

УДК 591.32

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАННЕГО РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНОВ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2020 г. Л. Ш. Измайлова^{а, *}, Е. А. Воротеляк^а, А. В. Васильев^{а, б}^аИнститут биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия^бМГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра эмбриологии, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

*e-mail: luba.ranaway-94@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.03.2020 г.

После доработки 12.05.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

Эмбриональное развитие млекопитающих включает преимплантационный этап, имплантацию и постимплантационное развитие, во время которого эмбрион прикреплен к стенке матки материнского организма. Моделирование развития эмбрионов в культуре позволяет изучить процесс онтогенеза в динамике, что особенно ценно для изучения раннего постимплантационного развития. Мы приводим обзор существующих систем культивирования для эмбрионов мыши и человека. Также рассмотрен новый экспериментальный подход для изучения раннего эмбриогенеза млекопитающих — эмбриоподобные клеточные конструкторы. С помощью этих методов были получены важнейшие результаты в области закладки зародышевых листков эмбриона мыши и человека, молекулярных и клеточных механизмов морфогенеза. Цель этого обзора — обобщение возможностей и ограничений таких систем для изучения эмбриогенеза млекопитающих и поиск направлений для дальнейшего развития этого подхода.

Ключевые слова: культивирование эмбрионов, эмбриональное развитие, мышь, человек, моделирование имплантации

DOI: 10.31857/S0475145020050043

ВВЕДЕНИЕ

Системы для культивирования эмбрионов млекопитающих разрабатываются для изучения раннего эмбрионального развития и его патологий. Данный подход позволяет оценить непосредственный эффект экспериментальных воздействий, тогда как любые воздействия на эмбрион, находящийся в матке, опосредуются материнским организмом. Кроме того, это позволяет изучать процесс онтогенеза в динамике. Для нормального развития эмбриона *in vitro* необходимо воссоздать условия внутри материнского организма, что является непростой задачей (Piliszek, Kwon, 2011; Esteves et al., 2013).

Преимплантационное развитие эмбриона мыши включает дробление зиготы, хетчинг, или выход из блестящей оболочке и образование первых трех клеточных слоев будущего эмбриона: трофэктодермы, эпибласта и гипобласта. Раннее эмбриональное развитие человека во многом похоже, однако есть ряд отличий. Например, разделение внутренней клеточной массы на две субпопуляции происходит у эмбриона человека уже после им-

плантации. У мыши имплантация происходит примерно на 5 сутки после оплодотворения. Эмбрион человека проходит имплантацию на 7-е или 8-е сутки развития. Эмбрионы, которые не смогли прикрепиться к стенке матки, останавливаются в развитии и вскоре погибают. Момент имплантации эмбриона долгое время был временным рубежом, который не могли преодолеть при культивировании эмбрионов мыши и человека *in vitro*. Не удавалось добиться прикрепления эмбриона и продолжения его развития. На данный момент удалось добиться имплантации эмбрионов как мыши, так и человека на искусственную подложку и пронаблюдать последующее раннее постимплантационное развитие в культуре (Bedzhov et al., 2014; Deglincerti et al., 2016).

Новые сведения в области раннего эмбрионального развития человека необходимы для усовершенствования вспомогательных репродуктивных технологий и для решения проблем, возникающих при естественной репродукции (Shahbazi et al., 2016). Однако изучение эмбрионов человека неоднозначно с этической точки зрения. Основным до-

кументом, регулирующим научную работу с использованием эмбрионов человека, является “Руководство по проведению исследований стволовых клеток эмбриона человека”, выпущенное Международным обществом исследований стволовых клеток. Эмбрион человека в соответствии с международными нормами можно культивировать только до 14-х суток развития или до первых признаков начала гаструляции, то есть до образования первичной полоски (ISSCR, 2006). В связи с этим в условиях *in vitro* возможно наблюдать только процесс имплантации, преимплантационное и раннее постимплантационное развитие эмбриона человека (Piliszek, Kwon, 2011; Bedzhov et al., 2014; Bedzhov, Zernicka-Goetz, 2014; Deglincerti et al., 2016).

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ МЕТОДА ПОДДЕРЖАНИЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ В КУЛЬТУРЕ

Первая система моделирования имплантации эмбрионов млекопитающих *in vitro* была описана в 1970-м г. Дженкинсоном и Уилсоном (Jenkinson, Wilson, 1970). Эмбрионы культивировали на субстрате, состоящем из фрагмента хрусталика глаза быка. Ученым удалось добиться прикрепления эмбриона к подложке и пронаблюдать начало образования зародышевого цилиндра. В этой работе подтверждается важность прикрепления бластоцисты к субстрату для продолжения развития и образования зародышевого цилиндра. В связи с этим имплантацию начали изучать отдельно.

Для имплантации эмбриону необходимо освободиться из блестящей оболочки. Как правило, эмбрион сам способен сделать это, но при культивировании удаление блестящей оболочки делает более вероятным прикрепление бластоцисты к подложке (Khalifa et al., 1992; Piliszek, Kwon, 2011; Bedzhov et al., 2014; Shahbazi et al., 2016; Deglincerti et al., 2016).

Для моделирования имплантации эмбриона важен тип субстрата. Поверхность должна иметь подходящую жесткость, быть адгезивной и позволять качественно визуализировать прикрепленный эмбрион. В работах, посвященных моделированию имплантации эмбриона мыши использовали различные типы субстрата: пластик без дополнительного покрытия, ламинин, фибронектин (Carson et al., 1988; Kauma, Matt, 1995), а также клеточные подслои (Bouillon et al., 2016). Было показано, что сокультивирование эмбрионов с культурой клеток эндометрия повышает вероятность образования бластоцисты и имплантации эмбриона после переноса в матку (Simón et al., 1999).

