

РОЛЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В РАЗВИТИИ ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Чернов А.С.¹, Теплов И.Ю.², Василов Р.Г.¹

¹ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

пл. Аккад. Курчатова, 1, г. Москва, 123098, РФ

²ФГБУН Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: alexandrchernov1984@gmail.com

Аннотация. В представленной работе был измерен трансмембранный потенциал (V_{mem}) в ооцитах и эмбрионах мыши в течение всего доимплантационного периода развития с помощью метода patch-clamp в конфигурации whole-cell. Установлено, что на стадии ооцита значение V_{mem} находится на уровне $-13,2 \pm 1,54$ мВ. Переход к одноклеточной стадии, после оплодотворения, характеризуется деполяризацией мембранного потенциала, в результате чего его значение достоверно повышается до $-9,4 \pm 1,07$ мВ. Последующие этапы деления-дробления эмбриона сопровождаются постепенной гиперполяризацией ($V_{\text{mem}} = -10,8 \pm 1,03$ мВ для 2-х клеточной и $V_{\text{mem}} = -13,7 \pm 1,61$ мВ для 4-х клеточной стадий), и достигают минимального значения у 8-клеточного эмбриона ($-22,9 \pm 1,63$ мВ). При переходе к многоклеточности, на стадии морулы и бластоцисты, наблюдается повторная деполяризация, значения V_{mem} составили $-18,1 \pm 1,17$ мВ и $-10,3 \pm 0,9$ мВ соответственно. Таким образом, процессы оплодотворения и первичной дифференцировки клеток на стадии бластоцисты являются реперными точками в доимплантационном развитии, характеризующиеся деполяризацией мембранного заряда. Полученные данные позволяют говорить о важной роли трансмембранного потенциала в раннем развитии эмбрионов млекопитающих, и возможно, с его помощью можно будет управлять процессами пролиферации и дифференцировки не только на уровне эмбриона, но и целого организма.

Ключевые слова: доимплантационные эмбрионы, раннее развитие, биоэлектрические сигналы, трансмембранный потенциал.

ROLE OF THE TRANSMEMBRANE POTENTIAL IN PREIMPLANTATION MAMMALIAN EMBRYOS

Chernov A.S.¹, Teplov I.U.², Vasilov R.G.¹

¹National Research Center «Kurchatov Institute»

sq. Akademika Kurchatova, 1, Moscow, 123098, Russia

²Institute of cell biophysics RAS

Institutskaya st., 3, Pushchino, 142290, Russia

e-mail: alexandrchernov1984@gmail.com

Abstract. In this work the transmembrane potential (V_{mem}) has been measured in oocytes and mice embryos during all preimplantation period of development by means of the patch-clamp method in whole-cell configuration. It is established that at an oocyte stage the V_{mem} value is at the level of $-13,2 \pm 1,54$ mV. Transition to a one-celle stage, after fertilization, is characterized by depolarization of membrane potential therefore its value authentically increases to $-9,4 \pm 1,07$ mV. The subsequent stages of division crushing of an embryo are followed by gradual hyperpolarization ($V_{\text{mem}} = -10,8 \pm 1,03$ mV for the two-cell and $V_{\text{mem}} = -13,7 \pm 1,61$ mV for the four-cell stages), and reach the minimum value at a 8-cell embryo ($-22,9 \pm 1,63$ mV). Upon transition to a multicells, at a stage of a morula and a blastocyst, repeated depolarization is observed, V_{mem} values were $-18,1 \pm 1,17$ mV and $-10,3 \pm 0,9$ mV respectively. Thus, processes of fertilization and primary differentiation of cages at a stage of a blastocyst are defined points in preimplantation development, characterized by depolarization of a membrane charge. The obtained data allow to speak about an important role of transmembrane potential in early embryo development of mammals, and with his help it will be possible to operate processes of proliferation and a differentiation not only at the level of an embryo, but also the whole organism.

Key word: preimplantation embryos, early embryo development, bioelectric signals, transmembrane potential.

