

**Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет**

**Ультраструктурная организация
химерных бластоцист мыши,
полученных с использованием
эмбриональных стволовых
клеток**

Сульдина Л.А.

Научный руководитель к.б.н., в.н.с. Киселева Е.В.

ИЦИГ СО РАН

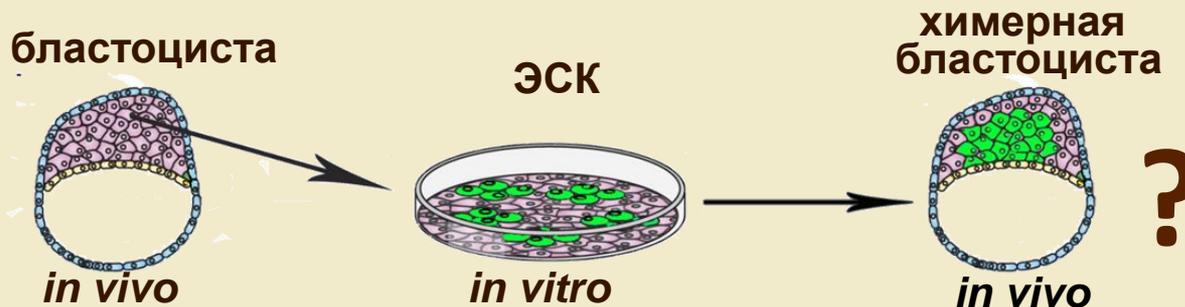
Актуальность работы

Исследование поведения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в условиях естественного тканевого и гуморального окружения живого организма относится к актуальным проблемам современной биологии.

Ранее показано, что ультраструктура и экспрессия многих генов клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты в процессе их культивирования *in vitro* для получения ЭСК, существенно изменяются уже на самых ранних пассажах (Tang et al., 2010; Морозова и др., 2012)

Какие изменения будут происходить со структурной организацией ЭСК при их переносе обратно в условия *in vivo*?

Химерные эмбрионы, широко используемые для изучения потенциала и дифференцировки клеток, являются удобной моделью для исследования этого вопроса.



Как изменяется морфофункциональная организация бластоцисты в ответ на введение ЭСК?

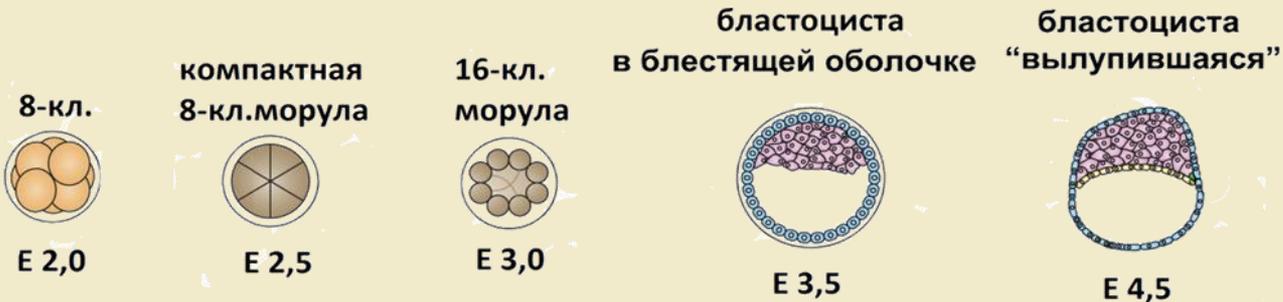
Цель: исследование общей организации и ультраструктуры клеток ранних химерных эмбрионов мыши, полученных инъекцией ЭСК в полость бластоцисты или агрегацией клеток морулы с ЭСК

Задачи

1. Оценить на полутонких срезах соотношение компонентов бластоцист мыши, количество и среднюю площадь клеток ВКМ и трофобласта в контрольных, а также химерных бластоцистах, полученных с использованием двух GFP-маркированных линий ЭСК методами агрегации и инъекции.
2. Исследовать ультраструктуру двух линий ЭСК мыши: *MA01-3E*, *Tau-GFP*, а также бластомеров на 8-клеточной стадии развития эмбриона.
3. Провести сравнительный анализ ультраструктуры химерных бластоцист, полученных методами инъекции и агрегации с использованием двух разных линий ЭСК и выяснить возможную причину меньшей выживаемости агрегационных эмбрионов по сравнению с инъекционными.
4. Определить, зависит ли организация химерных бластоцист мыши от линии ЭСК, использованной для получения химерных эмбрионов.

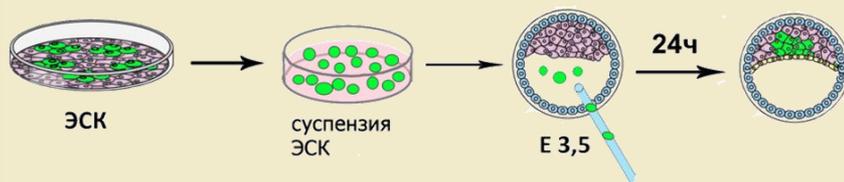
Схема получения химерных эмбрионов мыши

Нормальное развитие эмбриона мыши

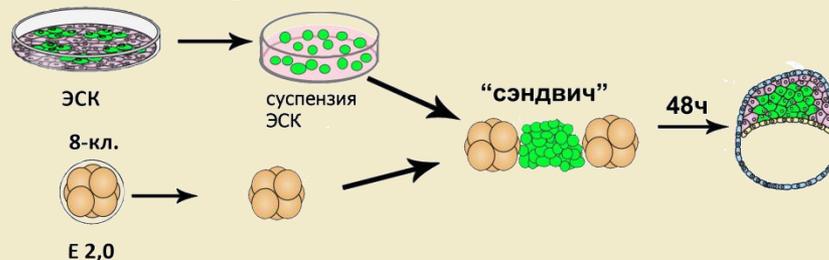


E2 – E4,5 дни эмбрионального развития после оплодотворения (Pauklin et al., 2011)

Инъекционный метод



Агрегационный метод



Проверка на выживаемость химер проводилась на стадии бластоцисты.

Доля живых эмбрионов составила 84%,
химерных среди них 40% (n=37)

Доля живых эмбрионов составила 66%,
химерных среди них 5% (n=60)

Химерные эмбрионы были получены к.б.н. Е.А. Кизиловой

Объекты

ЭСК линий MA01-3E, 20 пассажей, Tau-GFP, 47 пассажей.

Эмбрионы мышей линии C57Bl

- Интактные не культивированные бластоцисты (контроль)
- Интактные бластоцисты в блестящей оболочке и без неё, культивированные *in vitro* 24 часа (контроль)
- Бластоцисты, уколотые, без введения ЭСК, культивированные *in vitro* 24 часа (контроль)
- 8и-клеточные эмбрионы (контроль)
- Бластоцисты агрегированные из двух 8и-клеточных эмбрионов без ЭСК (контроль)

Химерные бластоцисты

- Инъекционные химерные эмбрионы, культивированные *in vitro* 24 часа
- Агрегационные химерные бластоцисты, полученные методом «сэндвич», культивированные *in vitro* 48 часов

(Линии ЭСК предоставлен к. б. н. А.Г. Мензоровым и к.б.н. Н.М. Матвеевой, химерные и контрольные эмбрионы получены к. б. н. Е.А. Кизиловой (лаб. генетики развития, ИЦиГ СО РАН))

Методы

- Световая микроскопия полутонких срезов, окрашенных метиленовым синим.
- Морфометрический анализ площади сечения компонентов бластоцисты, а также количества и средней площади клеток эмбриона.
- Просвечивающая электронная микроскопия