Для имплантации и последующего развития эмбриона мыши культуральная среда должна содержать сыворотку крови и гормоны: эстроген и прогестерон (Hsu, 1973; Hsu, 1979; Ma et al., 2003). Эти гормоны участвуют в процессе имплантации *in vivo*, могут продлить период рецептивности люминального эпителия, однако их воздействие на бластоцисту пока не до конца ясно (Ma et al., 2003; Bedzhov et al., 2014; Shahbazi et al., 2016; Deglincerti et al., 2016). Трудности в получении сыворотки, а также непостоянство ее состава и угроза вирусной контаминации привели к необходимости снижения доли сыворотки в среде или замены ее другими факторами, например, альбумином (Bentin-Ley et al., 2000; Tao et al., 2013; Morris et al., 2012; Bedzhov et al., 2014; Roode et al., 2012). Однако, было показано, что при хранении в средах и белковых добавках с альбумином, из-за деградации аминокислот, накапливается аммоний, что может быть губительно для эмбрионов (Kleijkers et al., 2016).

В работах Хсу (Hsu, 1973, 1974, 1979) впервые показано преодоление имплантационного барьера и длительное, в течение 8-ми суток после помещения бластоцист в культуру, развитие эмбриона *in vitro*. Эмбрион мыши прикрепляется к подложке из коллагена и развивается до стадии семи сомитов, что соответствует практически половине эмбриогенеза мыши *in vivo*. Было показано, что после образования зародышевого цилиндра эмбрионы могут развиваться и в неприкрепленном состоянии в течение трех суток. Метод кратковременного культивирования не прикрепленного эмбриона мыши, изъятых из матки в постимплантационный период, был разработан в 1966 г. и носит название Whole Embryo Culture (WEC) (New, 1966).

В 1970 г. коллектив авторов из Кембриджского университета, Роберт Эдвардс с коллегами (Edwards et al., 1971), впервые культивировали эмбрион человека. Авторы провели искусственное оплодотворение яйцеклетки человека *in vitro* и культивировали эмбрион до 16-ти клеточной стадии. Однако, моделирование процесса имплантации эмбриона человека еще долгое время оставалось нерешенной проблемой. Начиная с 70-х гг. XX в., начинается активное развитие методов культивирования эмбрионов человека и вспомогательных репродуктивных технологий. Благодаря чему, в 1978 году родился первый ребенок, полученный при помощи экстракорпорального оплодотворения (Steptoe, Edwards, 1978).

Что касается культивирования эмбриона человека в постимплантационный период, то на данный момент его поддержание в культуре после 14-ти су-

ток развития или после начала образования первичной полоски ограничено в большинстве стран (Pera et al., 2015). В связи с этим культивирование эмбриона человека в постимплантационный период ограничивается периодом, начиная от 8-х суток развития, когда культивируемый эмбрион прикрепился к модельному субстрату, до 14-х суток. Моделирование имплантации на искусственный субстрат и раннее постимплантационное развитие эмбриона человека *in vitro* впервые осуществили только в 2016 году (Shahbazi et al., 2016; Deglincerti et al., 2016).

ВНЕШНИЕ МЕХАНИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ

На развитие эмбриона *in vivo* влияют внешние механические сигналы, поступающие от материнских тканей: жесткость субстрата, наличие и размер внешней полости, ограничивающей развитие эмбриона. Некоторые исследователи полагают, что механические сигналы являются важнейшими регуляторами в определенные этапы развития эмбриона (Kolahi et al., 2012; Hiramatsu et al., 2013). В других работах высказывается предположение, что развитие эмбриона полностью задано внутренними сигналами и факторами, получаемыми из среды (Bedzhov et al., 2015).

Было показано, что механические сигналы определяют развитие эмбриона мышцы в период до стадии бластоцисты. В проведенном исследовании учитывались следующие параметры: процент эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, количество клеток в эмбрионе, процент выхода бластоцист из блестящей оболочки. Было рассмотрено изменение параметров в зависимости от жесткости субстрата к которому прикреплялся эмбрион (культуральный пластик или более мягкие, близкие по плотности к эпителию матки, например, коллагеновый гель). По всем рассмотренным характеристикам эмбрионы лучше развивались на мягком субстрате. Интересно, что уровень экспрессии генов, участвующих в ответе на механические стимулы (*Ctgf* и *Ankrd1*) не отличался между двумя группами эмбрионов, культивировавшихся на разных по плотности субстратах (Kolahi et al., 2012).

