

КОМПЕНСАТОРНОЕ УМЕНЬШЕНИЕ ОБЪЕМА ДВУХКЛЕТОЧНОГО ЭМБРИОНА МЫШИ НЕ РЕГУЛИРУЕТСЯ Na^+/K^+ АТФазой И ОТМЕНЯЕТСЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИТОХАЛАЗИНА Б

© 2012 г. М. А. Погорелова¹, В. А. Голиченков², А. В. Тарасов^{1,2}, В. Н. Погорелова¹, А. И. Панаит¹, А. Г. Погорелов^{1,3} *

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

² Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

³ Пуццинской государственной университет, факультет биофизики и биомедицины

E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.12.10 г.

Окончательный вариант получен 02.03.11 г.

В данной работе, комбинируя лазерную микротомографию (LSM) и количественную трехмерную реконструкцию (3 DR), изучали изменение объема двухклеточного эмбриона мыши в течение гипотонического стресса. Показано, что в широком диапазоне (150–230 мОсм) гипотонических условий развивается компенсаторная реакция (RVD – Regulatory Volume Decrease), направленная на восстановление объема эмбриональной клетки. В начальной фазе набухания, когда осмотический ответ blastomera соответствует закону Вант Гоффа, на интервале 5 минут аннотонического стресса уточнено значение для проницаемости воды через мембрану, которое составляет $0.3 \text{ мкм} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{атм}^{-1}$. Последующая фаза компенсаторного ответа ингибируется на фоне действия цитохалазина Б (Cyto B) и остается не чувствительна к действию оуабаина, специфического ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы.

Ключевые слова: blastomera мыши, регуляторное уменьшение объема, цитоскелет, Na^+/K^+ -АТФаза, лазерная сканирующая микроскопия, трехмерная реконструкция.

Изменение объема клетки вызывает каскад компенсаторных ответов на молекулярном, мембранном и клеточном уровне (Hoffmann et al., 2009). Поддержание клеточного объема рассматривается как ключевой фактор в развитии раннего эмбриона млекопитающих (Van Winkle et al., 1990; Biggers et al., 1993; Fong et al., 2007; Baltz, Tartia, 2010). Для соматических клеток показано, что компенсаторный ответ по типу RVD может быть индуцирован механической деформацией цитоскелета (Hoffmann, Simonsen, 1989; Hoffmann, Dunham, 1995; Lang et al., 1998; Pederson et al., 1999). Приводятся данные о том, что цитохалазин, вещество, вызывающее деполимеризацию филаментов актина, ингибирует развитие RVD в ряде типов дифференцированных клеток (Linshaw et al., 1992; Cornet et al., 1993).

На культурах клеток обнаружено, что оуабаин чувствительная Na^+/K^+ -АТФаза также вовлекается в развитие RVD (Rosenberg et al., 1972; Buckhold et al., 1973). Полагают, что компенсаторный ответ на осмотический стресс не требует прямого участия активного транспорта и регулируется он только пассивным выходом электролитов (K^+ ,

Cl^-) или органических осмолитов (Hoffmann et al., 2009). Однако Na-K насос активизируется при уменьшении уровня цитоплазматического калия, основного осмотически активного иона, что в результате может модифицировать кинетику RVD. Возможно, активизация Na^+/K^+ -АТФазы опосредовано влияет на осмотический статус клетки через гидролиз АТФ.

Механизмы, управляющие RVD, изучали, используя изолированный ооцит и одноклеточный эмбрион мыши, как удобную экспериментальную модель (Van Winkle et al., 1994; Seguin, Baltz, 1997; Kolajova, Baltz, 1999). Однако кинетика осмотического ответа эмбриональной клетки на стадиях, последующих за первым клеточным циклом, оставалась не изученной (Collins, Baltz, 1999). До сих пор аналитические эксперименты в данном направлении ограничены отсутствием адекватного метода измерения объема отдельного blastomera.

При расчете объема клетки исходят из ряда предпосылок: наличие сферической формы, пространственная изотропность при изменении объ-

ема, известное математическое соотношение между линейным размером поперечного сечения и объемом клетки. Перечисленные предположения могут выполняться в случае одиночной клетки, например ооцита или зиготы, но не применимы для многоклеточной системы. Даже для такого простого объекта, как двухклеточный эмбрион, характерно отсутствие сферической симметрии. Однако сложное пространственное строение не препятствует измерению объема при использовании метода количественной LSM (Погорелова и др., 2008; 2009; Pogorelov, Pogorelova, 2008). Лазерная микротомография с последующей 3D реконструкцией применительно к двухклеточному эмбриону мыши позволила нам решить следующие задачи: (1) изучить кинетику изменения объема бластомера в гипотонических условиях, (2) оценить вклад цитоскелета и Na^+/K^+ -АТФазы в осмотический ответ эмбриональной клетки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводили на белых лабораторных мышках SHK из питомника ИТЭБ РАН. Двухклеточные эмбрионы получали в соответствии с методикой, описанной ранее (Березовская и др., 1986; Манк, 1990). В качестве контрольного образца использовали эмбрионы, взятые непосредственно после выделения из яйцевода в среду Дюльбекко. Гипоосмотический шок моделировали изменением концентрации соли NaCl в среде, которая исходно содержит следующие компоненты: NaCl (140 мМ), KCl (2.7 мМ), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 мМ), KH_2PO_4 (1.5 мМ), CaCl_2 (0.9 мМ), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (7.0 мМ), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.3 мМ), глюкоза (0.2 мМ), pH = 7.4.