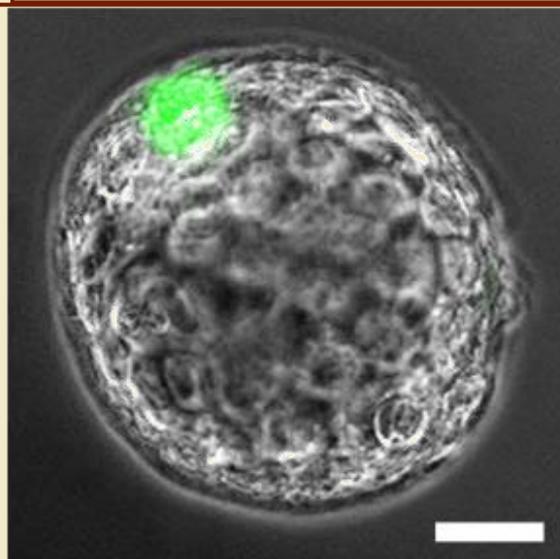
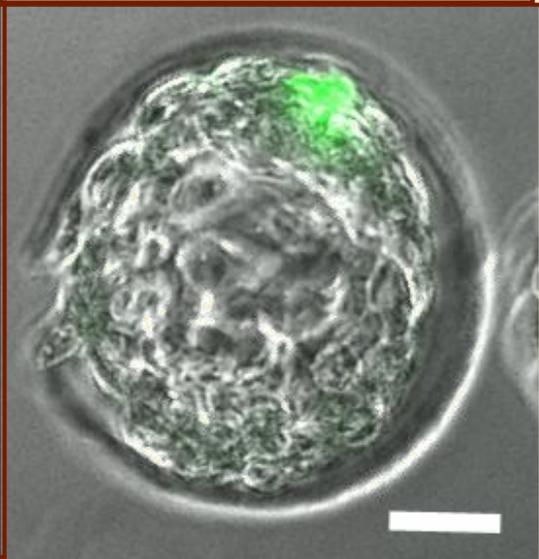
Исследование проведено с применением оборудования межинститутского центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Колонизация ВКМ химерных бластоцист мыши GFP-мечеными эмбриональными стволовыми клетками

химерные бластоцисты
с клетками *MA01-3E*

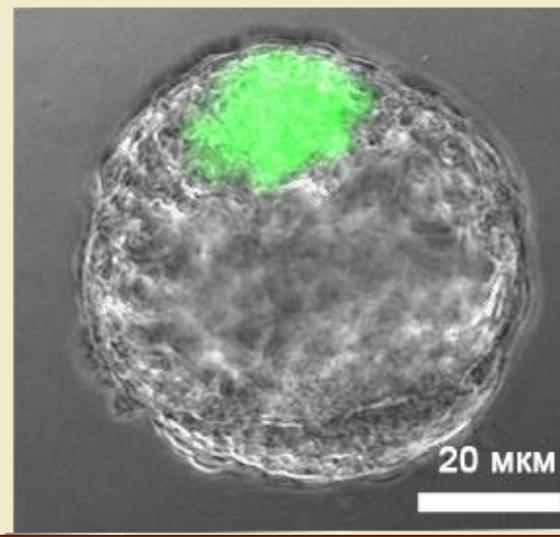
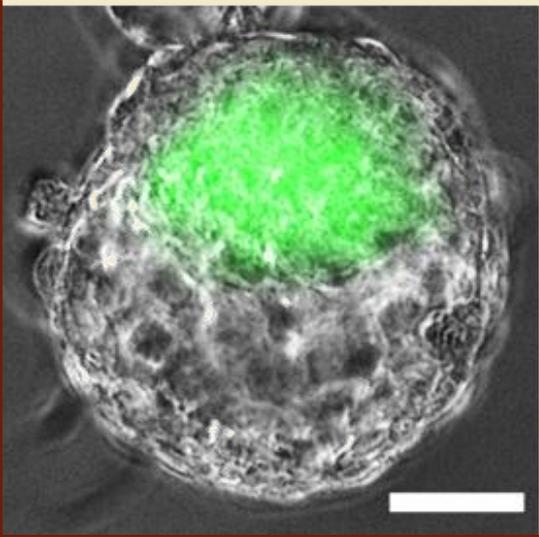
химерные бластоцисты
с клетками *Tau-GFP*

метод инъекции



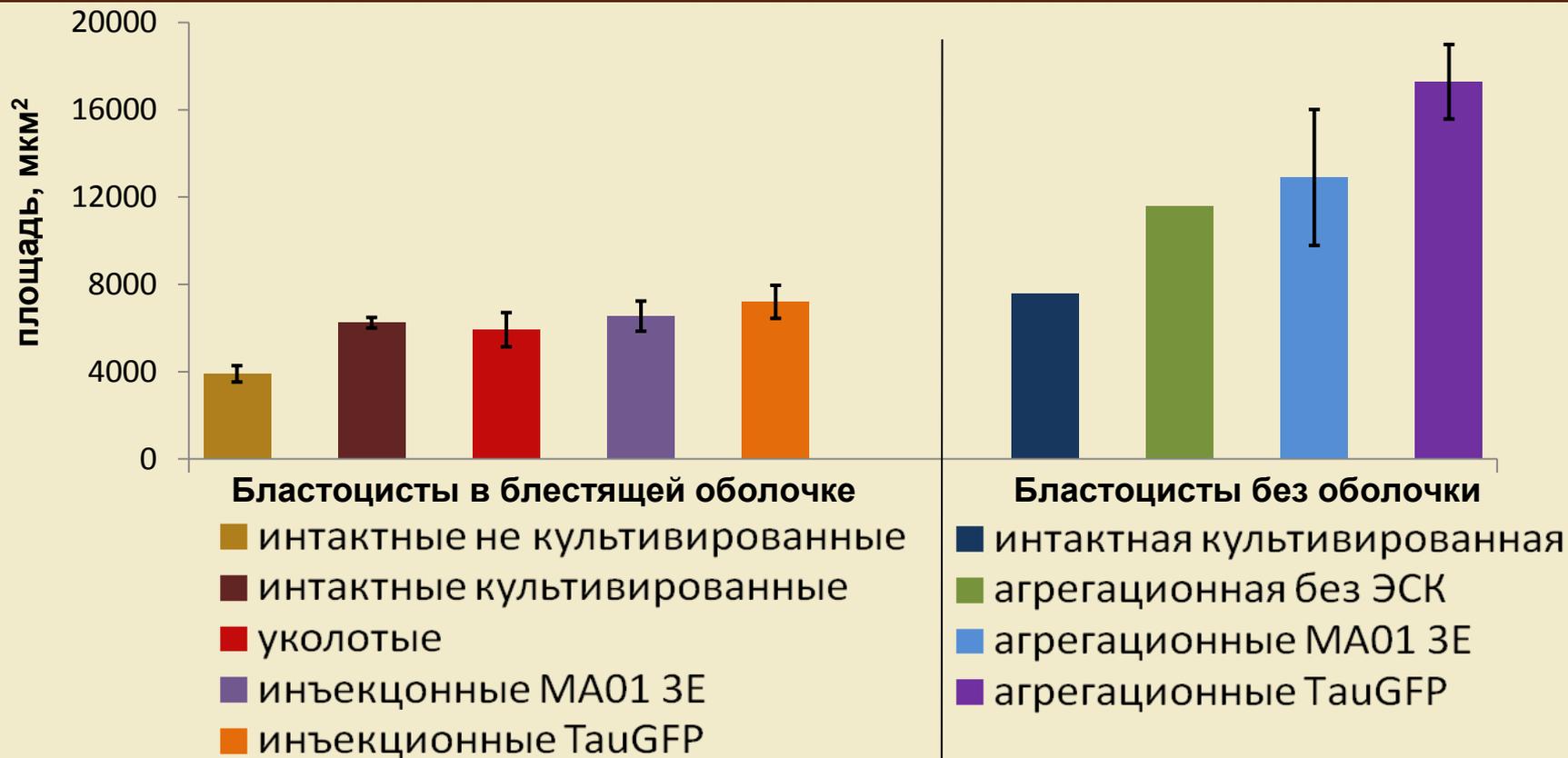
Инъецировано в
полость бластоцисты
10-15 клеток ЭСК