Было выдвинуто предположение о влиянии внешних механических сигналов на развитие эмбриона мышцы в период непосредственно после имплантации (E5-E5.5), а именно на установление передне-задней оси тела эмбриона. В работе эмбрионы помещали в модельную полость, созданную из полидиметилсилоксана. Наличие внешней полости, ограничивающей развитие эмбриона было необходимо для формирования дистальной

висцеральной энтодермы, что в свою очередь важно для установления передне-задней оси тела эмбриона. В норме клетки дистальной висцеральной энтодермы мигрируют и дают начало антериальной висцеральной энтодерме, которая отвечает за подавление активности постериальных сигнальных путей (Wnt, Nodal) на переднем конце эмбриона (Hiramatsu et al., 2013). Эмбрионы помещались в микрополости, имитирующие полость желточного мешка. Было показано, что элонгация зародышевого цилиндра и появление клеток, экспрессирующих маркеры дистальной висцеральной энтодермы, происходило лишь в тех эмбрионах, которые находились в микрополостях, соответствовавшей по ширине полости желточного мешка. Кроме того, для прохождения этих процессов также требовалось, чтобы жесткость стенок микрополости соответствовала жесткости тканей, окружающих эмбрион при развитии в материнском организме. Культивирование в ограниченном пространстве также способствует разрушению базальной мембраны между эпибластом и висцеральной энтодермой за счет наибольшего напряжения мембраны как раз на дистальном конце эмбриона. Разрыв мембраны, в свою очередь, определяет место возникновения клеток дистальной висцеральной энтодермы (Hiramatsu et al., 2013).

В дальнейшем была опубликована другая статья, авторы которой показали возможность образования дистальной висцеральной энтодермы и при отсутствии внешних факторов. В этой работе использовали линию трансгенных мышей, у которых зеленый флуоресцентный белок экспрессировался под промотором гена *Cer1*, маркера дистальной висцеральной энтодермы. Эта модификация позволила наблюдать за появлением и миграцией клеток этого типа. Было показано, что удлинение зародышевого цилиндра и возникновение дистальной висцеральной энтодермы происходит и в отсутствие каких-либо внешних механических сигналов при культивировании в виспячей капле (Bedzhov et al., 2015).

Результаты согласуются с тем фактом, что первые клетки, экспрессирующие маркеры дистальной висцеральной энтодермы, появляются еще на стадии бластоцисты, когда эмбрион находится в неприкрепленном состоянии в полости матки (Morris et al., 2012). Вместе эти данные указывают на то, что образование дистальной висцеральной энтодермы и установление передне-задней оси зародыша — это процессы в большей степени заданные самоорганизацией эмбриона и не зависящие от внешних механических сигналов. Беджов с соавторами (Bedzhov et al., 2015) предлагают в качестве возможного объяснения расхождения в

результатах с работой Хираматсу (Hiramatsu et al., 2013) разные условия культивирования, а именно состав среды, и выдвигают предположение, что оптимально подобранные условия поддерживают установление передне-задней оси эмбриона и в отсутствие внешних механических сигналов.

Влияние механических сигналов на развитие эмбриона позвоночных подробно изучалось Л.В. Белоусовым (Belousov, 2015), который активно развивал идею о том, что в основе морфогенеза лежат не только химические и молекулярные внутренние взаимодействия, но и механические сигналы. Им было показано, что эмбрион лягушки способен генерировать механический ответ для противодействия внешним деформирующим воздействиям (сжатие или растяжение) (Belousov et al., 2000). При релаксации натяжения ткани в зародыше шпорцевой лягушки на стадии бластулы развитие полностью дезорганизуется, а на стадии гастрюлы такие манипуляции вызывают нарушение развития осевых структур (Ambrosi et al., 2017). Это направление исследований Л.В. Белоусов назвал морфомеханикой.

СООТВЕТСТВИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭМБРИОНОВ НОРМАЛЬНОМУ ЭМБРИОНАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ *IN VIVO*

Для того чтобы изучать эмбриональное развитие на моделях *in vitro* важно ответить на вопрос: соответствует ли развитие эмбриона в культуре тому, как оно проходит *in vivo*? Проблема тут заключается в том, что культуральные системы создаются как раз для того, чтобы детально изучить и понять сам процесс нормального эмбрионального развития, многие моменты которого пока не ясны.

Морфогенез in vitro u in vivo

Для эмбриона мыши *in vitro* было показано развитие от стадии бластоцисты до стадии зародышевого цилиндра с преодолением имплантационного барьера (Morris et al., 2012; Bedzhov et al., 2014). При формировании зародышевого цилиндра бластоциста претерпевает трансформацию, сопровождаемую активной пролиферацией клеток. Трофэктодерма дает начало экстраэмбриональной эктодерме, которая впоследствии образует эмбриональную часть плаценты. Эпибласт и экстраэмбриональная эктодерма пролиферируют и оказываются окруженными висцеральной энтодермой (производная примитивной энтодермы) (Bedzhov et al., 2014). Анализ экспрессии маркеров показал образование всех основных клеточных типов, характерных для раннего зародыша

у эмбриона, прошедшего имплантацию в искусственной модельной системе. Эмбрион, развивавшийся *in vitro*, на стадии зародышевого цилиндра имеет чашеобразный эпибласт, состоящий из поляризованных клеток. Клетки эпибласта положительны по маркеру плюрипотентности Oct4 и имеют нормальный паттерн экспрессии апикального маркера Par6. Экспрессия Eomes маркирует постериальный эпибласт, висцеральную энтодерму и внезародышевую эктодерму. Кроме того, у полученного в культуре зародышевого цилиндра наблюдается характерное распределение экспрессии Cdx2 и GATA4 – маркеров внезародышевой эктодермы и висцеральной энтодермы соответственно. Также было показано, что примерно через 6.5 сут после оплодотворения у культивируемого эмбриона можно наблюдать экспрессию Cer1, которая обозначает образование антериальной висцеральной энтодермы (Morris et al., 2012; Bedzhov et al., 2014). Напротив нее в соответствии с тем, что происходит при нормальном развитии, была детектирована экспрессия Brachyury. При внедрении в культивируемый эмбрион эмбриональных стволовых клеток они интегрируются в состав эпибласта, как это происходит в нормальном эмбрионе (Morris et al., 2012).