Принципы подготовки препарата для LSM описаны нами ранее (Pogorelov et al., 1991; 1994; Погорелов, Гольдштейн, 2006; Pogorelov et al., 2006). На начальном этапе объект фиксируется посредством сверхбыстрой заморозки в жидком пропане (85 К), что позволяет сохранить прижизненную форму эмбриона. Кривофиксированные образцы подвергали низкотемпературной дегидратации в вакууме ($\sim 10^{-5}$ Па) при температуре (173 К), используя установку MBA 5 (Balzers, Лихтенштейн). По завершении лиофилизации, высушенный объект заключали в заливочную среду, приготовленную на основе эпоксидной смолы Epon 812.

Измерение объема отдельного бластомера проводили посредством количественной LSM (Погорелова и др., 2008; 2009; Pogorelov, Pogorelova, 2008). После термополимеризации (330 К) за-

ливочной среды, стеклянным ножом затачивали поверхность полученного блока, который затем монтировали на предметное стекло. Подготовленный препарат изучали в конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 Axioplan 2 imaging (Zeiss, Германия), используя HeNe 633 нм лазер (Zeiss, Германия). В режиме прошедшего света получали в вертикальном направлении стопку оптических срезов с шагом 1 мкм.

Учитывая низкий контраст эмбриона, заключенного в прозрачную заливочную среду, цифровое изображение каждого оптического среза обрабатывали по унифицированному алгоритму используя, например, программу Adobe Photoshop 7.0 или GIMP 2.2.17 <http://gimp-win.sourceforge.net/>. На микрофотографии эмбриона в плоскости каждого оптического среза обрисовывали контуры бластомеров и по серии последовательных контуров восстанавливали трехмерный вид эмбриональной клетки. Трехмерную реконструкцию проводили посредством стандартного графического редактора 3ds max <http://www.discreet.com/>.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты количественной LSM двухклеточного эмбриона мыши, подверженного гипоосмотическому стрессу

Рисунок 1 иллюстрирует характерный вид двухклеточного эмбриона мыши, полученный посредством его 3 DR по серии последовательных оптических срезов.

Количественная LSM позволяет не только получить трехмерное изображение отдельной клетки, но и определить ее объем (рис. 1). В таблице 1 суммированы результаты измерения объемных характеристик бластомера в течение гипоосмотического стресса.

Видно (табл. 1), что в гипотонических условиях эмбриональная клетка в начале увеличивается, достигая максимального объема в районе 10 минут осмотического воздействия, а затем плавно возвращается к исходному состоянию. Компенсаторный ответ по типу RVD может быть индуцирован механической деформацией цитоскелета. В случае участия актиновых микрофиламентов в регуляции клеточного объема, деполимеризация полимерных цепей актина цитохалазином должна отменить RVD. Таблица 2 содержит сравнительные данные по кинетики реакции двухклеточного эмбриона мыши на гипотонический стресс в среде, содержащей Cyto B.

В эксперименте с Cyto B (табл. 2) эмбрионы прединкубировали 15 минут в изотонической среде Дюльбекко, содержащей препарат. В первые