метод агрегации



Для агрегации
использовано 20-30
клеток ЭСК и
бластомеры двух 8-
клеточных эмбрионов

Средняя площадь бластоцист на срезах, проходящих через их центр

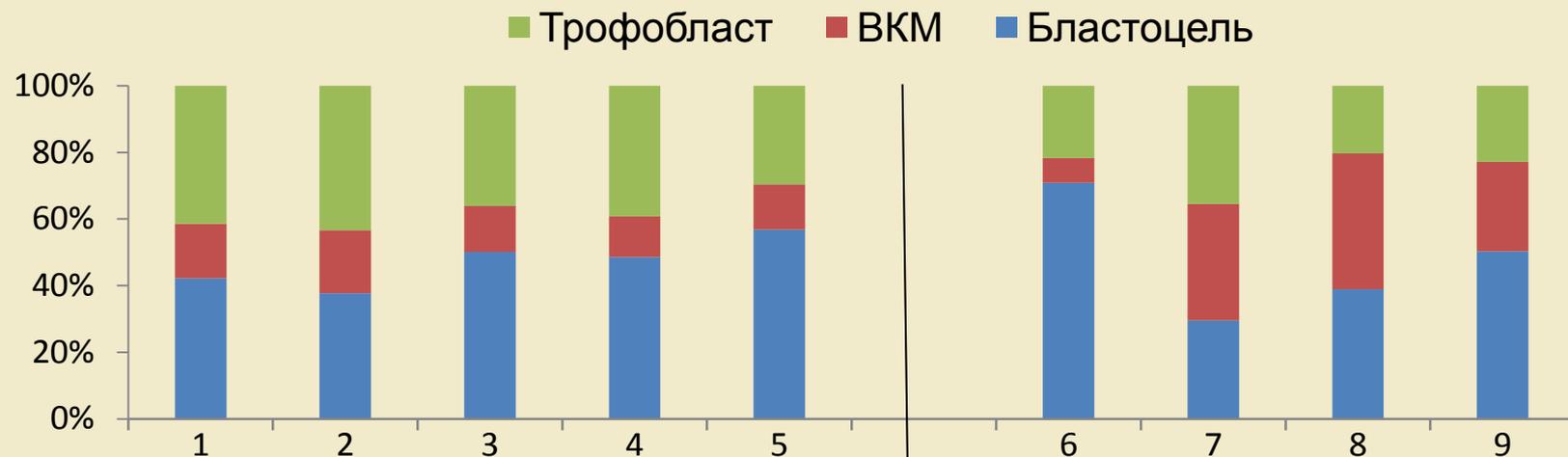


Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку

Культивирование и инъекция не препятствуют увеличению средней площади бластоцисты в процессе её развития.

Средняя площадь сечения агрегационных бластоцист относительно контрольных существенно увеличена по сравнению с инъекционными эмбрионами, средняя площадь которых не отличается от контроля.

Относительные размеры компонентов бластоцист в разных экспериментальных группах



Бластоцисты в блестящей оболочке

- 1 - интактные не культивированные
- 2 - интактные культивированные
- 3 - уколотые
- 4 - инъекционные с MA01-3E
- 5 - инъекционные с Tau-GFP

Бластоцисты без блестящей оболочки

- 6 - интактная культивированная
- 7 - агрегированная без ЭСК
- 8 - агрегационные с MA01-3E
- 9 - агрегационные с Tau-GFP

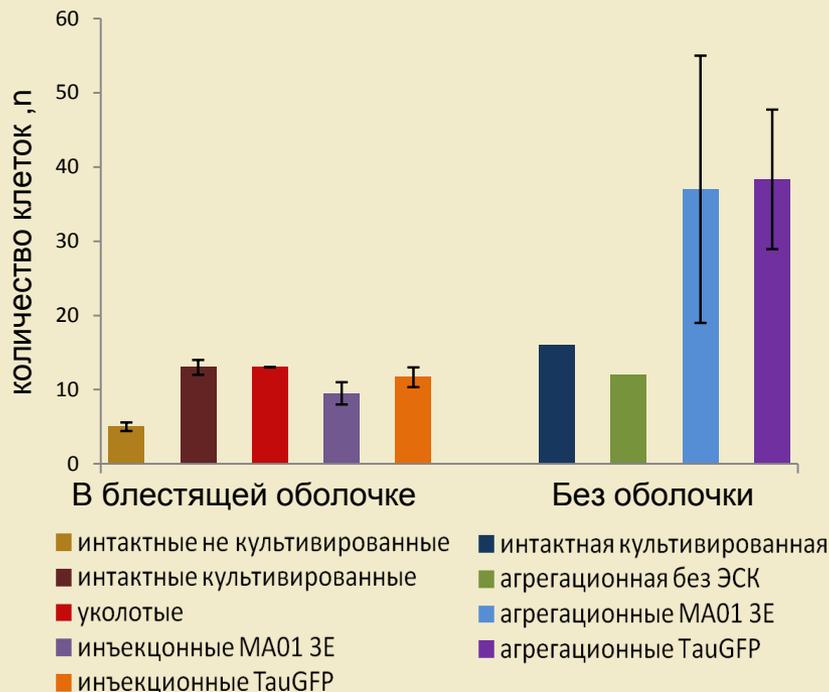
За 100% взята площадь бластоцелли, высота цветных столбиков демонстрирует, какой процент от площади эмбриона занимает площадь каждого из её компонентов – бластоцели, ВКМ и трофобласта.

Укол и инъекция ЭСК увеличивают относительный размер бластоцели, что, возможно, связано с ускорением развития.

Агрегация бластомеров без ЭСК и с ними нарушает соотношение компонентов бластоцист, характерное для интактных без блестящей оболочки.

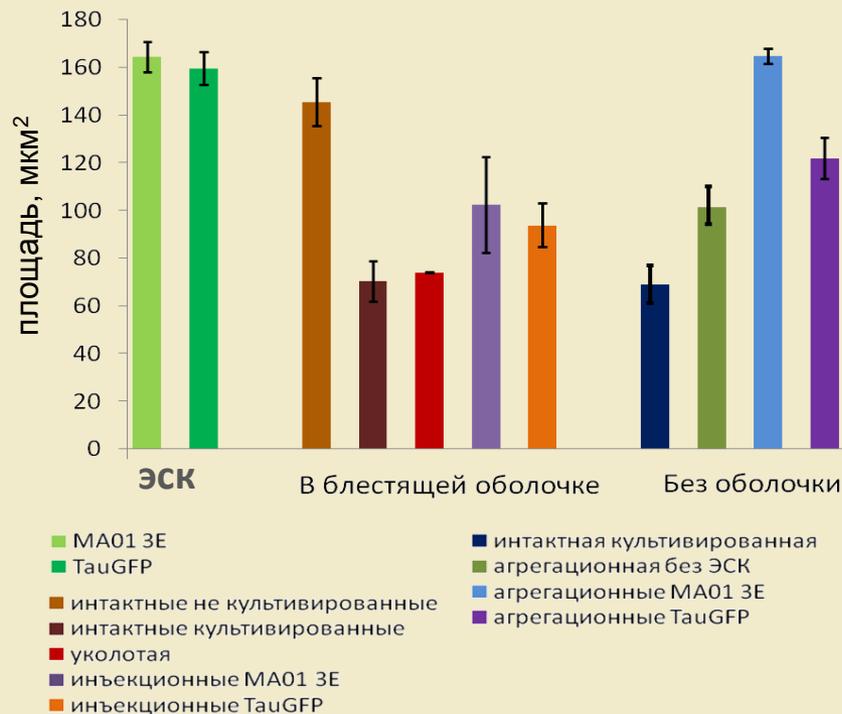
Количество и средняя площадь клеток ВКМ в исследованных группах бластоцист и ЭСК

Среднее количество клеток ВКМ



Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку.