При образовании преамниотической полости эпибласт как *in vitro* так и *in vivo* образует вогнутую структуру, причем делает это не за счет механизма апоптоза, как ранее полагалось, исходя из данных, полученных при изучении развития эмбриональных теллец (Couscouvanis, Martin, 1995), а за счет поляризации и реорганизации клеток под воздействием сигналов, передаваемых от базальной мембраны через β -интегриновые рецепторы (Bedzhov et al., 2014). Было показано, что преобразование эпибласта может происходить при подавлении апоптоза. Клетки эпибласта, изначально округлые, поляризуются и образуют розетку с единым центром, где образуется проамниотическая полость.

Постимплантационный эмбрион мыши демонстрирует нормальное развитие в культуре (Glanville-Jones et al., 2013; Drakou, Georgiades, 2015). Изолированный на стадии E5.5 эмбрион развивается до стадии поздней гастрюляции (E7.5). Эмбрионы, культивируемые с момента E5.5, продемонстрировали образование утолщенной дистальной висцеральной энтодермы, экспрессирующей характерный маркер Cer1, образование первичной полоски дополнительно верифицированное распределением экспрессии маркеров первичной полоски и мезодермы Brachyury и Mesp1. Все эмбрионы, культивируемые со стадии E5.5, достигли гастрюляции, но с небольшим отставанием от эмбрио-

нов, развивавшихся *in vivo* (Drakou, Georgiades, 2015).

В другой работе (Kalaskar, Lauderdale, 2014) эмбрионы мыши развивались в бессывороточной среде начиная со стадии E10.5 в течение 16–18 или 38–40 ч. После этого было произведено сравнение по ряду морфологических параметров с эмбрионами, развивавшимися в матке. Среди эмбрионов, которые развивались в культуре 16–18 ч, 58% были сравнимы с нормальными эмбрионами по размеру, количеству сомитов, размеру головы, развитию камер сердца, размеру мозга и зачатков конечностей; у них, также как у нормальных эмбрионов, присутствовал пигментный эпителий сетчатки. Развитие отставало от эмбрионов *in vivo* примерно на час. В той группе эмбрионов, которые развивались в культуре в течение 38–40 ч, 30–40% эмбрионов были схожи с контролем по ключевым морфологическим параметрам и отставали от него примерно на 2–3 ч. Интересно, что при сокультивировании нескольких эмбрионов вместе в 45% случаев выделялся один хорошо развитый эмбрион, сравнимый по развитию и размеру с контрольными эмбрионами, а все остальные отставали (Kalaskar, Lauderdale, 2014).

Возможные причины отставания в развитии части эмбрионов можно объяснить субоптимальными условиями и гипоксией, которым эмбрион подвергался при переносе из матки в культуру. Также это может быть результатом повреждения сосудов эмбриона или желточного мешка при переносе эмбриона (отчасти об этом свидетельствует частое недоразвитие конечностей у эмбрионов мыши в культуре, что может быть связано с недостаточностью кровоснабжения). Также эмбрионы, которые попадали в культуру на более поздних стадиях (E10.5), лучше переносили развитие *in vitro*, чем эмбрионы на более ранних стадиях (E10). Один из выводов, который можно сделать, что условия в культуре субоптимальны и чем дольше эмбрион находится в культуре, тем больше в его развитии будет наблюдаться различий с нормой (Kalaskar, Lauderdale, 2014).

Для эмбриона человека было показано развитие *in vitro* от стадии бластоцисты до ранней постимплантационной стадии (Deglincerti et al., 2016; Shahbazi et al., 2016). Было произведено детальное сравнение развития эмбрионов в культуре с тем, что известно о нормальном развитии эмбрионов *in vivo*. На 7–8 день в культуре бластоцисты прикрепилась к пластику и уплощались. Затем происходило деление Oct4+ эпибласта и GATA6+ гипобласта, что согласуется с данными, полученными по эмбрионам, развивавшимся *in vivo*. Далее в работе проследили развитие Oct4–/GATA6–/

GATA3+/CK7+ производных трофобласта. С восьмого дня трофобласт подразделяется на две популяции. Также как и при развитии *in vivo*, одна из них содержит клетки с одним ядром (цитотрофобласт), находящиеся вблизи к эпибласту и гипобласту, в то время как вторая состоит из многоядерных клеток (синцитиотрофобласт), располагающихся на периферии, имеющих фенотип HCGβ+. Также в прикрепившемся эмбрионе было показано образование проамниотической полости, проходящее за счет поляризации клеток эпибласта, а не апоптоза, что согласуется с результатами, полученными на мышках. Клетки предположительно Oct4+/Nanog+ эпибласта образовали полость и приобрели фенотип CD24+ (маркер зрелого эпибласта). Далее GATA6+ клетки гипобласта также образовали полость (предположительно полость желточного мешка). На 10–11 день культивирования эмбрион сформировал двухслойный диск: произошло деление Oct4+ клеток эпибласта на две популяции различающиеся по форме клеток, предположительно диск эпибласта и амниотический эпителий. Рядом с гипобластом клетки имели форму цилиндрического эпителия, а на противоположном полюсе рядом с трофобластом имели плоскую форму (Deglincerti et al., 2016; Shahbazi et al., 2016). Полученные данные указывают на то, что эмбрион человека в культуре демонстрирует развитие первых трех клеточных типов, амниотической полости, полости желточного мешка и образование двухслойного диска, а также деление трофобласта на цитотрофобласт и синцитиотрофобласт.