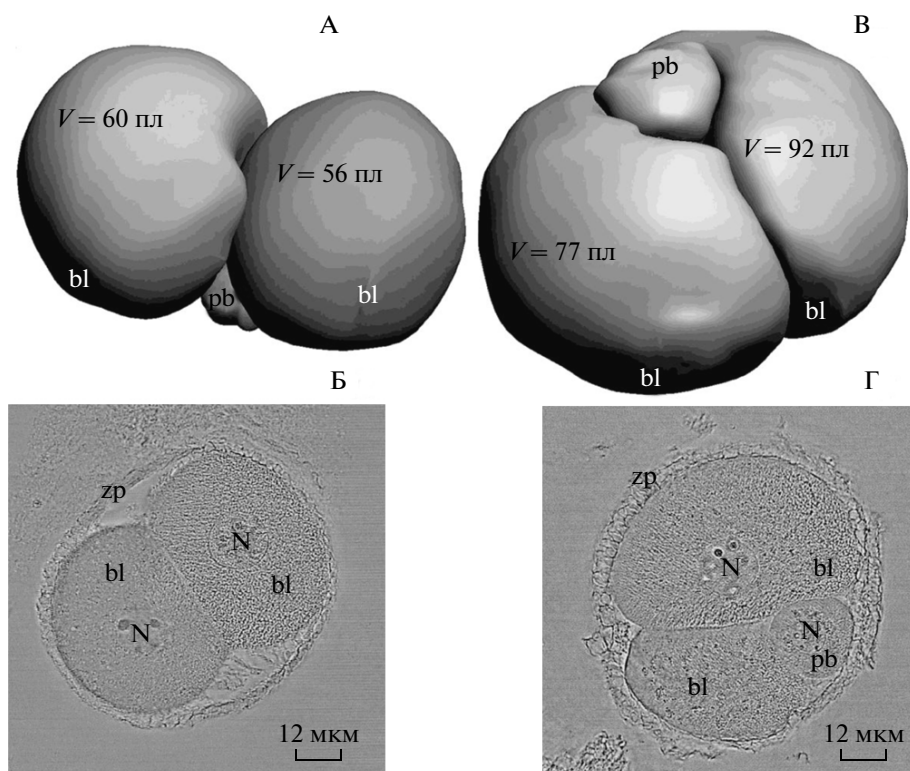


Рис. 1. Двухклеточный эмбрион мыши: (А) 3 DR изображение эмбриона сразу после его выделения из яйцевода, (Б) микрофотография того же эмбриона в плоскости оптического среза, (В) 3 DR изображение эмбрион после 15 минут осмотического стресса (190 мОсм) в среде Дюльбекко, содержащей 80 мМ соли NaCl, (Г) микрофотография того же эмбриона в плоскости оптического среза. Сокращения: bl – бластомер, N – ядро, pb – полярное тельце, V – объем бластомера в пиколитрах (пл), zp – зона пеллюцида.

минуты наблюдали выраженные изменения в виде выростов на поверхности бластомера (рис. 2), с последующим восстановлением формы клетки.

RVD регулируется только пассивным транспортом осмолитов из клетки, в том числе иона ка-

лия основного клеточного электролита. Однако уменьшение уровня цитоплазматического K^+ активизирует Na^+/K^+ -АТФазу, что в результате может модифицировать кинетику компенсаторного ответа. Таким образом, данные (табл. 3) экспери-

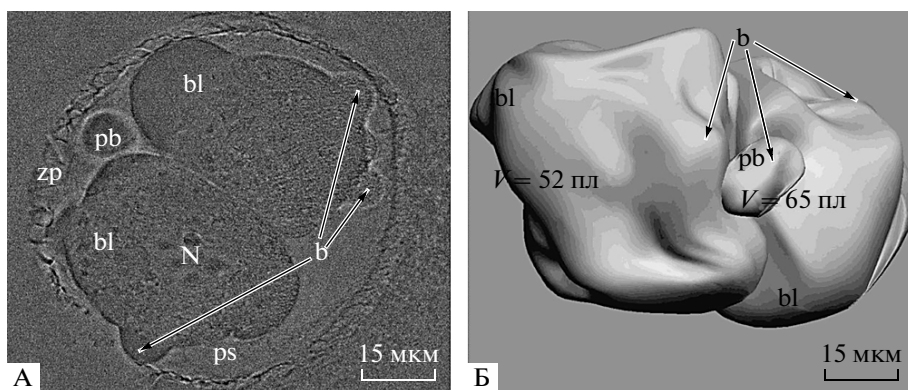


Рис. 2. Изображение двухклеточного эмбриона мыши после 5 минут предобработки в обычной среде Дюльбекко, содержащей цитохалазин Б (5 мкг/мл). (А) микрофотография эмбриона в плоскости оптического среза, (Б) тот же эмбрион после 3 D реконструкции. Сокращения: bl – бластомер, b – складки, N – ядро, pb – полярное тельце; V – объем бластомера в пиколитрах (пл), ps – перивителлиновое пространство, zp – зона пеллюцида.

Таблица 1. Изменение объема blastomeres (пиколитры) двухклеточного эмбриона мыши в течение гипосмотического стресса (мОсм), моделируемого изменением концентрации соли NaCl в среде Дюльбекко^а

Концентрация NaCl в среде	Длительность гипотонического стресса						
	0 мин ^б	5 мин*	10 мин*	15 мин*	30 мин	45 мин	60 мин
60 мМ (150 мОсм)	59 ± 4 n = 24	90 ± 10 n = 24	106 ± 7 n = 21	102 ± 9 n = 24	80 ± 12* n = 22	65 ± 9* n = 20	60 ± 7 n = 22
70 мМ (170 мОсм)	59 ± 4 n = 24	84 ± 10 n = 30	94 ± 8 n = 20	88 ± 9 n = 16	70 ± 10* n = 26	61 ± 7 n = 26	58 ± 3 n = 17
80 мМ (190 мОсм)	59 ± 6 n = 24	79 ± 8 n = 18	83 ± 8 n = 20	78 ± 9 n = 24	63 ± 10 n = 16	60 ± 10 n = 20	58 ± 7 n = 18
90 мМ (210 мОсм)	59 ± 4 n = 24	75 ± 8 n = 16	76 ± 8 n = 15	72 ± 8 n = 24	62 ± 9 n = 18	60 ± 5 n = 25	57 ± 7 n = 20
100 мМ (230 мОсм)	59 ± 4 n = 24	68 ± 7 n = 18	68 ± 8 n = 15	65 ± 8 n = 24	61 ± 5 n = 18	60 ± 7 n = 24	59 ± 8 n = 16