Средняя площадь ЭСК и клеток ВКМ

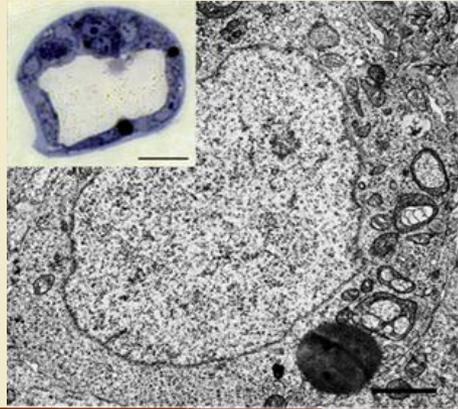


Увеличение количества и уменьшение площади клеток ВКМ в культивированных бластоцистах в оболочке по сравнению с интактными, вероятно, связано с развитием эмбриона.

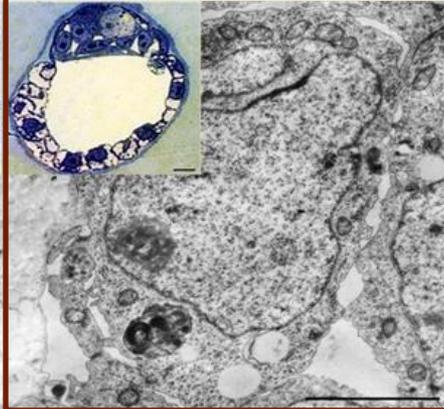
Увеличенное количество клеток ВКМ агрегационных бластоцист относительно контрольных обусловлено количеством клеток, вовлеченных в формирование эмбриона.

Ультраструктура клеток ВКМ контрольных и инъекционных бластоцист

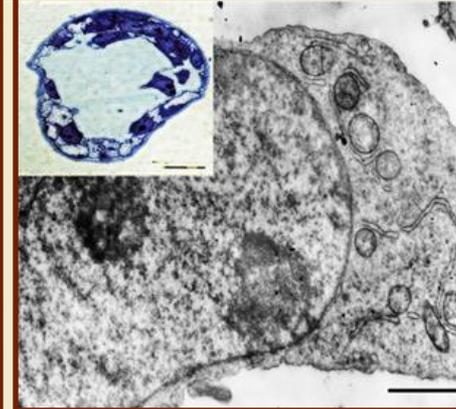
некультивированная
бластоциста



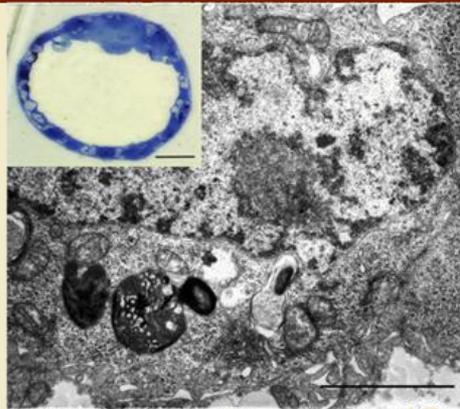
культивированная
бластоциста



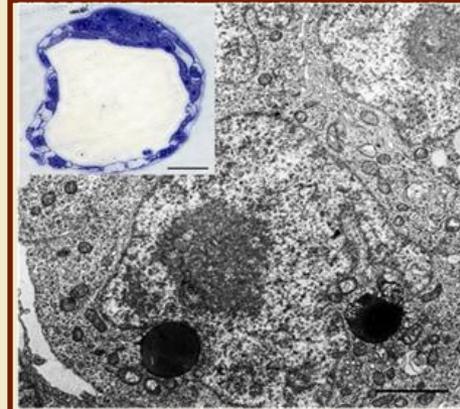
бластоциста уколота без
введения ЭСК



инъекционная
бластоциста с
клетками
MA01-3E



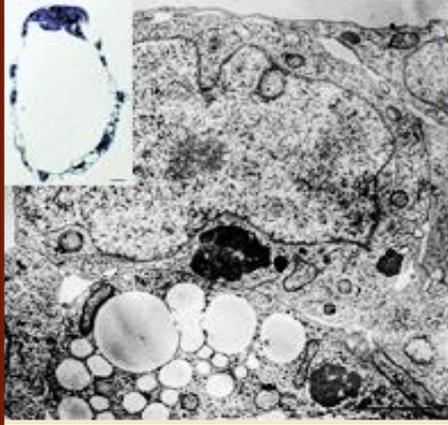
инъекционная
бластоциста с
клетками *Tau-
GFP*



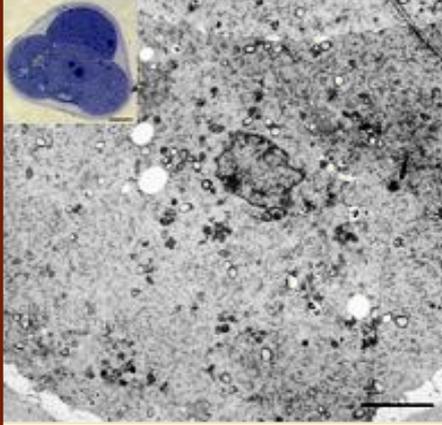
В цитоплазме клеток всех культивированных бластоцист увеличивается количество лизосомных элементов и отсутствуют филаменты и митохондрии вакуолями, характерные для клеток некультивированных эмбрионов. Выявлены отличия в строении клеток инъекционных бластоцист, полученных с разными линиями ЭСК (по строению митохондрий).

