

## ДИНАМИКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭМБРИОНОВ МЫШИ, НАХОДЯЩИХСЯ В СОСТОЯНИИ «ДВУХКЛЕТОЧНОГО БЛОКА IN VITRO»

© Н. А. Боголюбова, И. О. Боголюбова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: [ibogol@yahoo.com](mailto:ibogol@yahoo.com)

С помощью комплексного подхода, сочетающего методы прижизненного исследования, традиционную электронную микроскопию и иммуноцитохимические методы, изучены структурная организация и жизнеспособность двухклеточных зародышей мышей линии BALB/c после остановки дробления в условиях *in vitro* («двухклеточный блок *in vitro*»). Прослежена динамика изменения структурной организации и жизнеспособности блокированных зародышей в течение 2 сут от момента остановки дробления. Показано, что уже перед остановкой дробления у зародышей возникают изменения во внутриклеточном распределении митохондрий, однако других нарушений организации выявлено не было. В течение 1-х сут от момента остановки развития зародыши не только остаются жизнеспособными, но и демонстрируют некоторые изменения, сходные с теми, что можно видеть у нормально дробящихся зародышей того же возраста. К концу 2-х сут часть зародышей гибнет, остальные не имеют видимых морфологических дефектов и остаются метаболически активными. В то же время в ядрах таких эмбрионов часто наблюдали конденсацию хроматина около ядерной мембраны, аналогичную той, что характерна для ядер клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза. Полученные результаты подтверждают данные о специфичности функционального статуса блокированных зародышей и о способности блокированных зародышей к частичной реализации программы раннего эмбрионального развития.

Ключевые слова: зародыши мыши, доимплантационный период развития, «двухклеточный блок *in vitro*», жизнеспособность, ультраструктурная организация.

Принятые сокращения: DAPI — 4-6 diamidino-2-phenylindole, MTT — 3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, ХГ — хорионический гонадотропин.

Способность доимплантационных эмбрионов млекопитающих развиваться *in vitro* зависит от их генотипа, состава культуральной среды и условий культивирования. У лабораторных грызунов эмбрионы гибридных генотипов могут проходить полное доимплантационное развитие *in vitro*. В то же время зародыши большинства линий при их культивировании с одноклеточной стадии в классических эмбриональных средах прекращают развитие на одной из начальных стадий дробления (Telford et al., 1990). В настоящее время подобную остановку развития связывают с неправильной или несвоевременной активацией эмбрионального генома у развивающихся в синтетических средах зародышей (Latham, 1999).

Дробление линейных зародышей мыши останавливается в конце двухклеточной стадии, и такое нарушение развития получило название «двухклеточный блок *in vitro*» (Whittingham, 1974). Наблюдение за блокированными зародышами при их длительном культивировании показало, что в течение 2 сут после остановки деления они сохраняют свою морфологическую целостность (Goddart, Pratt, 1983). Блокирование развития происходит на границе стадий G<sub>2</sub> и М второго клеточного цикла, в ядрах эмбрионов проходит один раунд репликации ДНК с последующим ингибированием синтеза ДНК и кариики-

неза (Goddart, Pratt, 1983). Осуществлению митоза препятствует также и то, что белок p34cdc2 хотя и содержится в клетках в достаточном для индукции митоза количестве, находится в фосфорилированной форме и по неизвестной причине не активируется (Aoki et al., 1992). Вместе с тем блокированные зародыши в той же степени, что и нормально дробящиеся, способны синтезировать мРНК и осуществлять их трансляцию (Robl et al., 1988). В блокированных зародышах происходит частичная реализация программы индивидуального развития, что выражается в принципиальном изменении качественного состава синтезируемых белков (Suzuki et al., 1998) и некоторых изменениях морфологии эмбрионов (Goddart, Pratt, 1983). По совокупности данных принято считать, что блок не тождествен гибели зародышей, а скорее является приостановкой развития (Biggers, 1998).

Так как двухклеточный блок серьезно мешал развитию *in vitro* технологий, были проведены многочисленные исследования с целью предотвратить возникновение данного нарушения развития. В процессе работы в качестве «побочного продукта» были получены обширные и важные сведения о механизмах цитоплазматического контроля событий раннего эмбриогенеза (Muggleton-Harris et al., 1982; Nakamura, Tsunoda, 1987), метаболиз-

ме зародышей начальных стадий развития (Brown, Whittingham, 1992; Gardner, Lane, 1993), регуляции клеточного цикла (Aoki et al., 1992; Naraguchi et al., 1999), механизмах и последствиях действия окислительного стресса (Nasr-Esfahani et al., 1990; Noda et al., 1991) и др. Были разработаны новые среды для культивирования зародышей (Chatot et al., 1989; Lawitts, Biggers, 1991; Gardner, Lane, 1996), которые позволили получить полное доимплантационное развитие зародышей нескольких линий мышей.

Вместе с тем механизм возникновения «двухклеточного блока *in vitro*» остается до сих пор неизвестным, и изучение этого феномена продолжается (Qui et al., 2003). В частности, требуется восполнить недостаток сведений о структурных изменениях в зародыше, сопутствующих его блокированному состоянию. В настоящее время такие сведения немногочисленны (Goddart, Pratt, 1983; Pratt, Muggleton-Harris, 1988; Секирина, Неганова, 1996), и даже остается до конца неизвестным, в какой степени сохраняют жизнеспособность зародыши, находящиеся в состоянии глубокого блока.

Целью настоящей работы являлось изучение структурной организации зародышей мышей BALB/c после остановки их дробления на двухклеточной стадии («двухклеточный блок *in vitro*») и оценка жизнеспособности таких эмбрионов. Работа была выполнена с использованием прижизненных методов исследования, традиционной электронной микроскопии и иммуноцитохимических методов.

## Материал и методика

В работе использовали эмбрионы, полученные от мышей линии BALB/c и гибридов F<sub>1</sub> (CBA/C57B1) (Питомник РАМН «Рапполово»). Для синхронизации развития зародышей и увеличения их количества была использована гормональная стимуляция самок. С этой целью им вводили 5—10 МЕ сывороточного гонадотропина, а затем хорионического гонадотропина (ХГ) с интервалом 44—48 ч (Дыбан, 1974). Успешное покрытие определяли по наличию вагинальной пробки после подсадки самок к самцам. Возраст зародышей отсчитывали от времени введения.

Эмбрионы извлекали из яйцеводов на необходимой стадии развития под контролем стереомикроскопа МБС 9, используя для манипуляций среду F10 с буферным раствором HEPES (Sigma, США). Культивировали зародыши в четырехлуночных планшетах (Nunc) в среде M16 (Пратт, 1990) без HEPES, содержащей бычий сывороточный альбумин (5 мг/мл) и ЭДТА (10.8 мкмоль/мл) (Abramczuk et al., 1977). Развитие зародышей проходило в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Flow, США) при 37 °C и 5%-ном содержании CO<sub>2</sub>.

Для прижизненного распознавания живых и погибших эмбрионов в группе культивируемых зародышей, не имеющих видимых морфологических дефектов, использовали тест «живое и мертвое» (life and dead assay) (Liu et al., 2000). Двойное прижизненное окрашивание зародышей ядерными красителями Хёхстом 33258 (Sigma, США; раствор в концентрации 20 мкг/мл на среде M3 в течение 15 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе) и иодистым пропиленом (Sigma, США; раствор в концентрации 20 мкг/мл на среде M3 в течение 25 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе) позволяет разделить эмбрионы на группы, основываясь на таких

критериях, как состояние плазматической мембраны и ядра. Эмбрионы, у которых ядра бластомеров окрашены только Хёхстом 33258, считают жизнеспособными, если их ядра не фрагментированы и содержат проядрышки и диспергированный хроматин, или апоптозными, если хроматин конденсирован и(или) ядра фрагментированы. В том случае, если ядра окрашены обоими красителями, зародыши мертвы.

Для обнаружения функционально активных митохондрий в цитоплазме эмбрионов использовали прижизненный митохондриальный краситель родамин 123 (Sigma, США) (Johnson et al., 1980). Зародышей инкубировали в среде M16, содержащей 25 мкг/мл родамина 123, в течение 30 мин. На это время их помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37 °C. Предварительно у эмбрионов была удалена блестящая оболочка. Ее разрушали, помещая эмбрионы на 30—60 с в каплю среды F10 с pH 2.5 (данное значение pH получали, титруя среду 1 М раствором HCl). После этого зародышей промывали, последовательно перенося в несколько капель среды NT6 (pH 7.4).