(^а) результаты представлены как среднее и среднеквадратичное отклонение, где *n* – количество эмбрионов в группе.

(^б) “0 мин” – контрольная группа, в которой эмбрионы криофиксировали сразу после их выделения из яйцевода.

(*) *P* < 0.03, если сравнивать с контрольной группой (Student's *t*-test).

Таблица 2. Изменение объема blastomeres (пиколитры) двухклеточного эмбриона мыши в течение гипосмотического стресса на фоне действия цитохалазина Б^а

15 мин предобработки в обычной среде Дюльбекко	Длительность гипотонического стресса (70 мМ NaCl)			
	0 мин ^б	15 мин	30 мин	60 мин
Без Cyto B	53 ± 5 n = 20	86 ± 6 n = 24*	73 ± 8 n = 24*	55 ± 8 n = 16*
В присутствии Cyto B (5 мкг/мл)	54 ± 6 n = 24	95 ± 11 n = 22	93 ± 9 n = 24	89 ± 6 n = 20

(^а) результаты представлены как среднее и среднеквадратичное отклонение, где *n* – количество эмбрионов в группе.

(^б) “0 мин” – контрольная группа, в которой эмбрионы криофиксировали сразу после 15 минут предобработки в обычной среде Дюльбекко, содержащей цитохалазин Б или в отсутствии препарата.

(*) *P* < 0.03 если сравнивать с контрольной группой (Student's *t*-test).

Таблица 3. Изменение объема blastomera (пиколитры) двухклеточного эмбриона мыши в течение гипосмотического стресса на фоне действия оуабаина^а

15 мин предобработки в обычной среде Дюльбекко	Длительность гипотонического стресса (70 мМ NaCl)			
	0 мин ^б	15 мин	30 мин	60 мин
Без оуабаина	54 ± 4 n = 24	87 ± 8 n = 20	74 ± 10 n = 24	59 ± 5 n = 36
В присутствии оуабаина (0.5 мМ)	55 ± 5 n = 18	89 ± 9 n = 28	77 ± 8 n = 26	61 ± 7 n = 38
В присутствии оуабаина (1.5 мМ)	55 ± 7 n = 14	84 ± 8 n = 24	76 ± 9 n = 20	62 ± 8 n = 18

(^а) результаты представлены как среднее и среднеквадратичное отклонение, где *n* – количество эмбрионов в группе.

(^б) “0 мин” – контрольная группа, в которой эмбрионы криофиксировали сразу после 15 минут предобработки в обычной среде Дюльбекко, содержащей оуабаин или в отсутствии препарата.

мента по специфическому ингибированию оуабаином позволяют оценить вклад активного транспорта калия в осмотическую реакцию blastomera.

Характеристика начальной фазы ответа двухклеточного эмбриона мыши на гипосмотический стресс

Эффект RVD интенсивно изучали на ооците и одноклеточном эмбрионе мыши, объектах простых для оценки их объема (Van Winkle et al., 1994; Seguin, Baltz, 1997). Однако эмбрион после первого клеточного цикла трансформируется в качественно новую функциональную систему, что делает необходимым его изучение на стадиях, последующих за зиготой. В данной работе впервые количественно изучена кинетика RVD для двухклеточного эмбриона в широком диапазоне гипосмотического воздействия (табл. 1). На рис. 3 представлена характерная зависимость изменения объема blastomera в течение гипосмотического стресса.

В осмотическом ответе эмбриона выделяется две фазы (рис. 3). В начале, эмбрион реагирует как осмометр. При этом приращение клеточного объема линейно зависит от уменьшения концентрации соли NaCl в среде Дюльбекко (рис. 4), что соответствует закону Вант Гоффа.

Пересечение линии с осью ΔNaCl в точке 20 мМ указывает на то, что осмотическое набухание blastomera будет отсутствовать при концентрации натриевой соли в растворе, содержащем около 130 мМ (~290 мОсм). Это заключение со-

гласуется с данными, полученными для одноклеточного эмбриона мыши (Collins, Baltz, 1999). Таким образом, обычный раствор Дюльбекко (310 мОсм), должен вызывать гиперосмотический шок и, как следствие, нарушения в раннем эмбриогенезе (Balta, Tartia, 2010).