Изменения в экспрессии генов и метаболизме

Условия *in vitro* влияют на профиль экспрессии генов эмбриона (Rinaudo, Schultz, 2004; Giritharan et al., 2012; Mantikou et al., 2016; Mahdavinezhad et al., 2019). Гены с измененной экспрессией относятся к самым разным клеточным процессам: биогенез рибосом, синтез белка, апоптоз, регуляция клеточного цикла и пролиферации и связывание селена, мембранный транспорт (*Glut3*, *Aquaporin8*) (Rinaudo, Schultz, 2004), дифференцировка основных линий клеток и поддержание плюрипотентности (*Oct4*, *Nanog*, *Grb2*, *Gata6*) и имплантация (*Mmp9*) (Mahdavinezhad et al., 2019). Также во многих работах отмечено, что экспрессия различных генов различается в зависимости от среды, в которой культивировали эмбрион (Rinaudo, Schultz, 2004; Morbeck et al., 2014).

Среди работ, посвященных изменению экспрессии генов эмбриона в культуре особо отмечено изменение экспрессии импринтируемых ге-

нов (Doherty et al., 2000; Khosla et al., 2001), которая определяется уровнем метилирования. Было высказано предположение, что изменение экспрессии импринтируемых генов связано с изменением уровня метилирования генома, индуцированное факторами сыворотки (Khosla et al., 2001). Для эмбрионов, развивавшихся *in vitro*, показано понижение экспрессии генов: *Igf2* и *H19* и увеличение экспрессии гена *Grb10* (Khosla et al., 2001).

Для эмбрионов, развивавшихся *in vitro*, показана сниженная способность к имплантации при переносе в матку. Одна из возможных причин этого – нарушение дифференцировки трофэктодермы. Это также подтверждается при изучении профиля экспрессии клеток плаценты. Он существенно изменен у эмбрионов, находившихся в культуре в преимплантационный период (Fauque et al., 2010). Для развивавшегося *in vitro* эмбриона была показана пониженная экспрессия *Cdx2*, гена связанного с дифференцировкой трофэктодермы, и повышенной экспрессии *Oct4* и *Nanog* (Mahdavinezhad et al., 2019). *Cdx2* и *Oct4* взаимно ингибируют друг друга, так что полученный результат вполне логичен. Также показано, что профили экспрессии эпибласта и трофэктодермы значительно сильнее различаются у эмбриона *in vivo*, чем после культивирования *in vitro*, что подтверждает предположение о нарушении дифференцировки трофэктодермы в культуре (Giritharan et al., 2012).

Эффект, который оказывает на профиль экспрессии генов условия культивирования, в принципе показан в большом количестве работ. Однако, на это влияют также факторы, не связанные с условиями *in vitro*. Так, например, возраст матери влияет на профиль экспрессии генов эмбриона в большей мере (по числу генов с измененной экспрессией), чем содержание в культуре (Mantikou et al., 2016).

Моделирование имплантации

Важнейшим начальным событием в процессе имплантации как *in vivo*, так и *in vitro* является активация бластоцисты. Под воздействием стероидных гормонов клетки трофобласта дифференцируются и приобретает инвазивные свойства, а также секретирует факторы, например хориотропный гормон человека (ХГЧ), стимулирующие апоптоз люминального эпителия матки и дифференцировку клеток стромы в децидуальные клетки (в случае эмбриона мыши). После активации бластоциста прикрепляется к субстрату (Bedzhov et al., 2014). В норме трофэктодерма активно внедряется в стенку матки, но в модельной системе этого не проис-

ходит. Бластоциста не погружается в субстрат, даже если он состоит из мягкого вещества, например, коллагенового геля. Вероятно, инвазия эмбриона в стенку матки – это обоюдный процесс, в котором эмбрион участвует наравне с клетками эндометрия матки (Ashary et al., 2018).

Для моделирования событий, происходящих при имплантации, были предложены 3D культуральные системы, в которых субстрат для прикрепления похож на стенку матки. Он состоит из мягкого скэффолда, например: фибрин-агарозный матрикс (Wang et al., 2012), децеллюлированный матрикс эндометрия (Olalekan et al., 2017), матригель (Buck et al., 2015) и содержит клетки, выделенные из эндометрия (Bentin-Ley et al., 2000; Wang et al., 2012).

В таких 3D моделях воссоздается структура эндометрия и моделируются его ответ на гормоны и взаимодействие с эмбрионами. Было показано, что клетки в таких системах экспрессируют рецепторы эстрогена и прогестерона (Olalekan et al., 2017) и при обработке гормонами клетки эндометрия человека продуцирует маркеры децидуализации пролактин и IGFBP-1 (Olalekan et al., 2017), что повышает вероятность прикрепления эмбриона или его суррогата (например, сфероидов из клеток трофобласта) к подложке (Wang et al., 2013). Модельный эндометрий мыши децидуализируется в месте прикрепления эмбриона (Ye et al., 2012).