Для выявления функциональной активности оксидоредуктаз эмбриона использовали реакцию восстановления данными ферментами малоокрашенной соли тетразолия МТТ (Sigma, США) до интенсивно окрашенного формазана. Зародышей инкубировали 60 мин в среде M16, содержащей 10 мкг/мл МТТ, при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. В результате реакции в цитоплазме образовывались интенсивно окрашенные кристаллы формазана, легко выявляемые при микроскопировании в проходящем свете без использования фазово-контрастной оптики. В настоящей работе методика была адаптирована для эмбрионального материала и способность зародышей к восстановлению МТТ использовали для качественной оценки их состояния, в связи с чем не проводили количественной колориметрической оценки, как это предусмотрено стандартной процедурой (Hussain et al., 1993).

Морфологию ядер на светооптическом уровне изучали на тотальных фиксированных препаратах зародышей, окрашенных DAPI. Для этого эмбрионы фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 40 мин при комнатной температуре и после отмывки в фосфатном буферном растворе (PBS) заключали в 50%-ный глицерин, содержащий 1 мг/мл фенилендиамина и 0.5 мкг/мл DAPI (Sigma, США).

Для электронно-микроскопического исследования эмбрионы фиксировали 1%-ным раствором глутаральдегида на 0.05 М какодилатном буферном растворе не менее 12 ч при 4 °C с последующей фиксацией 1%-ным OsO<sub>4</sub> на том же буферном растворе в течение 1 ч при комнатной температуре. После дегидратации в серии спиртов возрастающей концентрации материал заключали в спирторастворимую среду Spurr (Serva, США). Ультратонкие срезы, полученные с помощью ультратома Reichert, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца.

Для иммуноэлектронного цитохимического исследования распределения ДНК материал фиксировали в смеси 4%-ного параформальдегида и 0.5%-ного глутаральдегида на PBS в течение 1.5 ч с последующей фиксацией 2%-ным раствором параформальдегида на PBS не менее 12 ч. После обезвоживания в спиртах материал заключали в среду LR White (Polysciences, Warrington, США), время полимеризации не менее 12 ч при 57 °C. В работе были использованы моноклональные антитела  $\alpha$ -ДНК — к двухцепочечной ДНК (Chemical International, США). В качестве вторых антител использовали козьи антитела

против мышинных иммуноглобулинов, конъюгированные с коллоидным золотом (диаметр гранул 10 нм) (BBI International, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител сетки с ультратонкими срезами инкубировали в PBS, содержащем 0.5 % желатина (Sigma, США) и 0.05 % Tween 20 (pH 7.4), в течение 10 мин при комнатной температуре. После обработки антителами ультратонкие срезы контрастировали насыщенным раствором уранилацетата в 70%-ном этаноле.

Ультратонкие срезы анализировали в микроскопе JEM-7A при 80 кВ.

## Результаты

Контрольные зародыши F<sub>1</sub> (СВА/С57В1) на поздней двухклеточной стадии развития. 1. *Развитие зародышей in vitro*. С середины одноклеточной стадии (18 ч после введения ХГ) в культуральную среду были помещены зиготы, а также неоплодотворенные ооциты, которые использовали для сравнительных наблюдений как клетки, не способные развиваться *in vitro*.

Первое деление зиготы проходит через 33—34 ч после введения ХГ, осуществить его оказались неспособными лишь единичные зародыши. К концу двухклеточной стадии (48 ч от введения ХГ) зародыши имели бластомеры равного размера, округлой или овальной формы, со светлой цитоплазмой и центральным положением ядер (рис. 1, а). Фрагментации цитоплазмы не наблюдали. Второе полярное тельце присутствует под блестящей оболочкой и связано с одним из бластомеров.

В дальнейшем зародыши проходят второе деление на сроке 48—50 ч после введения ХГ, третье — на сроке 59—61 ч, а к сроку 96 ч формируется бластоциста, которая выселяется из блестящей оболочки на сроке 125—130 ч после введения ХГ.

Неоплодотворенные ооциты к сроку 48 ч от введения ХГ демонстрируют заметное уменьшение объема цитоплазмы (сжатие бластомеров), потемнение и расслоение цитоплазмы. Фрагментации цитоплазмы отмечено не было. Однако единичные ооциты сохраняют ту морфологию, что была у них в начале наблюдения на момент эксплантации *in vitro*.

2. *Анализ жизнеспособности зародышей*. 2.1. Тест «живое и мертвое». Анализ контрольных зародышей после их прижизненного окрашивания ядерными красителями Хёхстом 33258 и иодистым пропидием позволил разделить эмбрионы на две группы.

Ядра зародышей первой группы, куда входит большинство эмбрионов, не окрашены иодистым пропидием, что свидетельствует о сохранении целостности плазматических мембран бластомеров. Свечение ядер, обусловленное связыванием хроматина с красителем Хёхстом 33258, интенсивно. Окрашенные ядра содержат большое количество проядрышек, диспергированный хроматин, имеют близкую к округлой форму и не фрагментированы (рис. 1, в). По совокупности данных признаков зародыши могут быть отнесены к жизнеспособным.

Ко второй группе зародышей были отнесены те, ядра которых окрашены как иодистым пропидием, так и Хёхстом 33258, что свидетельствует о гибели клеток.

2.2. Способность эмбрионов к восстановлению МТТ. Оксидоредуктазы жизнеспособных эмбрионов активно восстанавливают МТТ, в результате чего инкубация зародышей в среде, содержащей МТТ, приводит к появ-

лению и накоплению в цитоплазме сине-фиолетовых кристаллов формазана. Микроскопическое наблюдение зародышей по окончании времени инкубации с МТТ показывает, что кристаллы формазана равномерно распределены по всему объему цитоплазмы бластомеров (рис. 1, з). Цитоплазма погибших клеток остается неокрашенной.

2.3. Внутриклеточное распределение функционально активных митохондрий. Митохондрии жизнеспособных зародышей аккумулируют родамин 123, что вызывает яркое свечение этих органелл. Весь объем цитоплазмы обильно насыщен диффузно распределенными в ней митохондриями, но в околоядерной зоне и зоне соприкосновения сестринских бластомеров концентрация митохондрий выше. В том случае, если один или оба бластомера еще не начали второе деление дробления, вокруг их ядер видно скопление митохондрий, которое в двухмерной проекции выглядит как тонкое кольцо (рис. 1, л). Во время метафазы митоза видна концентрация митохондрий вокруг метафазной пластинки, а на более поздних стадиях — вокруг групп дочерних хромосом.

2.4. Морфология ядер, наблюдаемая на светооптическом уровне. Анализ ядер, проведенный на окрашенных DAPI фиксированных тотальных препаратах, показал, что для ядер жизнеспособных зародышей поздней двухклеточной стадии развития характерны округлая или овальная форма, наличие 6—12 проядрышек на ядро, диспергированный по всему объему кариоплазмы хроматин и на его фоне — более плотные агрегаты хроматина, равномерно распределенные в ядре (рис. 2, а).

3. *Ультраструктурная организация зародышей*. Плазматическая мембрана бластомеров покрыта редкими микроворсинками, расположенными равномерно. Мембраны сестринских бластомеров в зоне прилегания на некоторых участках неплотно прилегают друг к другу, и между ними образуется узкое пространство, в просвете которого можно видеть отдельные микроворсинки (рис. 4, а). Никаких специализированных клеточных контактов между бластомерами на этой стадии не наблюдается. Цитоплазма средней электронной плотности содержит большое количество митохондрий и расположенные небольшими группами липидные включения. По всему объему бластомеров равномерно распределены пучки промежуточных филаментов (рис. 3, а).

Митохондрии имеют вытянутую форму, поэтому на срезах они представлены как округлыми (диаметр около 380 нм), так и овальными (длиной около 570—610 нм) структурами, полностью или частично заполненными электронно-плотным матриксом (рис. 3, а). На этой стадии развития митохондрии представлены морфологически незрелыми формами с невыраженными кристами или с концентрическими и аркообразными кристами (последние две разновидности встречаются относительно редко). В околоядерной зоне отмечается повышенное содержание митохондрий по сравнению с периферической цитоплазмой. Независимо от места локализации митохондрии часто ассоциированы с липидными включениями.