Ионные каналы на цитоплазматической мембране играют важную роль в формировании мембранного градиента напряжения (трансмембранного потенциала, V_{mem}), создавая ток неорганических ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) против их электрохимического градиента [1]. Для всех типов клеток, как электровозбудимых, так и невозбудимых, характерно наличие V_{mem} [2,3]. Колебания трансмембранного потенциала во время прохождения клеточного цикла показано не только для нейронов, мышечных кардиальных клеток, но и для невозбудимых клеток, включая ооциты хомяков и мышей в процессе созревания [4-6]. Модуляция V_{mem} внешними электрическими полями или химической блокировкой ионных каналов приводит к остановке клеточного цикла в делящихся клетках Т- и В-лимфоцитов, эндотелия, Шванновских клетках [7-10], а искусственная гиперполяризация мембранного потенциала способна вызывать дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в адипогенном и остеогенном направлении [11]. С другой стороны, электропорация мембраны, сопровождающаяся деполяризацией, активирует гиперпролиферацию и де-дифференцирование бластных клеток тритона при регенерации [12]. Таким образом, трансмембранный потенциал является важным механизмом регулирования пролиферации и дифференцирования клеток. Однако до сих пор остаются неясными механизмы, связывающие мембранный потенциал с клеточным циклом, пролиферацией и дифференцировкой.

Картина понимания подобного рода взаимодействий становится еще более сложной, когда речь заходит о многоклеточном организме, клетки которого непрерывно генерируют и передают друг другу биоэлектрические сигналы во время развития организма и регенеративных процессов. Расширение диапазона модельных объектов, используемых для функциональных исследований трансмембранного потенциала и передачи биоэлектрических сигналов очень важно для лучшего понимания этой системы управления и ее роли в сложном морфогенезе.

Одним из таких объектов может выступать ранний эмбрион млекопитающих. Это уникальный объект: из одной тотипотентной недифференцированной клетки развивается взрослый организм, состоящий из более чем 200 различных типов специализированных клеточных линий. В процессе развития эмбрион проходит стадии одной, двух, четырех, восьми, шестнадцати, тридцати двух и шестидесяти четырех клеток, затем происходит компактизация и образуется морула. Далее формируется бластоциста – последняя стадия доимплантационного развития. На этой стадии происходит первичная клеточная дифференцировка, появляются две принципиально разные клеточные популяции – клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) и клетки трофэктодермы. Стоит отметить, что клетки ВКМ – первичные эмбриональные стволовые клетки, из которых можно получать клетки любого типа (нейрональные, мышечные, эпидермальные и др.).

Во время созревания яйцеклетки мыши и после ее оплодотворения происходят колебания мембранного потенциала, значения которого изменяются от +1,9 до -12,2 мВ [13]. Подобное явление может быть обусловлено изменением в работе высокопроводимого, вольт-зависимого 240 pS K^+ -канала [14], который напрямую связан с деятельностью клеточного цикла [15]. Кроме того, при работы Na^+/K^+ -АТРаза формируется потенциал клеточной мембраны эмбриона за счет токов ионов K^+ и Na^+ [16-18]. Создаваемая Na/K насосом гиперполяризация, ускоряет процесс формирования полости при развитии бластоцисты. Ионные токи, как показывают исследования, имеют огромное значение для деления и последующей дифференцировки клеток эмбрионов.

На основании этого можно предположить, что существует прямая связь между изменением трансмембранного потенциала и работой клеточного цикла эмбриона, а также что процессами доимплантационного развития эмбрионов млекопитающих можно управлять с помощью биоэлектрических сигналов. Изучение механизма влияния трансмембранного потенциала на дифференцировку клеток и его контроль возможно в будущем будет широко использоваться для стимулирования дифференцировки различных типов стволовых клеток в нужном направлении. На данном этапе работы целью было исследовать изменение трансмембранного потенциала на протяжении всего доимплантационного периода развития эмбрионов мыши в условиях *in vitro*.

Материалы и методы.

В работе использовали ооциты и доимплантационные эмбрионы на разных сроках развития (1-клеточный, 2-клеточный, 4-клеточный, 8-клеточный, морула, бластоциста), полученные от 7-8 недельных самок мышей линии BALB/c. Эмбрионы вымывали из яйцеводов и рогов матки, используя фосфатно-солевой буфер DPBS (Sigma). Затем их переносили в DPBS с 5 мг/мл проназы E (Serva) для удаления блестящей оболочки [19]. После чего, ооциты и эмбрионы отмывали от фермента с использованием культуральной среды M2.