Активность адаптивных механизмов, индуцированных деформацией цитоскелета и мембраны, напрямую зависит от выраженности набухания клетки. Гипотетически, только в самом начале гипосмотического стресса на поток воды в клетку не накладывается обратный транспорт воды, обусловленный компенсаторной реакцией. В нашем эксперименте минимальный промежуток воздействия составляет 5 минут и он ограничен скоростью механических манипуляций с эмбрионом. Поэтому на данном интервале времени, используя выражение (1), по приращению объема эмбриональной клетки рассчитывали эффективную проницаемость мембраны для воды (L_p).

$$L_p = (V/P)/(St) \quad (1)$$

где $\Delta V/\Delta P$ – приращение клеточного объема на единицу осмотического давления, S – площадь поверхности клетки, t – время гипосмотического воздействия.

Отношение $\Delta V/\Delta P$ в выражении (1) определяли из линейной зависимости, показанной на рисунке 4, и равно 0.3×10^3 мкм³/мОсм. Это значение рассчитано на основе экспериментальных данных, полученных для 5 минут осмотического стресса – минимальный интервал воздействия, ограниченный возможностью механических ма-

нипуляций с ранним эмбрионом. Площадь поверхности клетки (S) соответствует 10^4 $\mu\text{м}^2$ (Pogorelov, Pogorelova, 2008). С учетом приведенных параметров, для коэффициента L_p получаем величину 0.01 $\mu\text{м}/(\text{мин} \cdot \text{мОсм})$ или 0.3 $\mu\text{м}/(\text{мин} \cdot \text{атм})$ при 28°C . Указанное значение является оценочным, но тем не менее согласуется с данными, полученными для зрелого ооцита мыши на МII стадии (Gao et al., 1994; Gao et al., 1996; Agca et al., 1998).

Характеристика компенсаторной фазы ответа двухклеточного эмбриона мыши на гипоосмотический стресс

В ответ на гипоосмотический стресс, за начальной фазой набухания эмбриона следует реакция, направленная на компенсацию изменения объема (рис. 3). Для двухклеточного эмбриона мыши показана чрезвычайная чувствительность цитоплазматического баланса основных осмотически активных ионов (Na^+/K^+) к воздействию Суто В (Гольдштейн и др, 2007; Погорелов и др., 2008). Препарат вызывал обратимые изменения концентрации внутриклеточного калия, что позволило предположить участие актинового цитоскелета в RVD. Полученные результаты (табл. 2) подтверждают данную гипотезу.

Причины, лежащие в основе RVD клетки раннего эмбриона, остаются мало изученными. Рассматривается возможность регуляции ионных каналов посредством изменения натяжения клеточной мембраны или механической деформации актинового цитоскелета (Yazaki et al., 1995; Maguire et al., 1998; Kolajova et al., 2001). Обсуждается схожесть механизмов, управляющих уменьшением объема дифференцированной клетки при апоптозе (AVD) и клетки раннего эмбриона при RVD (Okada et al., 2001; Trimarchi et al., 2002). Однако следует отметить, что в отличие от ситуации RVD, цитоскелет не модифицирует эффект AVD.

Выше обсуждали возможные пути участия Na^+/K^+ -АТФазы в адаптивной реакции соматической клетки на гипоосмотический стресс. Для выяснения роли $\text{Na}-\text{K}$ насоса был проведен эксперимент в условиях неспецифического ингибирования активного транспорта посредством калиевой блокады (Погорелов, Погорелова, 2009). Однако зона пеллюцида, гипотетически, даже в безкалийевой среде может служить источником поступления калия в объем перивителлинового пространства (рис. 2). Данный компартмент, прилегающий непосредственно к мембране blastomera, формирует его гомеостаз. Чтобы исключить фактор влияния неконтролируемой диффузии

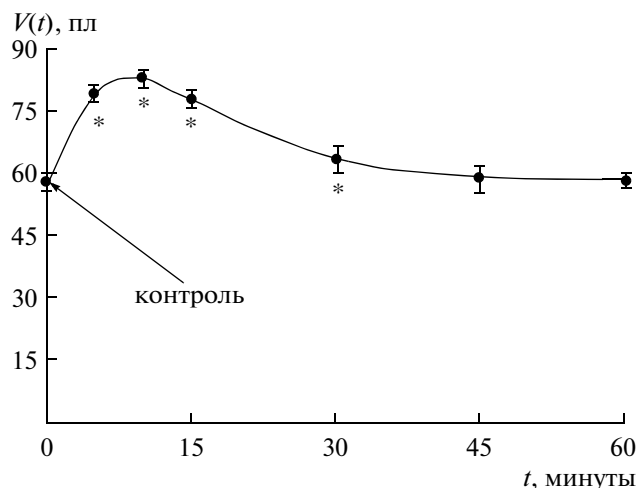


Рис. 3. Изменение во времени объема blastomera двухклеточного эмбриона мыши, подверженного гипоосмотическому стрессу в среде Дюльбекко, содержащей 80 мМ NaCl (190 мОсм). $V(t)$ – объем blastomera в пиколитрах (пл), t – время действия осмотического стресса, результаты представлены как среднее и среднеквадратичная ошибка среднего, * $P < 0.03$, если сравнивать с контролем (Student's t -test).