В ядрах двухклеточных зародышей мышей наиболее заметными структурами являются проядрышки (в англоязычной литературе — nucleolus precursor bodies) — электронно-плотные тела диаметром 2—3 мкм, состоящие из тонкофибриллярного материала (толщина фибрилл около 5 нм) (рис. 3, а). Число проядрышек может колебаться от 3 до 11 на ядро. К концу двухклеточ-



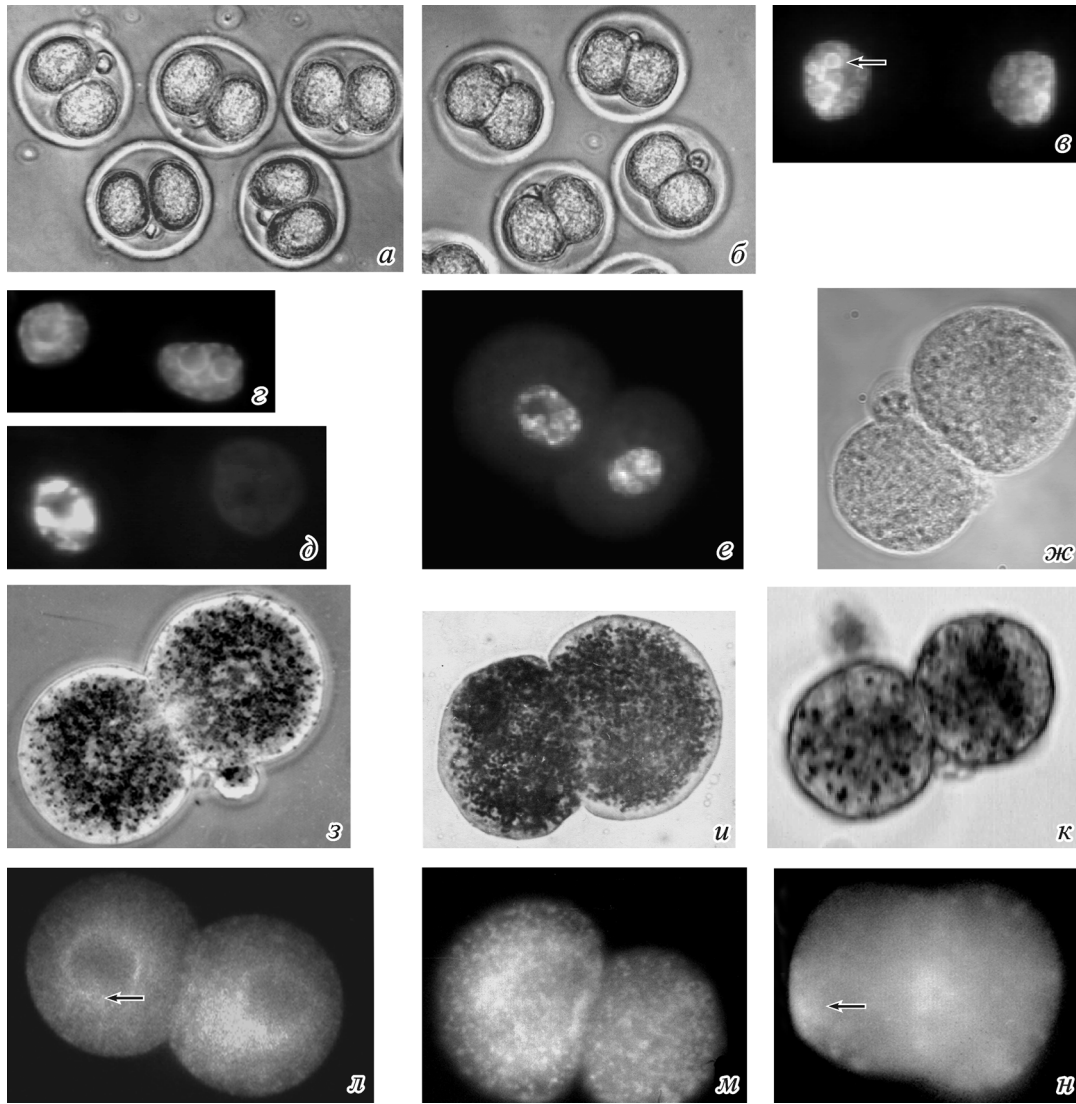


Рис. 1. Прижизненное наблюдение нормально развивающихся зародышей F<sub>1</sub> (CBA/C57B1) и находящихся в состоянии «двухклеточного блока in vitro» зародышей BALB/c.

*a, б* — изменение формы бластомеров: *a* — зародыши F<sub>1</sub> на поздней двухклеточной стадии развития; *б* — зародыши BALB/c, находившиеся 24 ч в блокированном состоянии: площадь соприкосновения бластомеров увеличивается, они приобретают приплюснутую форму. *в–г* — морфология ядер эмбрионов. *в* — многочисленные мелкие проядрышки (стрелка) в ядрах эмбриона F<sub>1</sub> поздней двухклеточной стадии; *г–е* — ядра эмбрионов BALB/c, находившихся 48 ч в блокированном состоянии: *г* — проядрышки и диспергированный хроматин в ядрах эмбриона с интактной плазматической мембраной (количество проядрышек уменьшается, а их размер увеличивается); *д* — конденсированный около ядерной мембраны хроматин в одном из ядер погибшего зародыша, *е* — конденсированный около ядерной мембраны хроматин в ядре зародыша с интактной плазматической мембраной. *ж–к* — восстановление эмбрионами МТТ до формазана: *ж* — зародыш перед инкубацией в среде, содержащей МТТ, *з* — эмбрион F<sub>1</sub> на поздней двухклеточной стадии, *и* — зародыш, находившийся 24 ч в блокированном состоянии, *к* — зародыш, находившийся 48 ч в блокированном состоянии. *л–н* — изменение внутриклеточной локализации митохондрий у блокированных зародышей: *л* — диффузное распределение митохондрий в периферической цитоплазме и их околоядерная концентрация (стрелка) у успешно развивающегося контрольного эмбриона F<sub>1</sub>, *м* — отсутствие околоядерной концентрации и многочисленные кластеры митохондрий у блокирующегося зародыша BALB/c в конце двухклеточной стадии (предблок), *н* — крупные митохондриальные кластеры (стрелка) в цитоплазме эмбриона, находившегося 48 ч в блокированном состоянии. *a, б* — фазовый контраст, об. 6.3×, ок. 9×; *в, г, е* — окрашивание Хёхстом 33258, об. 40×, ок. 8×; *д* — окрашивание иодидом пропидия, об. 40×, ок. 8×; *з–к* — окрашивание МТТ, об. 40×, 8×; *л–н* — окрашивание родамином 123, об. 40×, ок. 8×.

Fig. 1. Vital observation of normally cleaving F<sub>1</sub> (CBA/C57B1) embryos and blocked BALB/c embryos.

*a, б* — blastomere shape changing: *a* — a F<sub>1</sub> embryo at late 2-cell stage; *б* — a BALB/c embryo after a 24 h block, increase in interblastomere contact surface resulting in blastomere flattening; *в, г* — morphology of embryo nuclei; *в* — numerous small pronucleoli (arrow) in the nuclei of a late 2-cell F<sub>1</sub> embryo; *г–е* — nuclei of BALB/c embryos after a 48 h block: *г* — pronucleoli and dispersed chromatin in the nuclei of an embryo with intact plasma membrane; note that the number of pronucleoli decreases as their sizes increase; *д* — condensed chromatin near the nuclear membrane in a dead embryo; *е* — chromatin condensation near the nuclear membrane in an embryo with intact plasma membrane. *ж–к* — MTT bioreduction to formazan by embryos: *ж* — an embryo before staining (incubation in MTT-containing medium); *з* — a stained embryo at late 2-cell stage; *и* — a stained embryo after a 24 h block; *к* — a stained embryo after a 48 h block; *л–н* — changes in mitochondrial localization in the embryo cytoplasm: *л* — diffuse distribution of mitochondria on the peripheral cytoplasm, and perinuclear concentration of mitochondria (arrow) in the center of blastomeres of the control successfully developing F<sub>1</sub> embryo; *м* — absence of perinuclear concentration of mitochondria and numerous mitochondrial clusters in the cytoplasm of a BALB/c embryo at late 2-cell stage (preblock); *н* — large mitochondrial clusters (arrow) in the cytoplasm of a BALB/c embryo after a 48 h block. *a, б* — phase contrast, ob. 6.3×, oc. 9×; *в, г, е* — Hoechst 33258 staining, ob. 40×, oc. 8×; *д* — Propidium iodide staining, ob. 40×, oc. 8×; *з–к* — MTT staining, ob. 40×, oc. 8×; *л–н* — Rhodamine 123 staining, ob. 40×, oc. 8×.