Другая часто используемая для изучения имплантации модель – это сокультивирование эмбриона или сфероидов из клеток трофобласта с монослоем клеток эндометрия без скаффолда. С использованием этой модели была показана роль стромы, как биосенсора качества эмбрионов (Teklenburg et al., 2010; Brosens et al., 2014). У человека клетки стромы эндометрия по-разному отвечают на кокультивирование с нормальными эмбрионами и с эмбрионами низкого качества (замершими в развитии или с высоким процентом фрагментации). Кокультивирование с эмбрионами может повлиять на миграцию стромы, профиль ее экспрессии или секреции. Среда, кондиционированная эмбрионами низкого качества, вызвала снижение в клетках стромы уровня экспрессии шаперона SHC70, что вызвало стресс эндоплазматического ретикулаума (Brosens et al., 2014). В другой работе эмбрион низкого качества значительно повлиял на профиль секреции клеток стромы, произошло понижение секреции ряда интерлекинов и HB-EGF (Teklenburg et al., 2010). С другой стороны, было показано, что среда, кондиционированная эмбрионами низкого качества не влияет на миграцию децеллюлированных

клеток стромы, а среда, кондиционированная эмбрионами высокого качества, повышает миграцию децудуализированных клеток стромы, но, как ни странно, подавляет миграцию не децудуализированных клеток стромы (Berkhout et al., 2018). На профиль экспрессии и секреции недецудуализированной стромы эмбрионы никак не повлияли (Teklenburg et al., 2010).

Имеющиеся результаты сложно сопоставлять друг с другом потому что в разных работах по-разному определяется качество эмбриона: как процент фрагментации (Berkhout et al., 2018), или способность к имплантации после переноса в матку. Однако, эти результаты предполагают, что строма играет роль биосенсора, чувствительного к качеству имплантирующегося эмбриона, а не является пассивным субстратом для внедрения.

Было показано, что факторы, выделяемые эмбрионом, и гормоны также влияют на рецептивность клеток эпителия эндометрия. Инкубация в среде, кондиционированной эмбрионами человека, успешно имплантировавшимся после переноса в матку, повышает вероятность того, что к эпителию прикрепятся клетки трофобласта (Cuman et al., 2013). В работе (Evans et al., 2019) показано, что клетки эпителия эндометрия наиболее рецептивны при воздействии гормонов, имитирующих гормональный фон в рецептивную фазу менструального цикла. Для изучения взаимного влияния эмбриона и эпителия была создана модель (Vergara et al., 2019), которая позволяет изучать изменения в транскрипции отдельно субстрата и модельного эмбриона после прикрепления. Авторы сокультивировали культуру клеток рецептивного и нерецептивного люминального эпителия со сфероидными из клеток JEG-3-GFP (генетически модифицированная линия клеток хориокарциномы человека, экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок под промотором гена PGK). После прикрепления сфероидов возможно разделение GFP+ и GFP- фракций и отдельный анализ их при помощи метода РНК секвенирования.

Также на модели кокультивирования эмбриона или сфероидов из клеток трофобласта с монослоем клеток был изучен начальный этап имплантации – прикрепление эмбриона к люминальному эпителию. Мембранный белок CD98 был предложен, как один из маркеров рецептивности эпителия эндометрия (Domínguez et al., 2010). Пик экспрессии CD98 в норме в человеческом эпителии приходится на окно имплантации, причем локализован он строго на апикальной поверхности клеток. Повышенный уровень экспрессии CD98 зафиксирован в тех местах, где к культуре клеток прикрепился эмбрион. Кроме того, при индук-

ции экспрессии CD98 в клетках нерецептивной линии люминального эпителия человека повышается процент прикрепления к этим клеткам бластоцист мыши (Domínguez et al., 2010).

В прикреплении эмбриона участвуют также интегрины. Интегрин $\beta 3$ важен для прохождения имплантации (Kaneko et al., 2011), подавление его экспрессии при помощи малых интерферирующих РНК в клетках Ишикава (клетки аденокарциномы эндометрия человека) ингибирует прикрепление к ним эмбриона (Kaneko et al., 2011). Инкубация бластоцист или клеток эндометрия с блокирующим пептидом RGD снижало процент прикрепления бластоцист к монослою клеток (Kaneko et al., 2013). Экспрессия интегрин $\alpha v \beta 3$ повышается в клетках Ишикава вокруг места прикрепления эмбрионов (как человека, так и мыши). Подавление экспрессии интегрин $\alpha v \beta 3$ в клетках Ишикава снижает стабильность прикрепления эмбрионов (Kang et al., 2014).

Также была показана роль микро-РНК при имплантации (Kang et al., 2015). У женщин с нарушенным процессом имплантации изменен профиль микро-РНК, секретлируемых эндометрием, в том числе miR-145. При повышении экспрессии miR-145 в клетках подложки стабильность прикрепления эмбрионов понижается. Показано, что miR-145 влияет на взаимодействие инсулиноподобного фактора роста со своим рецептором, что может играть роль в прикреплении эмбриона (Kang et al., 2015).

В моделях имплантации эмбриона мыши *in vitro* изучалось влияние сигнального пути FGF на развитие эмбриона в периимплантационный период. В преимплантационной бластоцисте клетки мигрируют от полярной к муральной трофэктодерме. Миграция заканчивается при имплантации бластоцисты, после чего полярная трофэктодерма делится и выпячивается в обратном направлении, образуя экстраэмбриональную эктодерму. Во время этого процесса клетки делятся и меняют морфологию с плоского эпителия на цилиндрический. После имплантации и прекращения миграции в клетках устанавливается градиент уровня экспрессии Cdx2: высокий уровень экспрессии Cdx2 у клеток полярной трофэктодермы и более низкий у клеток муральной трофэктодермы. Было показано, что во время имплантации миграция клеток трофэктодермы прекращается за счет того, что между муральной и полярной трофэктодермой образуется тканевая граница (происходит накопления актина и миозина, изменяются углы соединения между клетками) (Christodoulou et al., 2019). На подразделение трофэктодермы на субпопуляции и на сохранение мультипотент-