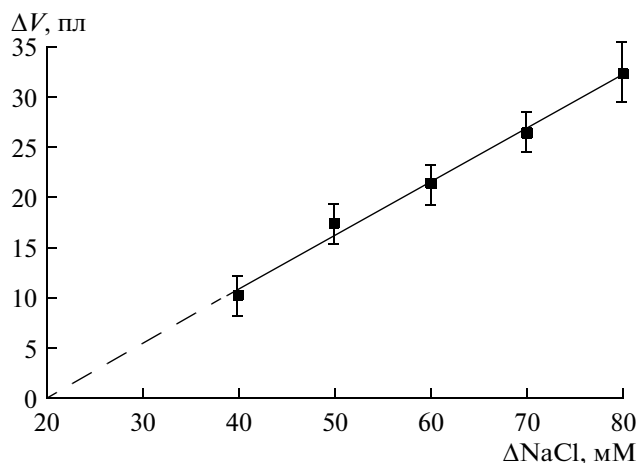


Рис. 4. Приращение на 5 минутах гипоосмотического стресса объема у blastomera двухклеточного эмбриона мыши в зависимости от изменения концентрации (мМ) соли NaCl в среде Дюльбекко. Сплошная линия соответствует экспериментальным данным, представленным как среднее и среднеквадратичная ошибка среднего, штриховой линией показана линейная экстраполяция. Сокращения: ΔV – разница объемов blastomera в пиколитрах (пл), измеренных до и после осмотического стресса, ΔNaCl – разница концентраций соли в обычной и гипотонической среде Дюльбекко.

катиона K^+ во внеклеточное пространство на Na^+/K^+ -АТФазу, в нашем исследовании использовали оубаин, специфический ингибитор этого фермента. Полученные данные указывают на то,

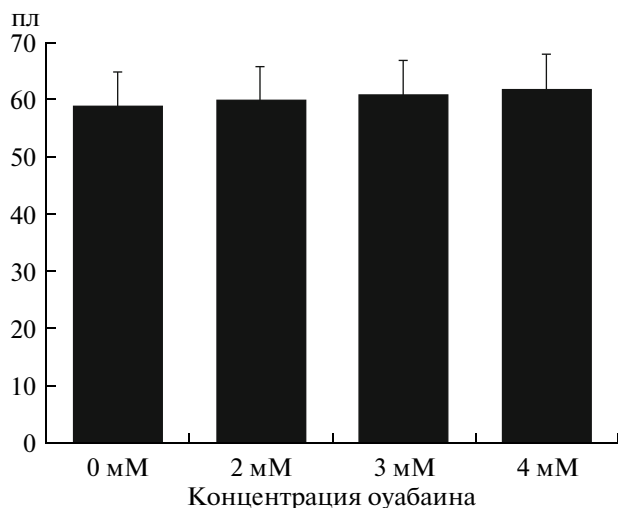


Рис. 5. Объем бластомера в пиколитрах (пл) двухклеточного эмбриона мыши после 60 минут гипотонического (170 мОсм) стресса в среде Дюльбекко, содержащей 70 мМ соли NaCl в присутствии оубаина разной концентрации. Результаты представлены как среднее и среднеквадратичное отклонение.

что при специфическом ингибировании, как и в случае калиевой блокады, нет изменения в кинетике RVD (табл. 3) или в выраженности компенсаторного ответа даже при высоких концентрациях оубаина (рис. 5).

Таким образом, электрогенная составляющая не играет заметную роль в адаптации эмбриональной клетки к гипоосмотическим условиям. Такой вывод полностью согласуется с результатами изучения иммунофлуоресцентными методами локализации Na^+/K^+ -АТФазы на мембране двухклеточного эмбриона мыши (Watson, Kidder, 1988).

Завершая обсуждение результатов можно прийти к следующему выводу. Технология количественной LSM микротомографии обеспечивает возможность измерения объема отдельного бластомера в многоклеточной системе раннего эмбриона мыши. Используя данный подход, мы подтвердили, что ответ по типу RVD характерен для двухклеточного зародыша мыши в широком диапазоне гипоосмотического воздействия (150–230 мОсм). Измерения на начальном интервале (5 минут) гипоосмотического стресса позволили уточнить значение проводимости мембраны бластомера для воды ($0.3 \text{ мкм мин}^{-1} \cdot \text{атм}^{-1}$). В заключение следует отметить, что в эксперименте с оубаином, специфическим ингибитором Na^+/K^+ -АТФазы, мы показали отсутствие вклада электрогенной состав-