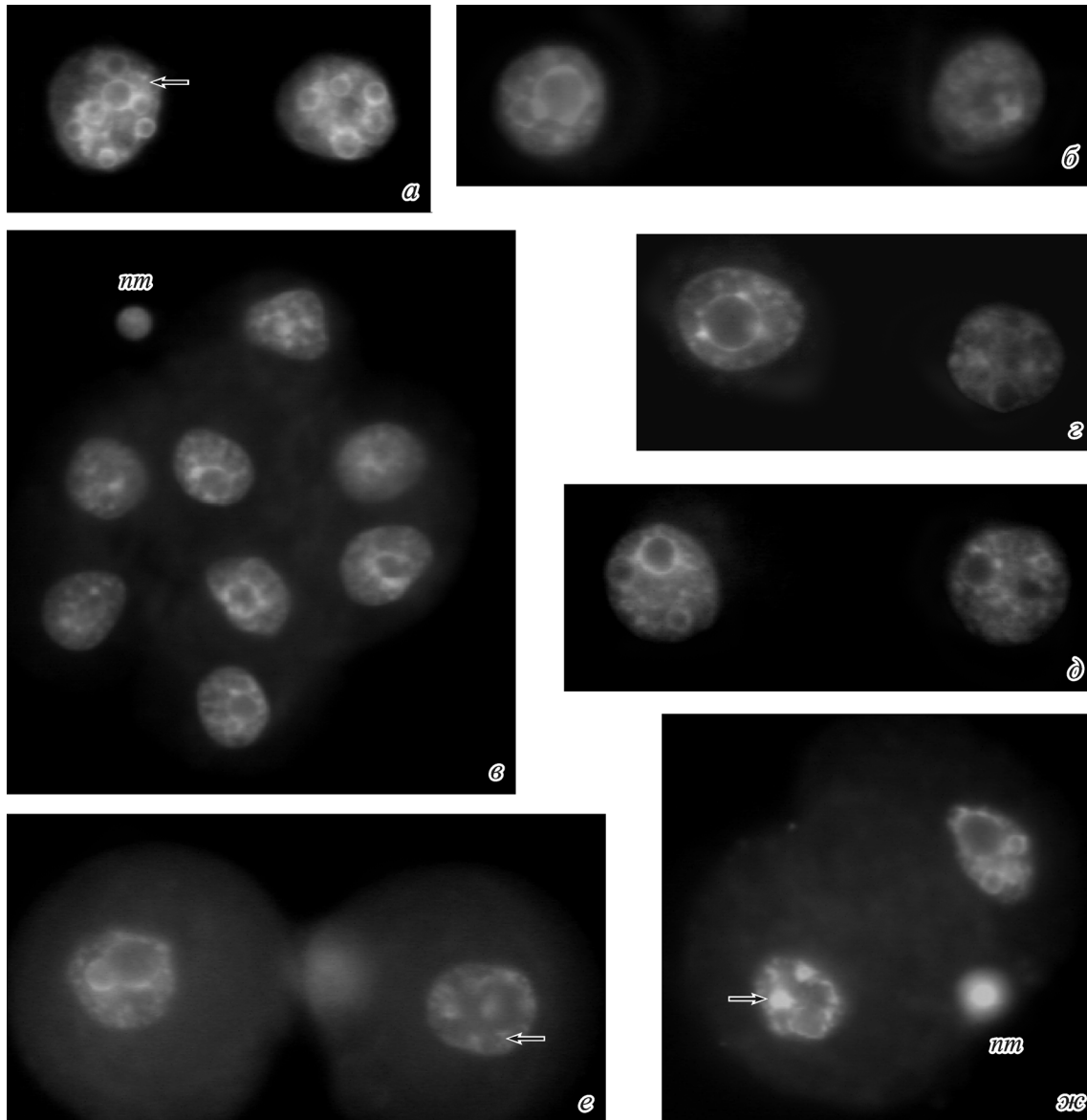


Рис. 2. Организация ядер зародышей BALB/c в состоянии «двухклеточного блока *in vitro*» и успешно развивающихся эмбрионов F<sub>1</sub> (CBA/C57B1).

*a* — контрольный зародыш F<sub>1</sub> на поздней двухклеточной стадии: в ядре видны многочисленные мелкие проядрышки (*стрелка*) и диспергированный хроматин; *б, в* — зародыши BALB/c, находившиеся 1 сут в состоянии блока: в ядрах видны 1 крупное проядрышко и 1—2 меньшего размера; *в* — зародыш CBA/C57B1 (F<sub>2</sub>) на восьмиклеточной стадии развития: в ядрах находятся 1 ядрышко и диспергированный хроматин; *д—ж* — ядра зародышей BALB/c, находившихся в блокированном состоянии 2 сут: *д* — ядра сохранили структурную целостность, а их организация аналогична наблюдаемой через 1 сут после остановки развития; *е, ж* — конденсация хроматина у ядерной мембраны (*стрелки*). *nm* — полярное тельце. Фиксированные тотальные препараты, окрашенные DAPI. Об. 40×, 8×.

Fig. 2. Nuclear structure in BALB/c embryos in the state of «2-cell block *in vitro*» and in F<sub>1</sub> (CBA/C57B1) embryos at normal development.

*a* — nuclei of a late 2-cell F<sub>1</sub> embryo with numerous small pronucleoli (*arrow*) and dispersed chromatin; *б, в* — one large and 1—2 smaller pronucleoli in the nuclei of BALB/c embryos after a 24 h block; *в* — one large nucleolus and dispersed chromatin in nuclei of a F<sub>1</sub> embryo at 8-cell stage of cleavage; *д—ж* — nuclei of BALB/c embryos after a 48 h block: *д* — nuclei with preserved structural integrity morphologically similar to that of the nuclei of embryos after a 24 h block; *е, ж* — condensed chromatin near the nuclear membrane (*arrows*). DAPI stained fixed preparations, ob. 40×, oc. 8×.

ной стадии (46 ч после инъекции ХГ) на периферии некоторых проядрышек иногда отмечаются участки меньшей (по сравнению с телом проядрышка) электронной плотности, представляющие собой места формирования фибриллярных центров будущего ядрышка.

По данным иммуноцитохимического исследования, хроматин распределен равномерно по всему объему ядра (рис. 5, *a*). Повышенное содержание зерен золота отме-

чается над материалом, ассоциированным с периферией проядрышек. Таким образом, данные о распределении ДНК, полученные на ультраструктурном уровне, подтверждают результаты светооптических наблюдений.

Зародыши подверженной блоку линии BALB/c в конце двухклеточной стадии развития (46—48 ч от введения ХГ, так называемый предблок). 1. Развитие зародышей *in vitro*. Эм-