Таблица 1. Характеристики современных моделей имплантации эмбриона

	Показана имплантация	Показаны имплантация и раннее постимплантационное развитие	Система включает клетки эпителия матки или аналоги	Система включает клетки стромы матки или аналоги	Модельная система позволяет качественную визуализацию
Hsu, 1972, 1973, 1979	Да	Да	Нет	Нет	Нет
Bedzhov et al., 2014; Deglincerti et al., 2016; Shahbazi et al., 2016	Да	Да	Нет	Нет	Да
Bentin-Ley et al., 2000	Да	Нет	Да	Да	Да

ности (признаком чего является экспрессия Cdx2) в полярной части влияют сигналы от эпибласта, а именно сигнальный путь FGF. Сигнальный путь FGF активен в полярной трофэктодерме во время имплантации. Если его ингибировать, то пропадает экспрессия Cdx2 в полярной трофэктодерме. Ингибирование активности FGF при помощи SU5402 также вело к нарушению образования границы между муральной и полярной трофэктодермой. Это, в свою очередь, привело к тому что полярная трофэктодерма не образовала экстраэмбриональную эктодерму и эмбриональный цилиндр не развивался. Авторами был сделан вывод о том, что сигнальный путь FGF необходим для морфогенеза полярной трофэктодермы и поддержания мультипотентности во время имплантации (Christodoulou et al., 2019).

В работах, посвященных изучению имплантации, было также показано раннее постимплантационное развитие прикрепленного эмбриона (Bedzhov et al., 2014; Deglincerti et al., 2016). Прикрепление эмбриона к пластику обуславливает некоторые морфологические различия между эмбрионами, проходившими имплантацию *in vitro* и *in vivo*. При имплантации эмбриона в такой системе мы теряем возможность пронаблюдать установление нормальной структуры париетальной энтодермы, также не образуется мембраны Райхерта между париетальной энтодермой и трофэктодермой (Bedzhov et al., 2014).

На данный момент не существует модели, в которой были бы показаны одновременно оба процесса: взаимодействие эмбриона с субстратом, включающим в себя клетки матки, повторяющее многие аспекты нормальной имплантации и раннее постимплантационное развитие прикрепленного эмбриона (табл. 1). Создание такой модели позволило бы изучать процесс имплантации и раннего постимплантационного развития в комплексе.

Временной предел культивирования эмбриона

При помощи метода WEC возможно поддержание развивающегося эмбриона мыши в культуре только до стадии раннего органогенеза (Hsu, 1973, 1979). Это может быть связано с невозможностью выстраивания эмбрио-плацентарной связи (Hsu, 1973; Tam, 1998).

Культивирование эмбриона человека в постимплантационные сроки ограничено международными нормами и разрешено до 14-х суток развития. Развитие эмбриона человека *in vitro* было показано до 12-ти суток развития. В описанных моделях на этапе имплантации эмбрион прикрепляется к пластику. Данная модель позволяет проводить качественную визуализацию эмбриона в ранний постимплантационный период при использовании в качестве субстрата пластика оптического качества, но не поддерживает нормальное развитие эмбриона после 12-ти суток развития. (Deglincerti et al., 2016).

Таким образом, условия, в которых содержится эмбрион *in vitro*, а также все манипуляции с ним влияют на его развитие на разных уровнях (Rinaudo, Schultz, 2004; Giritharan et al., 2012; Mantikou et al., 2016; Mahdavinezhad et al., 2019). На более ранних стадиях это влияние более существенно, и различие условий *in vitro* и *in vivo* часто приводит к гибели эмбриона, фрагментации, остановке развития. В культуральных условиях хуже проходит дифференцировка трофэктодермы, что может приводить к нарушению имплантации или нарушению развития плаценты при переносе эмбриона в матку (Giritharan et al., 2012; Mahdavinezhad et al., 2019). На более поздних стадиях развития влияние условий *in vitro* на эмбрион не так очевидно. В культуре эмбрион мыши в постимплантационные сроки образует морфологически нормальный зародышевый цилиндр (Bedzhov et al., 2014), проходит гастрюляцию (Glanville-Jones et al., 2013; Drakou, Georgiades, 2015).

Развитие проходит с небольшим отставанием от развития *in vivo* (Kalaskar, Lauderdale, 2014). Выделение основных клеточных типов и пространственный паттерн экспрессии маркеров во время этих процессов совпадает с тем, что наблюдается у эмбрионов, развивавшихся *in vivo* (Bedzhov et al., 2014).

Однако влияние условий *in vitro* на развитие эмбриона довольно существенно. Было показано, что при культивировании даже в течение короткого времени у эмбриона нарушается эпигенетическая регуляция и меняется профиль экспрессии генов, в том числе импринтируемых (Doherty et al., 2000; Khosla et al., 2001; Rinaudo, Schultz, 2004; Giritharan et al., 2012; Mantikou et al., 2016; Mahdavinezhad et al., 2019). Изменения в профиле экспрессии генов – это одна из возможных причин особенностей физических характеристик (вес, тесты на когнитивные навыки, общее развитие), наблюдаемых у животных и человека, находившихся в культуре на стадии эмбриона (для человека – после процедуры ЭКО) (Ecker et al., 2004; Watkins et al., 2007; Bouillon et al., 2016). Однако на данный момент эти различия еще относительно плохо описаны и требуют дальнейшего серьезного изучения. Во многом такие исследования затруднены (особенно для человека), так как на развитие эмбриона влияют другие трудно отслеживаемые переменные, такие как возраст матери, состояние ее здоровья, процедуры, применяемые для индукции гиперувуляции. Есть указания на то, что варибельность, вызываемая в развитии эмбриона этими причинами сопоставима с тем влиянием, которое оказывает на эмбрион поддержание *in vitro* (Gardner, 2005; Mantikou et al., 2016).