Регистрацию мембранного потенциала проводили методом patch-clamp в конфигурации whole-cell на ооцитах и эмбрионах, идентифицированных визуально с использованием установки Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Использовали пипетки из боросиликатного стекла (WPI) с диаметром кончика порядка 1 мкм, с сопротивлением 5-7 МΩ (см. рис. 1).

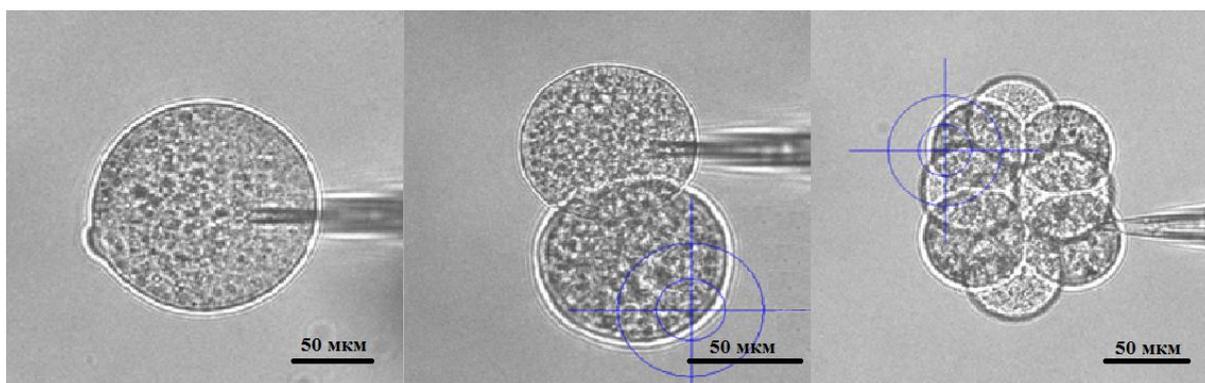


Рисунок 1 – Одно-клеточный, двух-клеточный и восьми-клеточный эмбрионы мыши с прикрепленным микроэлектродом для регистрации трансмембранного потенциала методом patch-clamp в конфигурации whole-cell

Для регистрации токов использовался усилитель Axopatch 200B (Molecular Devices), АЦП Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp10.2 (Molecular Devices). Изменения потенциала мембраны регистрировали в режиме нулевого тока (*zero current*) $I=0$. Данные электрофизиологии анализировались с помощью Clampfit 10.2. Для количественной обработки результатов использовали OriginPro.

Результаты и обсуждение.

Прикрепление микроэлектрода к эмбрионам наблюдали визуально для больших клеток (ооцит, стадия одной, двух, четырех, восьми клеток), либо по показаниям прибора в программе pClamp для мелких клеток (морула и бластоциста). Было установлено, что значение V_{mem} для всех бластомеров в пределах одного эмбриона (стадия 2-х, 4-х, 8-ми клеток, морула) достоверно не имеют различий, в связи с чем значения трансмембранного потенциала для каждого эмбриона регистрировали только на одном бластомере. На стадии бластоцисты регистрацию V_{mem} проводили только для клеток трофэктодермы. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Созревший ооцит имеет значение $V_{mem} = -13,2 \pm 1,54$ мВ. После оплодотворения, на стадии одной клетки (зиготы) происходит деполяризация мембранного потенциала ($-9,4 \pm 1,07$ мВ, $p \leq 0,05$ по отношению к ооциту). Увеличение потенциала на 2-3 мВ, скорей всего обусловлено активацией внутриклеточных процессов при подготовке эмбриона к первому делению-дроблению. В работу включается собственный геном эмбриона, все белки начинают синтезироваться на собственных мощностях (рибосомах), и параллельно идет увеличение митохондриального потенциала.