Ультраструктура клеток 8-клеточного эмбриона и ВКМ агрегационных бластоцист

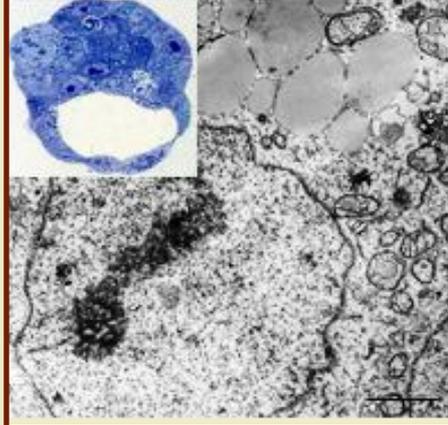
интактная бластоциста без блестящей оболочки



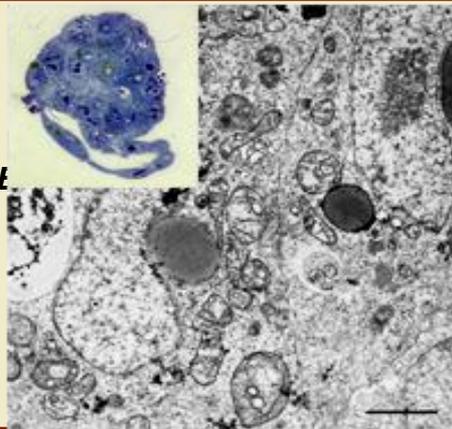
8-клеточный эмбрион



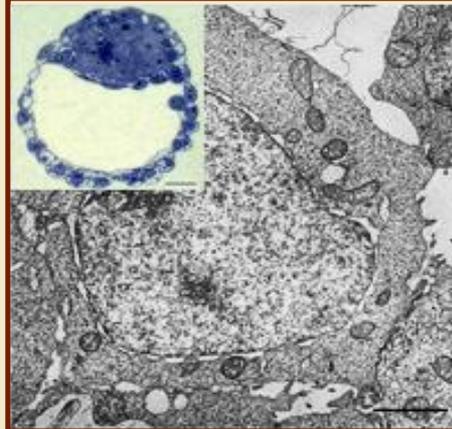
бластоциста агрегированная без ЭСК



агрегационная бластоциста с клетками MA01-3E



агрегационная бластоциста с клетками Tau-GFP



Агрегационные бластоцисты, полученные с ЭСК MA01-3E сходны по присутствию митохондрий с вакуолями и промежуточных филаментов с клетками бластоцист, полученных без ЭСК, и существенно отличаются от клеток агрегационных бластоцист, полученных с ЭСК Tau-GFP, не содержащих подобных структур. Количество лизосомных компонентов во всех клетках увеличено.

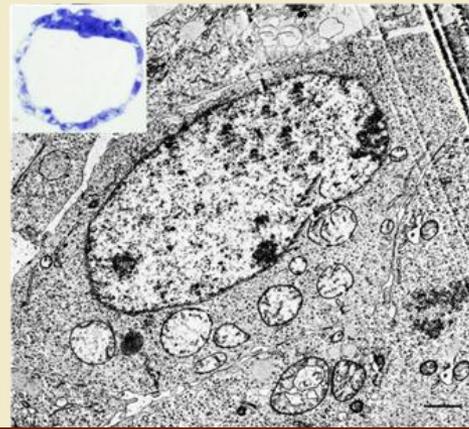
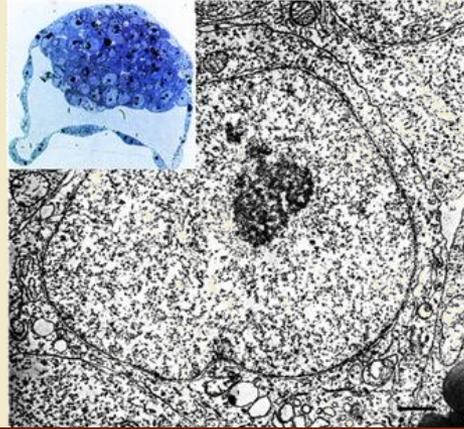
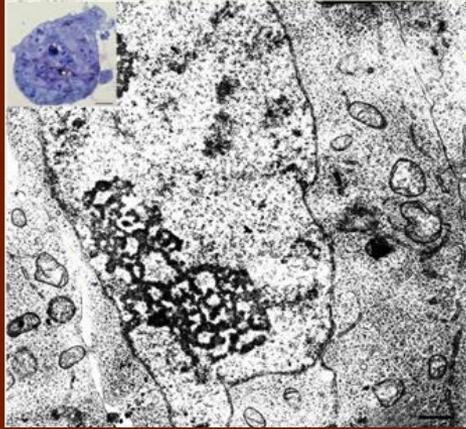
Ультраструктура ЭСК в условиях *in vitro* и при переносе *in vivo*

ЭСК в культуре

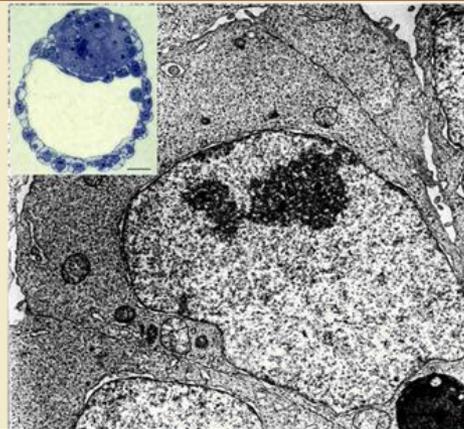
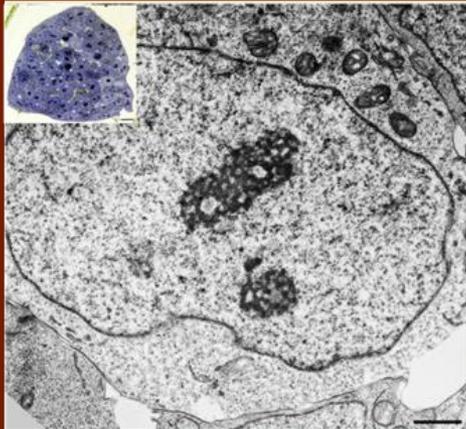
ЭСК в ВКМ агрегационных
бластоцист

ЭСК в ВКМ инъекционных
бластоцист

MA01-3E



Tau-GFP



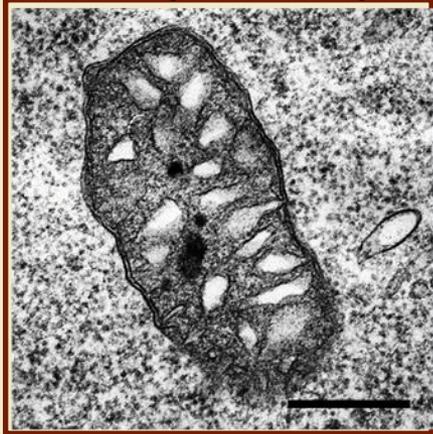
В колониях ЭСК *Tau-GFP* встречаются 2 типа клеток, различающихся по строению митохондрий, в отличие от колоний линии *MA01-3E*, содержащих 3 типа клеток с разным строением митохондрий.

При переносе ЭСК в условия *in vivo* нарушается морфология митохондрий, но общее строение клеток сохраняется.

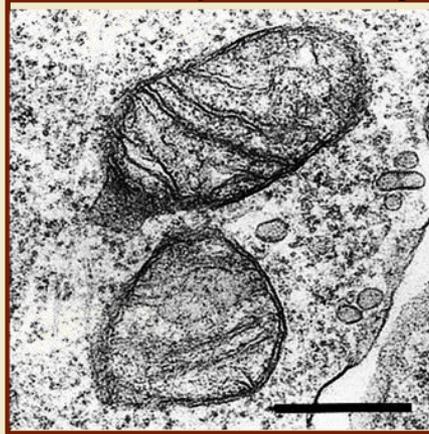
В отличие от клеток ВКМ, в цитоплазме ЭСК количество лизосомных компонентов не увеличивается.

