы

1. Van Winkle L.I., Patel M., Wasserlauf H.G., Dickinson H.R., Campione A.L. Osmotic regulation of taurine transport via system  $\beta$  and novel processes in mouse preimplantation conceptuses // *BBA*. – 1994. – Vol. 1191. – P. 244-255.
2. Biggers J.D., Lawitts J.A., Lechene C.P. The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos in vitro // *Mol. Reprod. Dev.* – 1993. – Vol. 34. – P. 380-390.
3. Fong B., Watson P.H., Watson A.J. Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation // *BMC Dev. Biol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 1-16.
4. Goddard M.J., Pratt H.P.M. Control of events during cleavage of the mouse embryo: an analysis of '2-cell block' // *Development*. – 1983. – Vol. 73. – P. 111-133.
5. Kishi J., Noda Y., Narimoto K., Umaoka Y., Mori T. Block to development in cultured rat 1-cell embryos is overcome using medium HECM-1 // *Hum. Reprod.* – 1991. – Vol. 6. – P. 1445-1448.
6. Baltz J.M., Tartia A.P. Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media // *Human Reprod.* – 2010. – Vol. 16. – P. 166-176.
7. Hoffmann E.K., Lambert I.H., Pederson S.F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates // *Physiol. Rev.* – 2009. – Vol. 89. – P. 193-277.
8. Agre P., Brown D., Nielsen S. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 1995. – Vol. 7. – P. 472-483.
9. Pogorelov A.G., Pogorelova V.N. Quantitative tomography of early mouse embryos: Laser Scanning Microscopy and 3-D reconstruction // *J. Microsc.* – 2008. – Vol. 232. – P. 36-43.

10. Березовская О.П., Межевкина Л.М., Вепринцев Б.Н. Метод культивирования доимплантационных зародышей мыши // Онтогенез. – 1986. – Т. 17, вып. 5. – С. 553-555.
11. Манк М. Биология развития млекопитающих. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
12. Pogorelov A.G., Allachverdov B.L., Burovina I.V., Mazay G.G., Pogorelova V.N. Study of potassium deficiency in cardiac muscle: quantitative X-ray microanalysis and cryotechniques // J. Microsc. – 1991. – Vol. 162. – P. 255-269.
13. Pogorelov A.G., Pogorelova V.N., Repin N.V., Mizin I.A. Quantitative electron probe microanalysis with a wavelength dispersive spectrometer // Scanning Microsc. – 1994. – Suppl. 8. – P.101-108.
14. Pogorelov A.G., Katkov I.I., Smolyaninova E.I., Goldshtein D.V. Changes in Intracellular Potassium and Sodium Content of 2-Cell Mouse Embryos Induced by Exposition to Vitrification Concentrations of Ethylene Glycol // CryoLetters. – 2006. – Vol. 27. – P. 87-98.
15. Pogorelov A.G., Katkov I.I., Pogorelova V.N. Influence of Exposition to Vitrification Solutions On 2-Cell Mouse Embryos: I. Intracellular Potassium and Sodium Content // CryoLetters. – 2007. – Vol. 28. – P. 403-408.
16. Погорелов А.Г., Гольдштейн Д.В. Электронно-зондовый микроанализ цитоплазматической концентрации элементов в одиночной клетке культуры и суспензии // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – Вып.2. – С. 84-91.
17. Glauert A.M., Lewis P.R. Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. - Princeton: Princeton University Press, 1998. – 326 p.
18. Погорелова М.А., Яшин В.А., Погорелов А.Г., Голиченков В.А. Количественная томография раннего эмбриона мыши // Доклады Академии Наук. – 2008. – Т. 418, вып. 5. – С. 712-714.
19. Погорелова М.А., Гольдштейн Д.В., Погорелов А.Г., Голиченков В.А. Анализ изменения объема клетки раннего эмбриона мыши, подверженного осмотическому шоку // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – Вып. 3. – С. 169-172.
20. Collins J.L., Baltz J.M. Estimates of Mouse Oviductal Fluid Tonicity Based on Osmotic Responses of Embryos // Biol. Repr. – 1999. – Vol. 60. – P. 1188-1193.
21. Погорелов А.Г., Погорелова В.Н. Кинетика изменения объема клетки раннего эмбриона мыши в гипоосмотических условиях // Биофизика. – 2009. – Т. 54. – С. 482-487.
22. Погорелова М.А., Голиченков В.А., Погорелова В.Н., Корниенко Е.В., Панаит А.И., Погорелов А.Г. Метод определения изотонической точки инкубационной среды для двухклеточного эмбриона мыши // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – Вып. 3 (в печати).

## MEMBRANE HYDRAULIC PERMEABILITY FOR TWO-CELL MOUSE EMBRYO

**V.N. Pogorelova**<sup>1</sup>

**E.V. Kornienko**<sup>1,2</sup>

**M.A. Pogorelova**<sup>1</sup>

**A.I. Panait**<sup>1</sup>

**I.V. Malikov**<sup>1</sup>

**A.G. Pogorelov**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Reg., 142290, Russia  
E-mail: agpogorelov@rambler.ru

<sup>2</sup> State University at Pushchino, Dept. Biophysics and Biomedicine, Pushchino, Moscow Reg., 142290, Russia

This work was aimed to investigate the osmotic response of two-cell mouse embryos to hyperosmotic stress. Applying Laser Scanning Microtomography (LSM) to single embryonic cell, blastomere volume was quantified with three dimensional reconstruction (3 DR). On the basis of data obtained we estimated the water permeability through cellular membrane as  $0.1 \text{ mkm} \times \text{min}^{-1} \times \text{atm}^{-1}$  at hyperosmotic conditions. This value was less than that of  $0.3 \text{ mkm} \times \text{min}^{-1} \times \text{atm}^{-1}$  determined for hypoosmotic shock. It was hypothesized that lower water release resulting in embryo shrinkage was provided by compensation of osmotic forces with adhesion between blastomere and zona pellucida layer.

Key words: membrane hydraulic permeability, two-cell mouse embryo, hyperosmotic stress, quantitative Laser Microtomography.