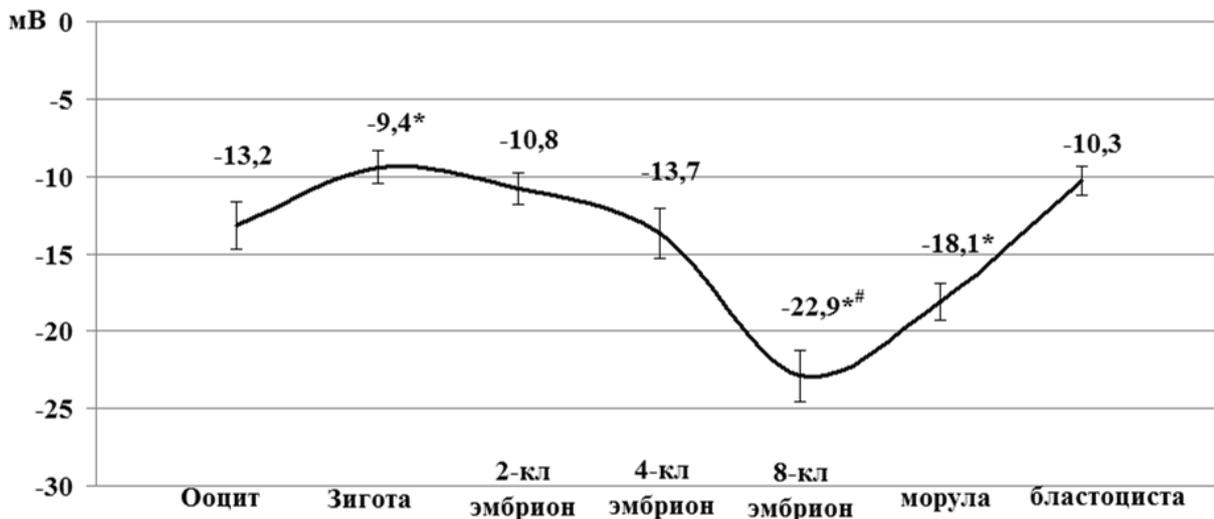


Рисунок 2 – Изменение мембранного потенциала во время развития доимплантационных эмбрионов мыши; * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,1$

При дроблении число клеток эмбриона увеличивается, а его общий объем остается примерно равным объему зиготы. Во время дробления объем цитоплазмы остается примерно постоянным, а число ядер, их общий объем и в особенности площадь поверхности увеличиваются. В результате первого деления дробления формируется двухклеточный эмбрион. Значение V_{mem} составляет $-10,8 \pm 1,03$ мВ. Статистически значимых различий между трансмембранным потенциалом зиготы и 2-клеточным эмбрионом не выявлено. При следующем делении дробления формируется 4-клеточный эмбрион с $V_{mem} = -13,7 \pm 1,61$ мВ. Полученное значение сопоставимо с данными, полученными на стадии ооцита, т.е. следующие деления-дробления после 2-клеточной стадии не приводят к дальнейшей деполяризации, как изначально предполагалось (в связи с уменьшением цитоплазматического объема бластомеров), а наоборот, эмбрион гиперполяризуется. При переходе от 4-клеточной к 8-клеточной стадии поверхность бластомеров становится более гладкой, а форма более округлой, так как в результате изменения взаимной адгезивности клеток они укладываются более компактно, формируются плотные контакты. При этом, значение V_{mem} было минимальным, и составило $-22,9 \pm 1,63$ мВ ($p \leq 0,1$ по отношению к ооциту, $p \leq 0,05$ по отношению к зиготе, 2-х, 4-х, 8-ми клеточным эмбрионам). На стадии 16 клеток визуально границу между клетками обнаружить не удастся, формируется морула. Ее наружные клетки уплощаются и становятся эпителиальными. Это явление называют компактизацией и оно является первым внешним признаком дифференцировки эмбрионов млекопитающих. Значения V_{mem} для морулы составило $-18,1 \pm 1,17$ мВ ($p \leq 0,05$ по отношению к другим стадиям). Таким образом, первичная дифференцировка клеток в эмбрионе сопровождается деполяризацией мембранного потенциала, и продолжается вплоть до формирования бластоцисты – конечной стадии доимплантационного развития. На стадии бластоцисты, внешние клетки трофобласта имеют значение трансмембранного потенциала на уровне $10,3 \pm 0,5$ мВ.

Таким образом, оплодотворение и переход к многоклеточности с элементами первичной дифференцировки сопровождается деполяризацией клеточной мембраны доимплантационного эмбриона мыши, что позволяет говорить о прямой связи V_{mem} с процессом развития и специализации клеток в течение раннего эмбриогенеза.