ляющей в RVD ответ. По-видимому, в регуляции компенсаторного ответа существенную роль играет механическая деформация актинового цитоскелета. В наших исследованиях деполяризация микрофиламентов актина цитохалазином Б приводила к отмене RVD в двухклеточном эмбрионе мыши.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Березовская О.П., Межевская Л.М., Вепринцев Б.Н.* Метод культивирования доимплантационных зародышей мыши // *Онтогенез*. 1986. Т. 17. № 5. С. 553–555.
- Гольдштейн Д.В., Погорелова В.Н., Погорелов А.Г.* Изменение цитоплазматического Na/K баланса двухклеточного эмбриона мыши под действием цитохалазина Б // *Цитология*. 2007. Т. 49. № 8. С. 680–684.
- Манк М.* Биология развития млекопитающих. Методы. М.: Мир, 1990.
- Погорелов А.Г., Гольдштейн Д.В.* Электронно-зондовый микроанализ цитоплазматической концентрации элементов в одиночной клетке культуры и суспензии // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2006. № 2. С. 84–91.
- Погорелов А.Г., Гольдштейн Д.В., Погорелова В.Н.* Влияние цитотоксинов на внутриклеточный Na/K баланс эмбриональной клетки мыши // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2008. № 2. С. 102–105.
- Погорелова М.А., Яшин В.А., Погорелов А.Г., Голиченков А.А.* Количественная томография раннего эмбриона мыши // *ДАН*. 2008. Т. 418. № 5. С. 712–714.
- Погорелов А.Г., Погорелова В.Н.* Кинетика изменения объема клетки раннего эмбриона мыши в гипоосмотических условиях // *Биофизика*. 2009. Т. 54. № 3. С. 482–487.
- Погорелова М.А., Голиченков В.А., Яшин В.А., Погорелов А.Г.* Трехмерная реконструкция двухклеточного эмбриона мыши посредством лазерной сканирующей микроскопии // *Вестник Московского университета (Биология)*. 2009. № 3. С. 23–27.
- Agca Y., Liu J., McGrath J.J., Peter A.T., Critser E.S., Critser J.K.* Membrane permeability characteristics of metaphase II mouse oocytes at various temperatures in the presence of Me_2SO // *Cryobiology*. 1998. V. 36. P. 287–300.
- Baltz J.M., Tartia A.P.* Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media // *Human Reprod.* 2010. V. 16. P. 166–176.
- Biggers J.D., Lawitts J.A., Lechene C.P.* The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos in vitro // *Mol. Reprod. Dev.* 1993. V. 34. P. 380–390.
- Buckhold-Shank B., Rosenberg H.M., Horowitz C.* Ionic basis of volume regulation in mammalian cells following