Ультраструктура митохондрий в ЭСК в условиях *in vitro* и при переносе ЭСК в условия *in vivo*

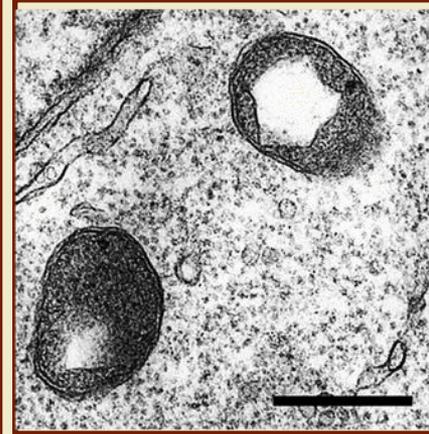
Гетерогенное строение митохондрий в ЭСК в условиях *in vitro*



расширенные кристы

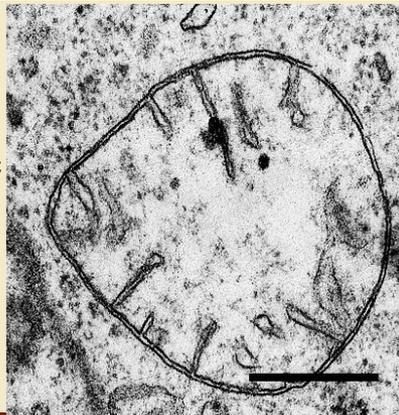


длинные узкие кристы



крупные вакуоли

В ВКМ
химерных
бластоцист с
клетками
MA01-3E



В ВКМ
химерных
бластоцист с
клетками *Tau-
GFP*

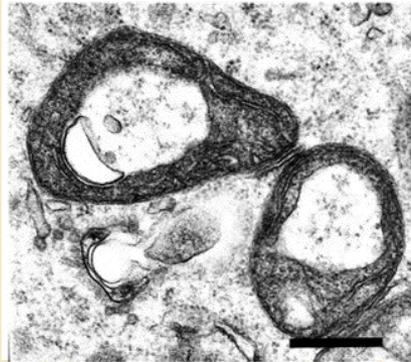


короткие кристы

При переносе в условия *in vivo* в клетках обеих линий митохондрии более гомогенны по строению, увеличены в размере, имеют светлый матрикс и короткие кристы.

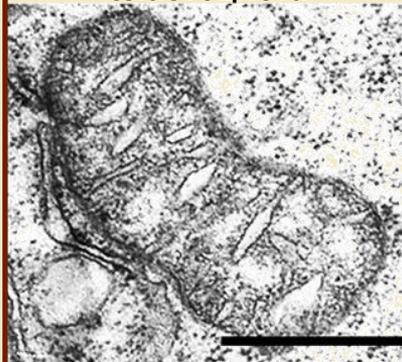
Ультраструктура митохондрий в клетках ВКМ контрольных и инъекционных бластоцист

некультивированная
бластоциста



крупные вакуоли в матриксе

культивированная
бластоциста



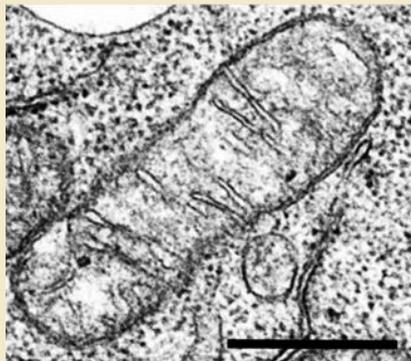
расширенные кристы

бластоциста уколота без
введения ЭСК



расширенные кристы

инъекционная бластоциста с клетками *MA01-3E*

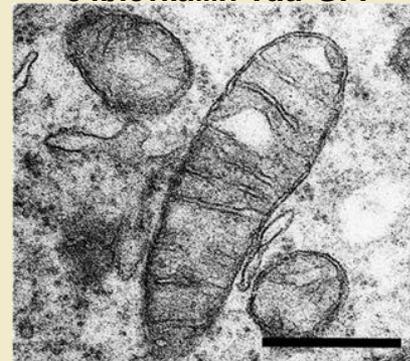


тонкие кристы



расширенные короткие кристы

инъекционная бластоциста
с клетками *Tau-GFP*

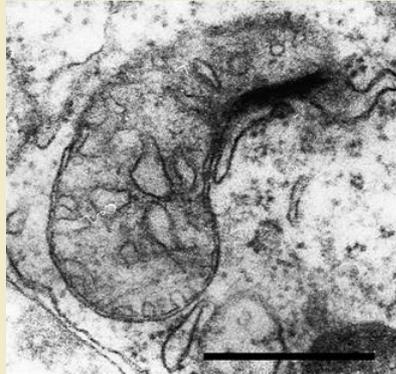


тонкие кристы

Исчезновение митохондрий с вакуолями, характерных для некультивированных бластоцист, вероятно, связано с продолжающимся развитием эмбриона в условиях культивирования. Митохондрии в клетках ВКМ инъекционных бластоцист, полученных с ЭСК линии *MA01-3E*, более гетерогенны по морфологии, чем в клетках бластоцист с ЭСК линии *Tau-GFP*

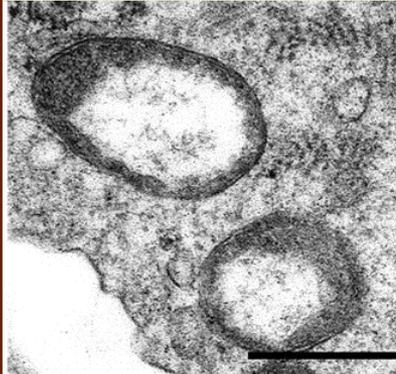
Ультраструктура митохондрий клеток 8-клеточного эмбриона и ВКМ контрольных и агрегационных бластоцист