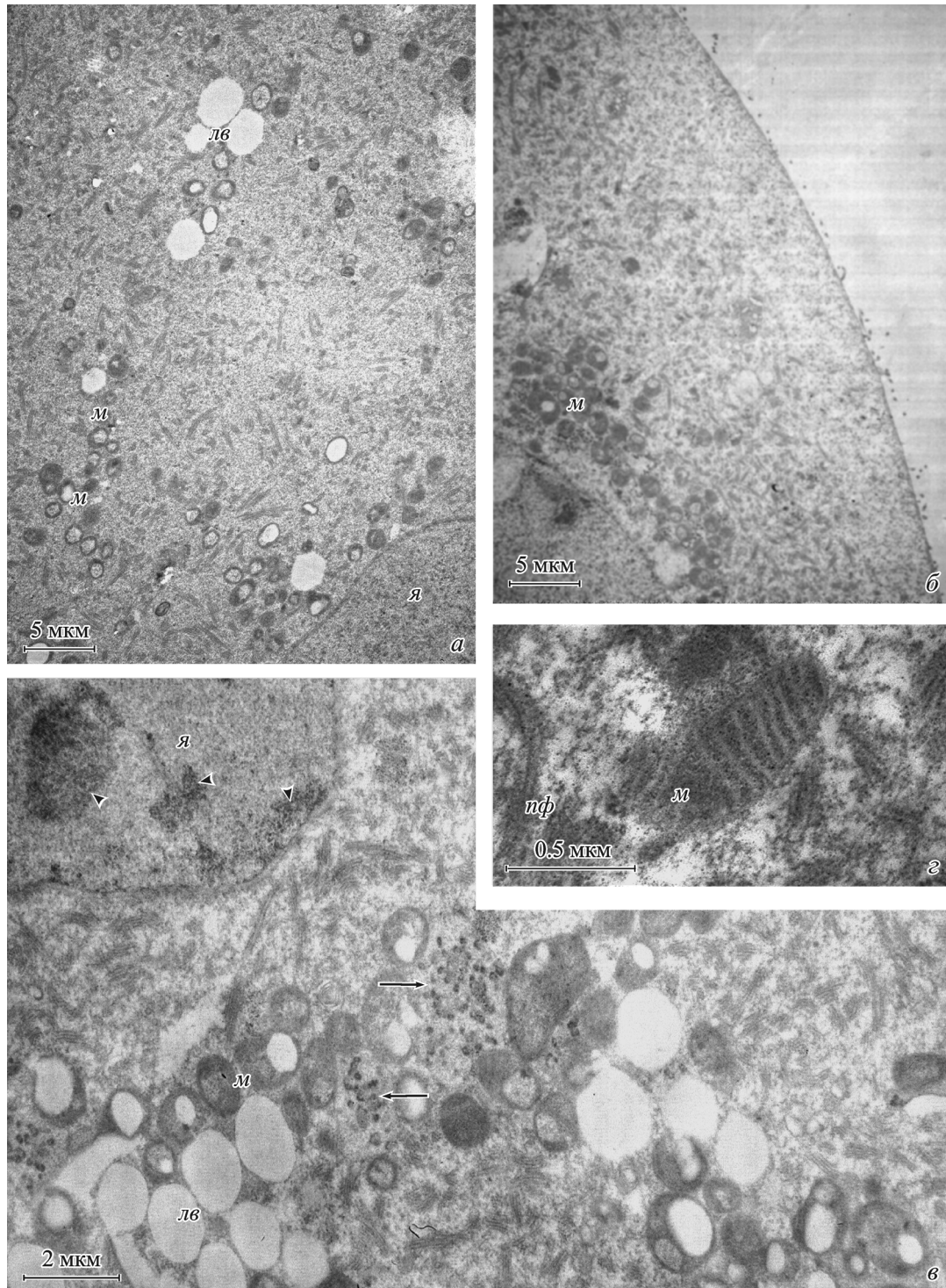


Рис. 3. Ультраструктурная организация контрольных и блокированных эмбрионов мыши.

*а* — фрагмент цитоплазмы эмбриона BALB/c на поздней двухклеточной стадии при развитии *in vivo*; *б* — фрагмент цитоплазмы двухклеточного эмбриона BALB/c, находящегося в состоянии блока в течение 2 сут; *в* — митохондрии с выраженными кристами в цитоплазме блокированного эмбриона BALB/c (48 ч в состоянии блока); *г* — фрагмент околоядерной цитоплазмы блокированного эмбриона BALB/c (1 сут в блоке). Обращают на себя внимание скопления митохондрий с незрелыми кристами и гранулярный материал между ними (указан *стрелками*). В ядре можно видеть кластеры интерхроматиновых гранул (указаны *головками стрелок*). *лв* — липидные включения, *м* — митохондрии, *пф* — промежуточные филаменты, *я* — ядро.

Fig. 3. Ultrastructure of control and blocked mouse embryos.

*a* — fragment of cytoplasm of developing *in vivo* BALB/c embryo at late 2-cell stage; *б* — fragment of cytoplasm of a BALB/c embryo after a 48 h block; *в* — mitochondria with well developed cristae in the cytoplasm of an embryo after a 48 h block; *г* — fragment of perinuclear cytoplasm of a BALB/c embryo after a 24 h block. Notice groups of mitochondria with immature cristae, and granules between mitochondria (*arrows*). Clusters of interchromatin granules in the nucleus (*arrowheads*).



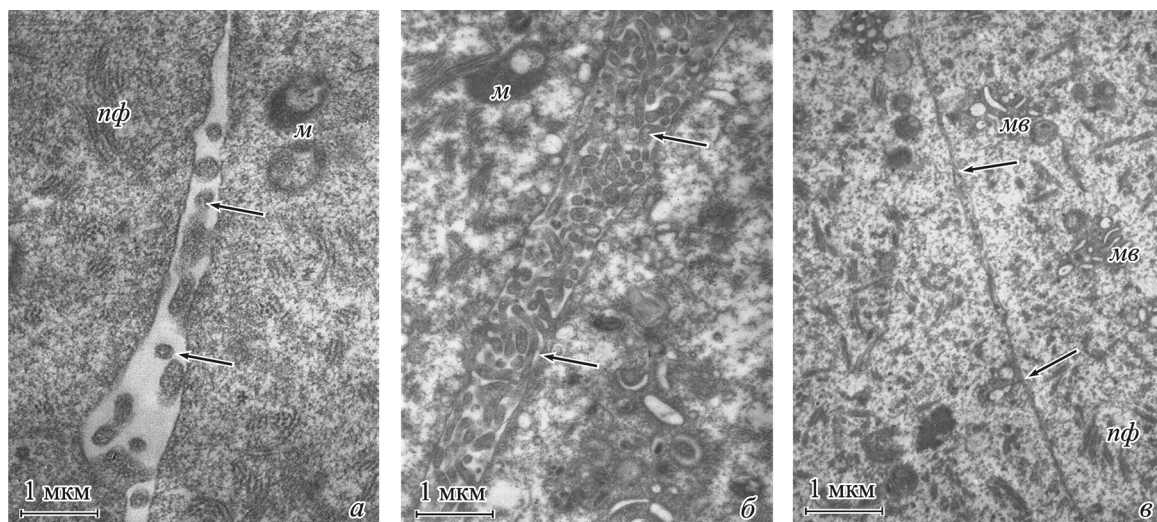


Рис. 4. Ультраструктурная организация зоны межбластомерного контакта (показана стрелками) у контрольных и блокированных зародышей BALB/c.

*a* — контрольный эмбрион на поздней двухклеточной стадии; *б* — эмбрион, находящийся в блоке 1 сут; *в* — эмбрион, находящийся в блоке 2 сут. *мв* — микроворсинки; остальные обозначения те же, что и на рис. 3.

Fig. 4. Ultrastructure of the interblastomere contact area (arrows) in control and blocked BALB/c embryos.

*a* — a late 2-cell control embryo; *б* — an embryo after a 24 h block; *в* — an embryo after a 48 h block.

брионы проходят первое деление дробления в те же сроки, что и контрольные зародыши (33—35 ч от введения ХГ). Однако второго деления дробления не происходит, и эмбрионы остаются на двухклеточной стадии. Прекратившие развитие зародыши не имеют видимых морфологических дефектов. Форма бластомеров и размер зоны соприкосновения сестринских бластомеров соответствуют наблюдаемому у контрольных зародышей.

2. Анализ жизнеспособности зародышей. 2.1. Тест «живое и мертвое». Ко времени остановки развития плазматические мембраны бластомеров непроницаемы для иодистого пропидия, а их ядра интенсивно окрашиваются Хёхстом 33258. Морфология ядер жизнеспособных зародышей соответствует той, что наблюдали у контрольных эмбрионов на поздней двухклеточной стадии развития.

2.2. Способность эмбрионов к восстановлению МТТ. Биовосстановление МТТ происходит так же активно, как и у контрольных зародышей. Кристаллы формазана равномерно распределены по всему объему цитоплазмы бластомеров.

2.3. Внутриклеточное распределение функционально активных митохондрий. Цитоплазма обильно насыщена функционально активными митохондриями. Однако обнаружены существенные различия во внутриклеточном распределении органелл по сравнению с контрольными зародышами. Отсутствуют околядерные скопления митохондрий (кольца). Митохондрии собраны в многочисленные мелкие кластеры, которые у большинства зародышей равномерно распределены в цитоплазме (рис. 1, *м*).

2.4. Морфология ядер, наблюдаемая на светооптическом уровне. Морфология ядер в момент прекращения дробления соответствует наблюдаемой у контрольных эмбрионов в конце двухклеточной стадии развития.

3. Ультраструктурная организация зародышей. Электронно-микроскопическое исследование не выявля-

ет отличий в ультраструктурной организации зародышей BALB/c по отношению к контрольным зародышам. Также не отмечено и тех особенностей, которые характерны для зародышей, длительное время находящихся в блокированном состоянии (см. далее).

Двухклеточные зародыши BALB/c, находившиеся в блокированном состоянии 24 и 48 ч. 1. Развитие зародышей *in vitro*. Блокированные зародыши наблюдали *in vitro* в течение 2 сут со времени остановки развития. Биологический возраст зародышей, находившихся в блоке 24 ч, составляет 72 ч от введения ХГ и соответствует стадии морулы нормального развития. Возраст зародыша, блокированного в течение 48 ч, составляет 96 ч от введения ХГ и соответствует времени кавитации при формировании бластоцисты.

Через 24 ч после остановки дробления у зародышей отсутствуют видимые признаки гибели и нарушения структурной организации. Отмечено изменение формы бластомеров: они приобретают приплюснутую форму, сплющивание происходит в направлении, перпендикулярном плоскости соприкосновения сестринских бластомеров, и площадь соприкосновения бластомеров увеличивается (рис. 1, *б*).

Эмбрионы, находившиеся в блоке 48 ч, при внешнем осмотре не отличаются от зародышей предыдущей группы.