- osmotic shock // *J. Cel. Physiol.* 1973. V. 82. P. 257–266.
- Collins J.L., Baltz J.M.* Estimates of mouse oviductal fluid tonicity based on osmotic responses of embryos // *Biol. Reprod.* 1999. V. 60. P. 1188–1193.
- Cornet M., Lambert I.H., Hoffmann E.K.* Relation between cytoskeleton, hypo-osmotic treatment and volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells // *J. Membr. Biol.* 1993. V. 131. P. 55–66.
- Fong B., Watson P.H., Watson A.J.* Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation // *BMC Dev. Biol.* 2007. V. 7. P. 1–16.
- Gao D.Y., McGrath J.J., Tao J., Benson C.T., Critser E.S., Critser J.K.* Membrane transport properties of mammalian oocytes: a micropipette perfusion technique // *J. Reprod. Fertil.* 1994. V. 102. P. 385–392.
- Gao D.Y., Benson C.T., Liu C., McGrath J.J., Critser E.S., Critser J.K.* Development of a novel microperfusion chamber for determination of cell membrane transport properties // *Biophys. J.* 1996. V. 71. P. 443–450.
- Hoffmann E.K., Simonsen L.O.* Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells // *Physiol. Rev.* 1989. V. 69. P. 315–388.
- Hoffmann E.K., Dunham P.B.* Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 161. P. 173–262.
- Hoffmann E.K., Lambert I.H., Pederson S.F.* Physiology of cell volume regulation in vertebrates // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. P. 193–277.
- Kolajova M., Baltz J.M.* Volume-regulated anion and organic osmolyte channels in mouse zygotes // *Biol. Reprod.* 1999. V. 60. P. 964–972.
- Kolajova M., Hammer M.-A., Collins J.L., Baltz, J.M.* Developmentally regulated cell cycle dependence of swelling-activated anion channel activity in the mouse embryo // *Development.* 2001. V. 128. P. 3427–3434.
- Lang F., Bush G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // *Physiol. Rev.* 1998. V. 78. P. 248–306.
- Linschaw M.A., Fogel C.A., Downey G.P., Koo E.W.Y., Gottlieb A.* Role of cytoskeleton in volume regulation of rabbit proximal tubule in dilute medium // *J. Physiol.* 1992. V. 262. P. F144–F150.
- Maguire G., Connaughton V., Prat A.G., Jackson G.R. Jr., Cantiello H.F.* Actin cytoskeleton regulates ion channel activity in retinal neurons // *Neuroreport.* 1998. V. 9. P. 665–670.
- Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S.* Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) // *J. Physiol.* 2001. V. 532. P. 3–16.
- Pederson S.F., Mills J.W., Hoffmann E.K.* Role of the F-actin cytoskeleton in the RVD and RVI processes in Ehrlich ascites tumor cells // *Exp. Cell. Res.* 1999. V. 252. P. 63–74.
- Pogorelov A.G., Allachverdov B.L., Burovina I.V., Mazay G.G., Pogorelova V.N.* Study of potassium deficiency in cardiac muscle: quantitative X-ray microanalysis and cryotechniques // *J. Microsc.* 1991. V. 162. P. 255–269.
- Pogorelov A., Pogorelova V., Repin N., Mizin I.* Quantitative Electron Probe Microanalysis with a wavelength dispersive spectrometer // *Scanning Microscopy.* 1994. Suppl. 8. P. 101–108.
- Pogorelov A.G., Katkov I.I., Smolyaninova E.I., Goldshtein D.V.* Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol // *CryoLetters.* 2006. V. 27. P. 87–98.
- Pogorelov A.G., Pogorelova V.N.* Quantitative tomography of early mouse embryos: Laser Scanning Microscopy and 3-D reconstruction // *J. Microsc.* 2008. V. 232. P. 36–43.
- Rosenberg H.M., Buckhold-Shank B., Gregg E.C.* Volume changes of mammalian cells subjected to hypotonic solution in vitro: evidence for the requirement of sodium pump for the shrinking phase // *J. Cell. Physiol.* 1972. V. 80. P. 23–32.
- Seguin D.A., Baltz J.M.* Cell volume regulation by the mouse zygote: mechanism of recovery from a volume increase // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 1997. V. 272. P. C1854–C1861.
- Trimarchi J.R., Liu L., Smith P.J.S., Keefe D.L.* Apoptosis recruits two-pore domain potassium channels used for homeostatic volume regulation // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002. V. 282. P. C588–C594.
- Van Winkle L.J., Haghghat N., Campione A.L.* Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid // *J. Exp. Zool.* 1990. V. 253. P. 215–219.
- Van Winkle L.J., Campione A.L.* Ouabain-sensitive Rb⁺ uptake in mouse eggs and preimplantation conceptuses // *Dev. Biol.* 1991. V. 146. P. 158–166.
- Van Winkle L.I., Patel M., Wasserlauf H.G., Dickinson H.R., Campione A.L.* Osmotic regulation of taurine transport via system β and novel processes in mouse preimplantation conceptuses // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. V. 1191. P. 244–255.
- Watson A.J., Kidder G.M.* Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K-ATPase during mouse embryogenesis // *Dev. Biol.* 1988. V. 126. P. 80–90.
- Yazaki I., Tosti E., Dale B.* Cytoskeletal elements link calcium-channel activity and the cell-cycle in early sea-urchin embryos // *Development.* 1995. V. 121. P. 1827–1831.

Cyto B Dependent and Ouabain Insensitive Regulatory Volume Decrease in Bicellular Mouse Embryo

M. A. Pogorelova^a, V. A. Golichenkov^b, A. V. Tarasov^{a, b}, V. N. Pogorelova^a,
A. I. Panait^a, and A. G. Pogorelov^{a, c}

^a Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy Sciences, Pushchino, 142290 Russia

^b Biological Faculty of Moscow State University, Department of Embryology, Moscow

^c State University at Pushchino, Pushchino, 142290 Russia

e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Abstract—Mouse single-cell embryos exhibit robust Regulatory Volume Decrease (RVD). In what manner the very early mammalian embryo following zygote stage is appreciably altered by the anisotonic extracellular solution is, as yet, totally unclear. Little attention was paid to this direction since there was no way to determine the blastomere volume. This work has served to quantitatively investigate the osmotic response of bicellular mouse embryos employing Laser Scanning Microtomography (LSM) followed with three-dimensional reconstruction (3 DR). We have shown that bicellular mouse embryos in hypotonic Dulbecco's experience RVD. Embryonic cells subjected to hyposmolar exhibit rapid osmotic swelling followed by gradual shrinking back toward their original volume. The van't Hoff law defines swelling phase with the effective hydraulic conductivity of $0.3 \text{ micron} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$. Water release during RVD in bicellular mouse embryos is abolished by Cytochalasin B (Cyto B) and the volume recovery is insensitive to ouabain treatment.

Keywords: mice blastomere, regulatory volume decrease, cytoskeleton, Na^+/K^+ -ATPase, laser scanning microscopy, three-dimensional reconstruction.