интактная бластоциста без оболочки



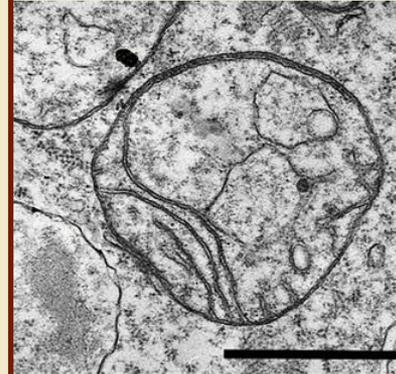
расширенные кристы

8-клеточный эмбрион



крупные вакуоли в матриксе

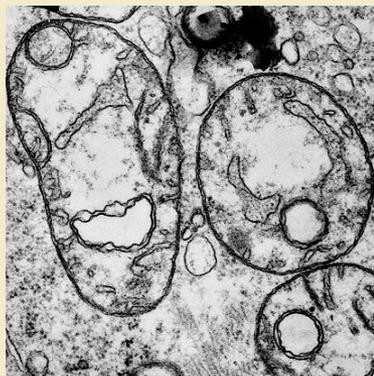
бластоциста агрегированная без ЭСК



нарушенное строение крист, присутствие вакуолей

агрегационная бластоциста с клетками *MA01-3E*

нарушенное строение и беспорядочное расположение крист, присутствие вакуолей

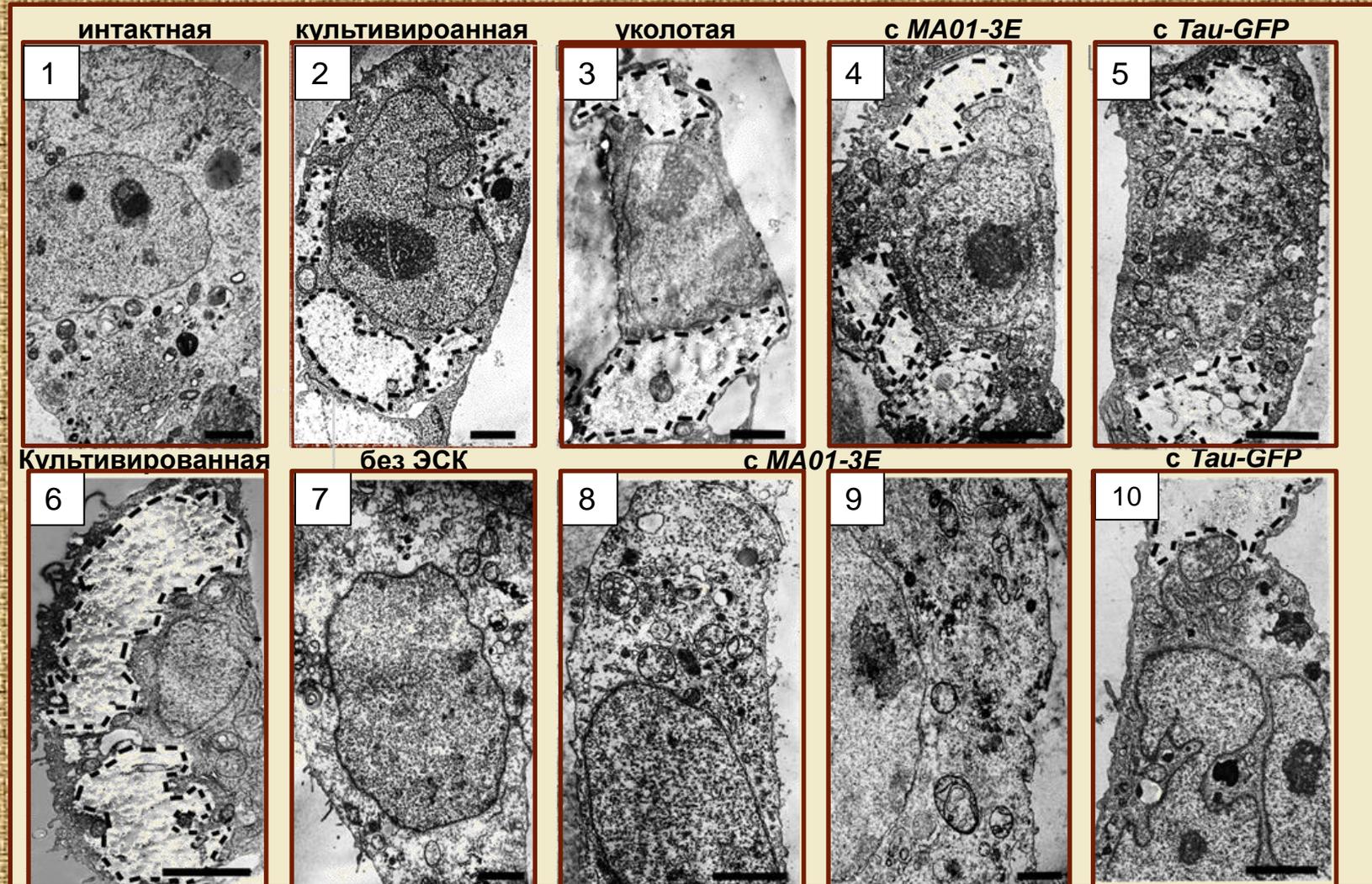


агрегационная бластоциста с клетками *Tau-GFP*

светлый матрикс, расширенные кристы

В агрегационных эмбрионах, полученных без ЭСК и с ЭСК линии *MA01-3E* при культивировании в митохондриях сохраняются вакуоли, однако нарушается строение крист и их расположение в матриксе. Митохондрии с вакуолями отсутствуют в эмбрионах с ЭСК линии *Tau-GFP*.

Строение клеток муральной трофобласта в контрольных (1-3; 6) инъекционных (4, 5) и агрегационных (7-10) бластоцистах

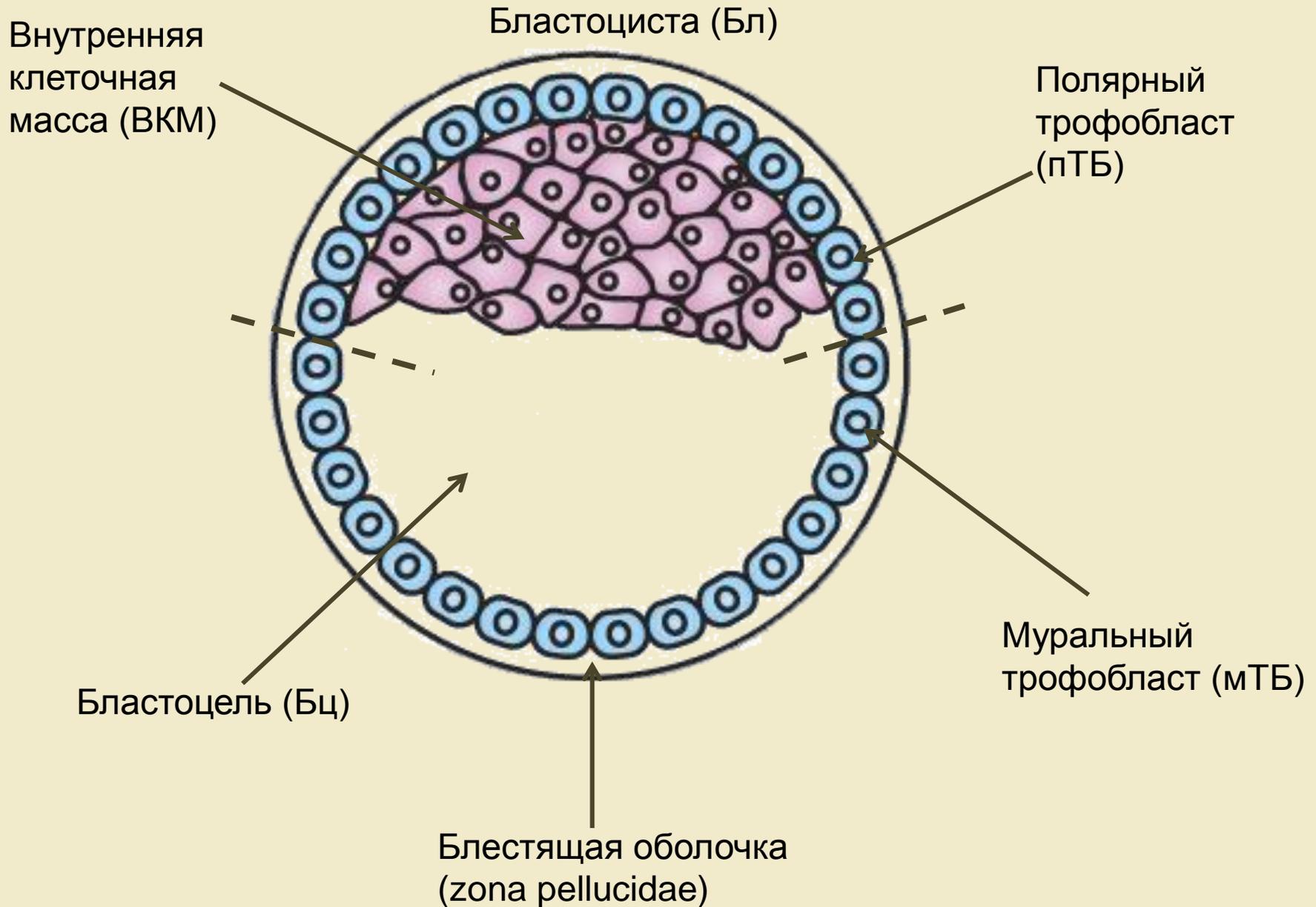


В культивированных и инъекционных бластоцистах (2-6) строение трофобласта нарушается, в цитоплазме появляются крупные включения аморфного материала (отмечены пунктиром). В агрегационных бластоцистах, полученных без ЭСК и с ЭСК линии MA01-3E аморфные включения отсутствуют, а в бластоцистах с ЭСК *Tau-GFP* – выявляются.