2. Анализ жизнеспособности зародышей. 2.1. Тест «живое и мертвое». Зародыши, находившиеся в состоянии блока 24 ч, в подавляющем большинстве не окрашиваются иодистым пропидием, т. е. имеют неповрежденную плазматическую мембрану. Ядра бластомеров хорошо окрашиваются красителем Хёхстом 33258, имеют близкую к округлой форму, не фрагментированы. Среди зародышей, которые провели в блоке 2 сут, сохраняется целостность плазматической мембраны более половины.

Состояние ядер у таких зародышей было различным: они либо содержат проядрышки и диспергированный



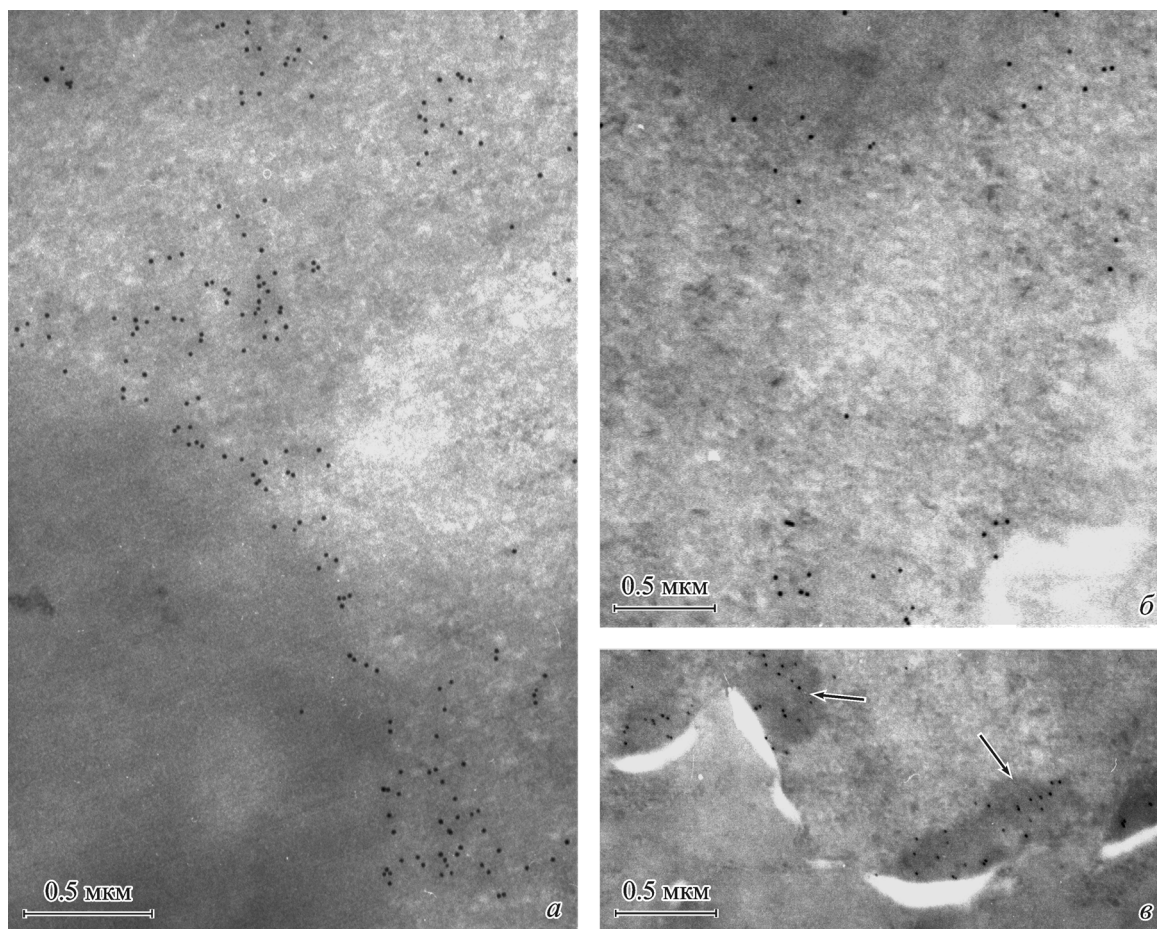


Рис. 5. Распределение ДНК в ядрах контрольных и блокированных зародышей BALB/c.

*a* — фрагмент ядра контрольного зародыша, зерна золота расположены вокруг проядрышка и в центральной части ядра; *б* — центральная часть ядра блокированного зародыша (2 сут в блоке), сохраняется мечение, ассоциированное с периферической частью проядрышка; *в* — периферическая часть ядра блокированного зародыша (2 сут в блоке), отмечаются электронно-плотные блоки конденсированного хроматина (*стрелки*).

Fig. 5. Intranuclear DNA distribution in control and blocked BALB/c embryos.

*a* — fragment of the nucleus of a control embryo; gold particles located around a pronucleolus and in the central part of the nucleus; *b* — central part of the nucleus of a blocked embryo (after a 2-day block). Labeling associated with pronucleolar periphery is retained; *c* — peripheral part of the nucleus of a blocked embryo (after a 2-day block). Notice electron dense aggregated of condensed chromatin in this part of the nucleus.

хроматин (рис. 1, *з*), либо демонстрируют конденсацию хроматина и его перераспределение с локализацией вблизи ядерной мембраны (рис. 1, *е*). Эмбрионы, ядра которых окрасились иодистым пропидием, демонстрируют также и яркое голубое свечение цитоплазмы, обусловленное высокой концентрацией в ней красителя Хёхста 33258. Эта картина свидетельствует о неизбирательной проницаемости плазматической мембраны, т. е. о гибели зародышей. У эмбрионов этой группы мы наблюдали не только пикнотические ядра, но и ядра с хроматином, конденсированным на ядерной мембране (рис. 1, *д*).

2.2. Способность эмбрионов к восстановлению МТТ. Зародыши сохраняют способность к восстановлению МТТ вплоть до окончания срока наблюдения через 2 сут от момента блокирования развития. Однако если у блокированных в течение 1 сут зародышей весь объем цитоплазмы blastomeres равномерно заполнен кристаллами формазана (рис. 1, *и*), то у зародышей, блокированных в течение 2 сут, цитоплазма не столь обильно насыщена ими и отмечаются зоны, свободные от кристаллов

(рис. 1, *к*). В цитоплазме погибших зародышей формазан не образуется.

2.3. Внутриклеточное распределение функционально активных митохондрий. Функциональная активность митохондрий сохраняется у эмбрионов до окончания срока наблюдения, т. е. свыше 48 ч от момента остановки дробления. По способности эмбрионов к аккумуляции родамина 123 зародышей можно было разделить на жизнеспособных и гибнущих. В цитоплазме гибнущих эмбрионов можно было наблюдать лишь небольшие группы функционально активных митохондрий, в мертвых зародышах свечение цитоплазмы отсутствовало.

У жизнеспособных зародышей, находившихся в блоке 24 ч, митохондрии собраны в многочисленные мелкие кластеры, которые могут быть равномерно распределены в цитоплазме или же сконцентрированы под плазматической мембраной или в зоне соприкосновения сестринских blastomeres. Блокированные зародыши, сохранившие функциональную активность митохондрий через 48 ч после остановки дробления, демонстрировали два варианта их локализации. Зародыши первой группы име-

ли в цитоплазме многочисленные кластеры митохондрий, распределенные равномерно по всему объему клеточек. Этот вариант локализации митохондрий был идентичен наблюдаемому у зародышей, блокированных в течение 24 ч. В цитоплазме эмбрионов второй группы были видны крупные кластеры митохондрий. Эти кластеры располагались преимущественно вблизи плазматических мембран и в зоне прилегания сестринских blastомеров (рис. 1, н).

2.4. Морфология ядер, наблюдаемая на светооптическом уровне. Окрашенные DAPI ядра зародышей, находившихся в блоке 24 ч, содержат 1—5 проядрышек на ядро и диспергированный хроматин. Каждое ядро могло содержать проядрышки крупного и малого размеров в разных сочетаниях. Наиболее часто встречался вариант, когда 1 крупное проядрышко соседствовало с 1—2 маленькими (рис. 2, в, з). Форма ядер была близка к округлой. У блокированных зародышей, сохранивших жизнеспособность через 48 ч после остановки дробления, ядра часто имеют структуру, аналогичную описанной для зародышей, находившихся в блоке в течение 1 сут (рис. 2, д). Вторым вариантом организации ядер является отчетливо выраженная конденсация хроматина вблизи ядерной мембраны (рис. 2, а, ж). Фрагментации ядер у зародышей, находившихся в блоке 48 ч, мы не наблюдали.