Список литературы / References:

1. Hille B. *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer, Sunderland, Mass, USA, 2001.
2. Pandiella A., Magni M., Lovisolo D., Meldolesi J. The effects of epidermal growth factor on membrane potential. Rapid hyperpolarization followed by persistent fluctuations. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, no. 22, pp. 12914-12921.
3. Lang F., Friedrich F., Kahn E. Bradykinin-induced oscillations of cell membrane potential in cells expressing the Ha-ras oncogene. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266, no. 8, pp. 4938-4942.
4. Nonomura S., Fujiwara-Tsukamoto Y., Kajihara T., Fujiyama F., Isomura Y. Continuous membrane potential fluctuations in motor cortex and striatum neurons during voluntary forelimb movements and pauses. *Neurosci Res.*, 2017, vol. 120, pp. 53-59.
5. Bogdanov K.Y., Maltsev V.A., Vinogradova T.M., Lyashkov A.E., Spurgeon H.A., Stern M.D., Lakatta E.G. Membrane potential fluctuations resulting from submembrane Ca²⁺ releases in rabbit sinoatrial nodal cells impart an exponential phase to the late diastolic depolarization that controls their chronotropic state. *Circ Res.*, 2006, vol. 27, no. 99 (9), pp. 979-87.
6. Emery B.R., Miller R.L., Carrell D.T. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage. *BMC Developmental Biology*, 2012, pp. 20011-14.
7. DeCoursey T.E., Chandy K.G., Gupta S., Cahalan M.D. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature*, 184, vol. 307, no. 5950, pp. 465-468.
8. Chiu S.Y., Wilson G.F. The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in Wallerian degeneration of explant rabbit sciatic nerves. *Journal of Physiology*, 1989, vol. 408, pp. 199-222.
9. Amigorena S., Choquet D., Teillaud J.L., Korn H., Fridman W.H. Ion channel blockers inhibit B cell activation at a precise stage of the G1 phase of the cell cycle. Possible involvement of K⁺ channels. *Journal of Immunology*, 1990, vol. 144, no. 6, pp. 2038-2045.
10. Wang E., Yin Y., Zhao M., Forrester J.V., McCaig C.D. Physiological electric fields control the G1/S phase cell cycle checkpoint to inhibit endothelial cell proliferation. *The FASEB Journal*, 2003, vol. 17, no. 3, pp. 458-460.
11. Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D.L. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 2008, vol. 3, no. 11, Article ID e3737.
12. Atkinson D.L., Stevenson T.J., Park E.J., Riedy M.D., Milash B., Odelberg S.J. Cellular electroporation induces dedifferentiation in intact newt limbs. *Developmental Biology*, 2006, vol. 299, no. 1, pp. 257-271.
13. Cross M.H., Cross P.C., Brinster R.L. Changes in membrane potential during mouse egg development. *Dev Biol.*, 1973, vol. 33, no. 2, pp. 412-6.
14. Dumoulin J.C., Evers J.L., Michiels A.H., Pieters M.H., Bras M., Land J.A., Geraedts J.P. Modulation of embryonic Na(+)-K(+)-ATPase activity and mouse preimplantation development in vitro in media containing high concentrations of potassium. *Mol Reprod Dev.*, 1993, vol. 36, no. 3, pp. 320-7.
15. Goldstein B.N., Aksirov A.M., Zakrjevskaya D.T. A new kinetic model for biochemical oscillation^ graph-theoretical analysis. *Biophysical chemistry*, 2009, vol. 145, pp. 111-115.
16. Sawczuk A., Powers R.K., Binder M.D. Contribution of outward currents to spike-frequency adaptation in hypoglossal motoneurons of the rat. *J Neurophysiol*, 1997, vol. 78, no. 5, pp. 2246-53.
17. Betts D.H., MacPhee D.J., Kidder G.M., Watson A.J. Ouabain sensitivity and expression of Na/K-ATPase alpha and beta-subunit isoform genes during bovine early development. *Mol Reprod Dev.*, 1997, vol. 46, no. 2, pp. 114-26.
18. Sutton-McDowall M.L., Wu L.L., Purdey M., Abell A.D., Goldys E.M., MacMillan K.L., Thompson J.G., Robker R.L. Nonesterified Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Cattle Cumulus Oocyte Complexes Alters Cell Metabolism and Developmental Competence. *Biol Reprod.*, 2016, vol. 94, no. 1, pp. 23.
19. Ritchie, W.A., Taylor, J.E., Gardner, J.O. [et al.] Live lambs born from zona-pellucida deduced embryos. *Cloning Stem Cells*, 2005, vol. 7, pp. 178-182.