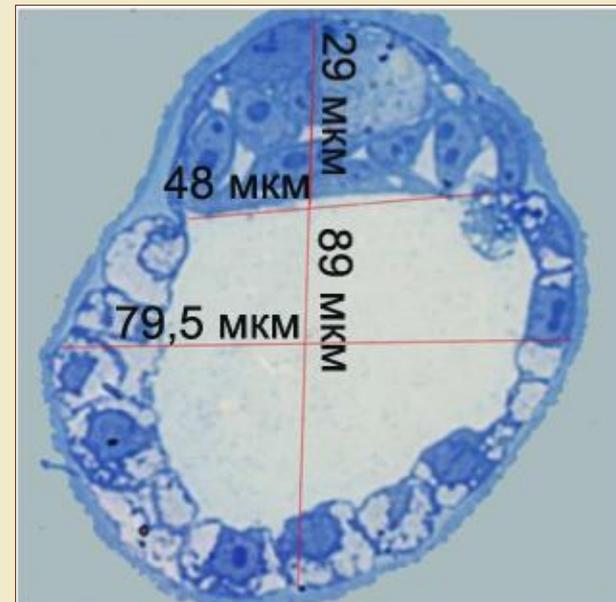
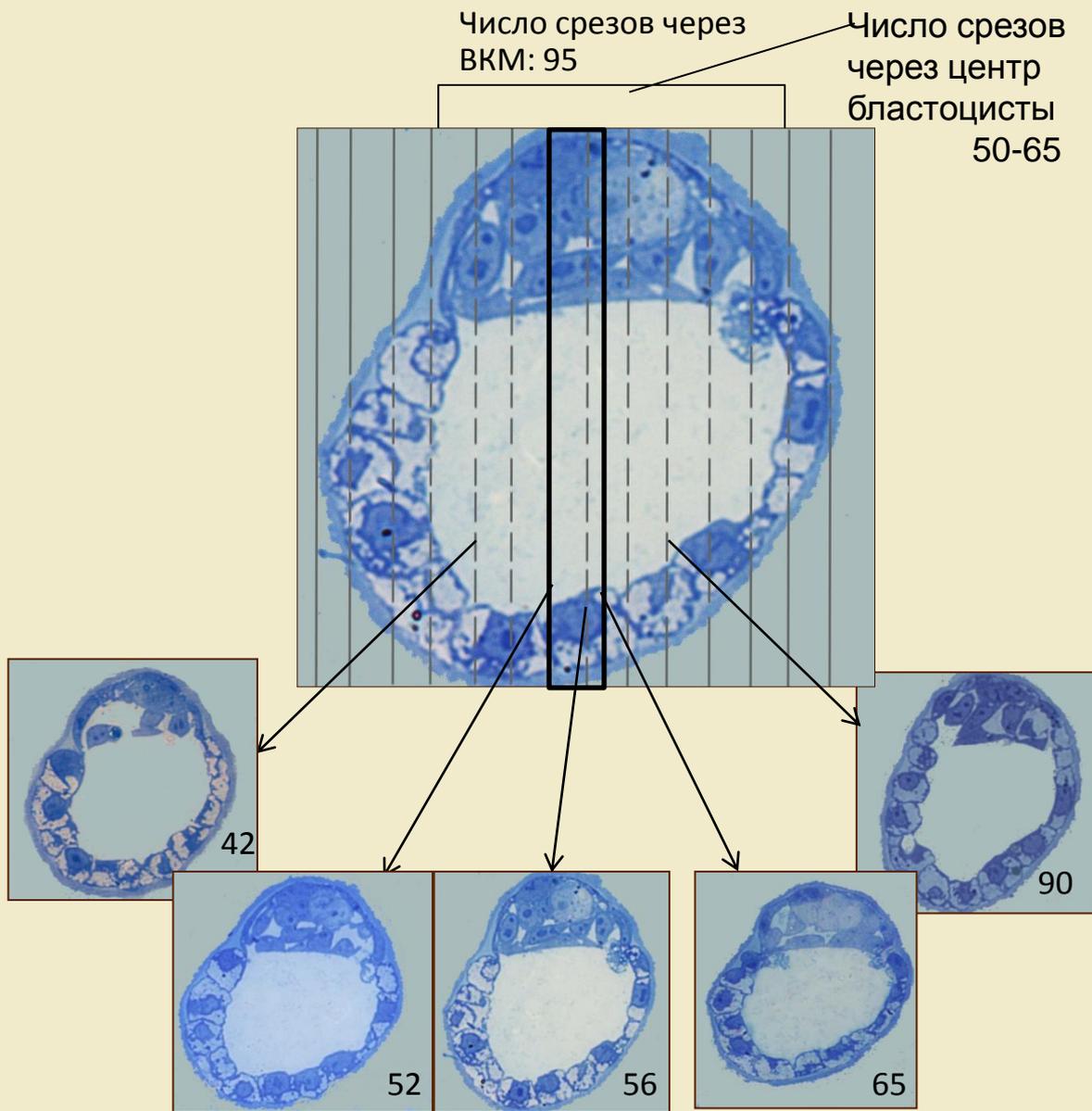
Выводы

1. Культивирование не влияет на соотношение бластоцели, ВКМ и трофобласта в бластоцистах, однако увеличивает активность лизосомных компонентов в клетках ВКМ и изменяет строение трофобласта, вызывая формирование аморфных включений в цитоплазме.
2. ЭСК линий *Tau-GFP* и *MA01-3E* отличаются по плотности клеток в колониях и гетерогенности строения митохондрий. Перенос ЭСК из условий *in vitro* в условия *in vivo*, при формировании инъекционных или агрегационных химерных эмбрионов, изменяет строение митохондрий, однако не влияет на общую морфологию ЭСК.
3. Соотношение компонентов инъекционных химерных бластоцист не зависит от линии ЭСК, однако ЭСК по-разному влияют на морфологию клеток ВКМ. ЭСК линии *MA01-3E*, в отличие от *Tau-GFP*, нарушают морфологию митохондрий в клетках ВКМ химерных эмбрионов. Организация агрегационных зародышей более зависима от линии ЭСК, чем инъекционных.
4. Эмбрионы, полученные агрегацией бластомеров с ЭСК линии *MA01-3E*, схожи по морфологии клеток ВКМ и трофобласта с агрегационными бластоцистами без использования ЭСК. Эмбрионы, полученные с использованием ЭСК линии *Tau-GFP* более схожи по строению клеток ВКМ и трофобласта с интактными культивированными бластоцистами.
5. Выявлено увеличение количества клеток ВКМ в культивированных, уколотых и инъекционных бластоцистах, что в совокупности с присутствием делящихся клеток и уменьшением их средней площади, свидетельствует о продолжении развития зародышей в условиях *in vitro*. Увеличение числа и площади клеток в агрегационных бластоцистах обусловлено присутствием большого количества ЭСК.
6. Возможными причинами сниженной жизнеспособности агрегационных химер по сравнению с инъекционными могут быть: увеличенный размер эмбриона, изменение соотношения размеров бластоцели, ВКМ и трофобласта, а также нарушение строения клеток трофобласта.

Схема строения ранней интактной бластоцисты



Получение срезов, проходящих через центр бластоцисты, для морфометрического анализа



Параметры интактной бластоцисты на срезе: ширина 79 мкм, высота 89 мкм, ширина ВКМ 48 мкм, высота ВКМ 29 мкм