3. *Ультраструктурная организация зародышей.* Цитоплазма блокированных зародышей на электронно-микроскопическом уровне не демонстрирует существенных признаков дегенерации, однако блокированные зародыши обладают некоторыми характерными чертами по сравнению с контрольными зародышами. Обращает на себя внимание наличие в blastомерах полостей, иногда достигающих значительных размеров. Митохондрии в цитоплазме блокированных зародышей располагаются небольшими группами, причем возрастает их количество в периферической зоне цитоплазмы. Сохраняются скопления митохондрий около ядра, зачастую они окружены гранулярным материалом, никогда не наблюдаемым у контрольных зародышей (рис. 3, б, в). Выяснение природы подобных гранул требует дальнейших исследований с применением иммуноцитохимических методик. Несмотря на то что биологический возраст зародышей в состоянии блока достигает 96 ч, т. е. соответствует стадии blastоцисты, в цитоплазме присутствовали митохондрии с недостаточно развитыми кристами (рис. 3, в). Митохондрии с хорошо развитыми кристами, характерными для эмбрионов данного биологического возраста, также встречались, но достаточно редко (рис. 3, з). У блокированных зародышей отмечается увеличение площади соприкосновения мембран сестринских blastомеров. В некоторых случаях у блокированных зародышей в области межblastомерного контакта отсутствуют микроворсинки и мембраны соседних blastомеров плотно прилегают друг к другу (рис. 4, в). Клеточных контактов типа десмосом, характерных для контрольных зародышей данного биологического возраста, у блокированных зародышей нами обнаружено не было. У всех блокированных зародышей отмечается снижение содержания промежуточных филаментов в области контакта blastомеров, а в некоторых случаях отмечается также и уменьшение содержания митохондрий в этой области.

По результатам иммуноэлектронной микроскопии, в ядрах блокированных зародышей происходит существенное перераспределение хроматина. Наблюдается отчетливая тенденция конденсации хроматина по перифе-

рии ядер с образованием отдельных электронно-плотных блоков (рис. 5, в). Наряду с этим сохраняется ассоциация ДНК-содержащего материала с периферией проядрышек (рис. 5, б).

## Обсуждение

Полученные нами результаты показывают, что зародыши блокирующей линии BALB/c, культивируемые в среде M3 со стадии зиготы, подходят к моменту блокирования развития жизнеспособными. По таким параметрам, как функциональная активность митохондрий и метаболическая активность, индикатором которой является активность оксидоредуктаз, они не отличаются от контрольных гибридных зародышей. Зародыши BALB/c имеют интактные плазматические мембраны и нормальную морфологию ядер. Их ультраструктурная организация соответствует типичной для зародышей двухклеточной стадии развития.

Вместе с тем внутриклеточное распределение митохондрий у зародышей блокирующегося генотипа уже перед вступлением в блок отличается от наблюдаемого у гибридных эмбрионов. Отсутствие перинуклеарной концентрации митохондрий, которая является морфологическим признаком компетентных к развитию двухклеточных зародышей (Bavister, Squirell, 2000), указывает на снижение способности к развитию у зародышей, подверженных «двухклеточному блоку *in vitro*», задолго до остановки их дробления.

Мы имели возможность проследить изменения в состоянии зародышей по мере увеличения их возраста и периода времени, проведенного в блокированном состоянии. При этом анализировали состояние тех эмбрионов, которые не имели видимых морфологических дефектов.

В течение первых 24 ч, проведенных в состоянии «двухклеточного блока *in vitro*», эмбрионы продолжали оставаться живыми. В этот период мы наблюдали изменения морфологии эмбрионов, которые могут быть проявлением частичной реализации программы эмбрионального развития, а именно изменение формы blastомеров и ядерной организации эмбрионов. Происходит постепенное уплощение blastомеров, аналогичное описанному ранее (Goddart, Pratt, 1983), с одновременным увеличением площади соприкосновения сестринских blastомеров, что было подтверждено и на ультраструктурном уровне. Эти изменения напоминают наблюдаемые в процессе компактизации восьмиклеточных эмбрионов, имеющих возраст 60—66 ч от введения ХГ (Fleming, Johnson, 1988). Однако маркерных событий компактизации — формирования десмосом и поляризации плазматической мембраны — в блоке не происходит.

В ядрах блокированных зародышей уменьшается количество проядрышек. Формируется, как правило, одно более крупное проядрышко, которое может соседствовать с одним или несколькими меньшего размера. В результате организация ядер блокированных эмбрионов приобретает черты сходства с той, что наблюдают у восьмиклеточных зародышей (рис. 2, в) (Hillman, Taska, 1969). Вместе с тем и наши наблюдения подтверждают ранее полученные данные о том, что одного из ключевых изменений ядерной организации на начальных стадиях дробления — формирования функционально активного ядрышка (Geuskens, Alexandre, 1984) — у блокированных эмбрионов не происходит (Goddart, Pratt, 1983).



В группе эмбрионов, проведенных в заблокированном состоянии 48 ч, зародыши имеют разную жизнеспособность. Многие из них к этому времени погибают. У таких эмбрионов нарушается целостность ядерной мембраны, что свидетельствует о некротической гибели клеток (Van Stuchten, Van Den Broeck, 2002), но фрагментации цитоплазмы и ядер мы не наблюдали. В отдельных ядрах была хорошо выражена конденсация хроматина вблизи ядерной мембраны. Ядра с подобным распределением хроматина ранее наблюдали в претерпевающих апоптоз клетках бластоцисты человека (Hardy, 1999). Такая противоречивая картина может отражать видовые особенности эмбрионов мыши. Известно, что в отличие от погибших эмбрионов человека, где наблюдают фрагментацию ядра, у мыши субоптимальные условия культивирования вызывают прекращение развития на двухклеточной стадии без выраженных нарушений морфологии ядра (Winston, Johnson, 1992). Не характерна для эмбрионов мыши и интенсивная фрагментация цитоплазмы, очень часто встречаемая у нежизнеспособных эмбрионов человека (Antczak, Van Blercom, 1999).

Более половины исследованных нами через 2 сут после остановки развития зародышей сохраняют целостность плазматической мембраны, а также метаболическую активность, о чем свидетельствует наличие функциональной активности митохондрий и клеточных оксидоредуктаз. Организация ядер в большинстве бластомеров аналогична той, что мы наблюдали у эмбрионов, находившихся в блоке 24 ч. Такие глубоко заблокированные зародыши по совокупности выбранных нами критериев анализа должны быть признаны живыми. Однако в ядрах зародышей этой группы мы неоднократно наблюдали конденсацию хроматина около ядерной мембраны, что было показано как в ходе прижизненных наблюдений, так и при анализе фиксированных, окрашенных DAPI ядер, а также при использовании иммуноэлектронной микроскопии. Подобное изменение организации ядра может быть расценено как раннее морфологическое событие апоптоза (Van Stuchten, Van Den Broeck, 2002), как и появление полостей в цитоплазме бластомеров, обнаруженных при ультраструктурном исследовании. Похожие вакуоли наблюдали в претерпевающих апоптоз клетках предимплантационных эмбрионов человека (Hardy, 1999).

Обращает на себя внимание сохранение зародышами в глубоком блоке функциональной активности митохондрий, о чем свидетельствует способность органелл аккумулялировать родамин 123. Здесь следует отметить, что в эмбриогенезе мыши у двухклеточных зародышей митохондрии являются морфологически незрелыми и функционально малоактивными. Такие органеллы имеют округлую форму и в них отсутствуют кристы (Calarco, Bromn, 1969). Созревание и приобретение полной метаболической активности у митохондрий происходит лишь на стадиях морулы и бластоцисты (Ducibella, Anderson, 1975). На 4—8-клеточных стадиях в зародыше находится смешанная популяция, где часть органелл является незрелой, а остальные постепенно приобретают дефинитивную структуру и интенсивный энергетический метаболизм. Известно, что в заблокированных зародышах не происходит полноценного созревания митохондрий (Godhart, Pratt, 1983), но нами были обнаружены органеллы промежуточных стадий созревания — овальной формы и с выраженными кристами. Возможно, мы наблюдали еще одно проявление частичной реализации заблокирован-

ными зародышами программы доимплантационного развития.

Требуется внимательного изучения природа гранулярного материала, который ассоциирован с окооядерными кластерами митохондрий в заблокированных эмбрионах. В опубликованных работах какие-либо данные о подобных структурах отсутствуют.

Сегодня одной из основных гипотез о причинах возникновения блока является гипотеза о действии на зародыш окислительного стресса в процессе культивирования (Nasr-Esfahani et al., 1990). В модельной системе — культуре мышинных зигот, подвергнутых действию невысокой концентрации перекиси водорода (Liu et al., 2000), были показаны морфологические нарушения в структуре митохондрий — их разбухание, увеличение внутренней полости. У зародышей в состоянии «двухклеточного блока *in vitro*» мы не наблюдали сходных нарушений, хотя не исключено, что они не успели произойти в течение выбранного нами срока наблюдения.

Приведенные нами данные о морфологических признаках апоптоза у эмбрионов в состоянии «двухклеточного блока *in vitro*» являются предварительными и требуют подтверждения при помощи цитохимических методов выявления апоптоза (Willingham, 1999). В настоящее время изучение апоптоза и его биологической роли на доимплантационном этапе развития только начинается, и в связи с этим зародыши в состоянии «двухклеточного блока *in vitro*» могут оказаться полезной экспериментальной моделью. Апоптоз в таких эмбрионах должен иметь ряд особенностей, так как будет проходить на фоне структурной и метаболической незрелости двухклеточного зародыша.

Обобщая результаты проведенных нами наблюдений, можно утверждать, что зародыши блокирующейся линии BALB/c к моменту остановки их развития отличаются с точки зрения структурной организации от гибридных зародышей того же возраста. После блокирования развития эмбрионы остаются жизнеспособными в течение 24 ч, и в этот период времени у них были отмечены морфологические изменения, сходные с теми, что происходят на 4—8-клеточной стадии у нормально развивающихся зародышей. Через 2 сут после блокирования часть эмбрионов гибнет, демонстрируя признаки некроза, а остальные, возможно, находятся в процессе программируемой клеточной гибели.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-04-49723).

#### Список литературы

- Дыбан А. П. 1974. Опыты на зародышах млекопитающих. В кн.: Методы биологии развития. М.: Наука. 217—245.
- Прайт Х. 1990. Эксперименты с предимплантационными эмбрионами мышей. В кн.: Биология развития млекопитающих. Методы. М.: Мир. 27—64.
- Секирина Г. Г., Неганова И. Э. 1996. Преодоление «двухклеточного блока» зародышей мышей в агрегационных химерах. Онтогенез. 27 : 361—370.
- Abramczuk J., Solter D., Koprowski H. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Develop. Biol. 61 : 378—282.
- Antczak M., Van Blercom J. 1999. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on



developmental competence and association with differential elimination of regulatory proteins from polarised domains. *Hum. Reprod.* 14 : 429—447.

Aoki F. T., Choi T., Mori M., Yamashita M., Nagahama Y., Kohmoto K. 1992. A deficiency in the mechanism for p34<sup>cdc2</sup> protein kinase activation in mouse embryos arrested at 2-cell stage. *Develop. Biol.* 154 : 66—72.

Bavister B. D., Squirell J. M. 2000. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum. Reprod.* 15 (Suppl. 2) : 189—198.

Biggers J. D. 1998. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *Int. J. Develop. Biol.* 42 : 879—884.

Brown J. J., Whittingham D. C. 1992. The dynamic provision of different energy substrates improves development of one-cell random bred mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 95 : 503—511.

Calarco P. G., Brown E. H. 1969. An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. *J. Exp. Zool.* 171 : 253—283.

Chatot C. L., Ziomek C. A., Bavister B. D. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 86 : 679—688.

Ducibella T., Anderson E. 1975. Cell shape and membrane changed in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Develop. Biol.* 47 : 45—58.

Fleming T. P., Johnson M. H. 1988. From egg to epithelium. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4 : 459—485.

Gardner D. K., Lane M. 1993. Aminoacids and ammonium production regulate mouse embryo development in culture. *Biol. Reprod.* 48 : 377—385.

Gardner D. K., Lane M. 1996. Alleviation of the «2-cell block» and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum. Reprod.* 11 : 2703—2712.

Geuskens M., Alexandre H. 1984. Ultrastructural and autoradiographic studies of nucleolar development and rRNA transcription in preimplantation mouse embryos. *Cell Differ.* 14 : 125—134.

Goddart M. J., Pratt H. P. M. 1983. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the «2-cell block». *J. Exp. Embryol. Morphol.* 73 : 111—133.

Haraguchi S., Natio K., Sato E. 1999. Phosphate exposure during the late 1-cell and early 2-cell stage a time specific decrease in cyclin B and cdc 25B mRNA in AKR mouse embryos. *Zygote.* 7 : 87—93.

Hardy K. 199. Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.* 4 : 125—134.

Hillman N., Tasca R. J. 1969. Ultrastructural and autoradiographic studies of mouse cleavage stages. *Amer. J. Anat.* 126 : 151—173.

Hussain R. F., Nouri A. M., Oliver R. T. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Methods.* 15 : 89—96.

Johnson L. V., Walsh M. L., Chen L. B. 1980. Localization of mitochondria in living cells with Rhodamine 123. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 778 : 990—994.

Latham K. E. 1999. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int. Rev. Cytol.* 193 : 71—125.

Lawitts J. A., Biggers J. D. 1991. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J. Reprod. Fertil.* 91 : 543—556.

Liu L., Trimarchi J. R., Keefe D. L. 2000. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol. Reprod.* 62 : 1745—1753.

Muggleton-Harris A. L., Whittingham D. G., Wilson L. 1982. Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. *Nature.* 299 : 460—462.

Nakamura K., Tsunoda Y. 1987. An analysis of *in vitro* 2-cell block by using pronuclear transplantation technique. *Jap. Anim. Reprod.* 33 : 15—18.

Nasr-Esfahani M. H., Aitken J. R., Johnson M. H. 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* and *in vivo*. *Development.* 109 : 501—507.

Noda Y., Matsumoto H., Umaoka Y., Tatsumi K., Kishi J., Mori T. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Develop.* 28 : 356—360.

Pratt H. P. M., Muggleton-Harris A. L. 1988. Cycling cytoplasmic factors that promote mitosis in the cultured 2-cell mouse embryo. *Development.* 104 : 115—120.

Qiu J. J., Zhang W. W., Wu Z. L., Wang Y. H., Qian M., Li Y. P. 2003. Delay of ZGA initiation occurred in 2-cell blocked mouse embryos. *Cell Res.* 13 : 179—185.

Robl J. M., Lohse-Heideman J. K., First N. L. 1988. Strain differences in early mouse embryo development *in vitro*: role of the nucleus. *J. Exp. Zool.* 247 : 251—256.

Suzuki S., Komatsu S., Kitai H., Endo Y., Iisuka R., Fukasawa T. 1988. Analysis of cytoplasmic factors in development cleavage of mouse embryo. *Cell Differ.* 24 : 133—138.

Telford N. A., Watson A. J., Schultz G. A. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Develop.* 26 : 90—100.

Van Cruchten S., Van Den Broeck W. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31 : 214—223.

Whillingham M. T. 1999. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 47 : 1101—1109.

Whittingham D. G. 1974. Fertilization, early development and storage of mammalian ova *in vitro*. In: *Early development of mammals.* Cambridge: Cambridge Univ. Press. 2 : 1—24.

Winston N. J., Johnson M. H. 1992. Can the mouse embryo provide a good model for the study of abnormal cellular development seen in human embryos? *Hum. Reprod.* 7 : 1291—1296.

Поступила 17 XI 2005

#### DYNAMICS OF MORPHOFUNCTIONAL ORGANIZATION AND DEVELOPMENTAL POTENTIAL OF MOUSE EMBRYOS IN THE STATE OF «TWO-CELL BLOCK *IN VITRO*»

N. A. Bogolyubova, I. O. Bogolyubova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: ibogol@yahoo.com.

Vital observation in combination with electron microscopy and immunocytochemistry was used for studying structural organization and developmental potential of BALB/c mouse embryos after cleavage cessation at a two cell stage caused by the «two-cell block *in vitro*» phenomenon. Modification of structure and viability of embryos was followed for 2 days from the time of cleavage arrest. Several hours before cleavage arrest, changes in mitochondrial distribution were noticed in embryos, no other disturbances in structural organization of blastomeres being obvious. Embryos, whose development was arrested for 24 h, remained viable and demonstrated

some morphological changes similar to those seen in normally developing embryos of the same age. Towards the end of a 48 h block period some embryos died, the surviving embryos remained morphologically intact and metabolically active. At the same time, the nuclei of the latter frequently displayed chromatin condensation near the nuclear membrane, which is similar to the pattern of chromatin reorganization in the nuclei of early apoptotic cells. Our results support a concept on the «two-cell block *in vitro*» phenomenon as a specific functional state of embryos, and well compare with data on a partial realization by blocked embryos of the developmental program.

Key words: mouse embryos, preimplantation development, «two-cell block *in vitro*», developmental potential, ultrastructural organization.

---