Методы культивирования эмбриона развиваются в сторону создания *in vitro* условий, максимально аналогичных условиям *in vivo*, что позволит наблюдать эмбриогенез животных на протяжении всего срока эмбрионального развития, а также улучшит вспомогательные репродуктивные технологии.

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПЕРИИМПЛАНТАЦИОННОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Современное направление исследований в этой области включает в себя помимо моделей, позволяющих поддерживать развитие в культуре эмбрионов мыши или человека, также системы для культивирования эмбриоподобных структур, созданных с использованием плюрипотент-

ных эмбриональных клеток или клеток с индуцированной плюрипотентностью (Shao et al., 2017; Rivron et al., 2018). В некоторых работах такие конструкции также включают в себя стволовые клетки трофобласта (Harrison et al., 2018) и стволовые клетки экстраэмбриональной энтодермы (Sozen et al., 2018; Zhang et al., 2019). Такие модельные объекты (эмбриоиды) схожи с эмбрионами в периимплантационные сроки и обладают определенными способностями к самоорганизации и развитию.

Преимущества моделей такого типа связаны с тем, что они являются более пластичными клеточными конструктами, чем эмбрион; эмбриоиды можно создавать с различными заданными свойствами, необходимыми для конкретной задачи. К минусам можно отнести ограничения в способности к полноценному развитию. Кроме того, предполагалось, что их использование не сопряжено с этическими трудностями. Однако создание эмбриоподобных клеточных органоидов, обладающих некоторыми свойствами эмбриона человека на ранних постимплантационных стадиях развития, что уже было показано в некоторых работах (Simunovic et al., 2018; Zheng et al., 2019), вызывает вопросы о том, насколько эти эксперименты этически допустимы (Aach et al., 2017; Munsie et al., 2017). Методы создания эмбриоидов появились относительно недавно и создание полностью функционального эмбриона, как человека, так и мыши *in vitro*, и развитие их дольше ранних постимплантационных стадий технологически еще невозможно. Однако уже появились международные документы, регламентирующие научную работу с эмбриоподобными клеточными конструктами. Международное общество исследования стволовых клеток выпустило руководство (ISSCR, 2016), в котором указано, что такие исследования должны быть запрещены, если они нарушают правило о запрете культивирования эмбрионов человека дольше 14-ти суток (ISSCR, 2006).

Эмбриоподобные самоорганизующиеся системы можно подразделить на 2D колонии, демонстрирующие микропаттерны дифференцировки и эмбриоиды, воспроизводящие некоторые элементы развития в 3D пространстве.

Клеточные конструкты способны к воссозданию множества процессов, проходящих в норме в раннем эмбриогенезе. С использованием этого метода была продемонстрирована самосборка из эмбриональных стволовых клеток и стволовых клеток трофобласта поляризованной бластоцистоподобной структуры, обладающей полостью, схожей с бластоцелью. Клетки внутри такой модели самоорганизуются и дифференцируются,

например, происходит разделение популяции модельной “внутренней клеточной массы” на две популяции, похожие по взаимному расположению и паттерну экспрессии маркеров на эпибласт и на гипобласт (Kime et al., 2019; Vrij et al., 2019). Также использование бластоидов облегчает изучение сигнальных путей и их влияния на эмбриогенез. Так, например, в работе Риврона (Rivron et al., 2018) с применением этого метода была изучена роль сигнального пути TGF β в развитии на стадии бластоцисты. Авторы показали, что популяция клеток модельной внутренней клеточной массы продуцирует BMP4 и Nodal и активирует сигнальный путь TGF β в клетках трофэктодермы, что влияет на образование и размер полости бластоцисты. Также было показано, что одна из мишеней BMP4 и Nodal – белок Klf6, участвующий в эпителиальном морфогенезе трофэктодермы (Rivron et al., 2018).

Такие структуры способны имитировать как взаимодействия клеток между собой, так и влияние преимплантационных эмбрионов на окружающие ткани материнского организма (или на аналогичные клетки *in vitro*). Сфероиды, содержащие клетки трофобласта, взаимодействуют с клетками эпителия матки, повторяя имплантационные взаимодействия (Turco et al., 2018). Также для бластоцистоподобной клеточной структуры была показана способность индуцировать децидуализацию у мышей (Kime et al., 2019; Li et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Помимо моделей преимплантационных эмбрионов были созданы конструкты, имитирующие структуру и развитие постимплантационных эмбрионов. Такие модели демонстрируют элонгацию, люменогенез, гастрюляциоподобные процессы, характерное для определенных этапов развития нарушение симметрии в отсутствии внешних сигналов, выделение популяции клеток, аналогов первичных половых клеток и другие черты нормального постимплантационного морфогенеза (Brink Van Den et al., 2014; Shao et al., 2017; Sozen et al., 2018; Beccari et al., 2018; Zheng et al., 2019; Zhang et al., 2019). При моделировании гастрюляции на клеточном конструкте был показан эпителио-мезенхимный переход и миграция клеток модельного эпибласта, что происходит и *in vivo* (Sozen et al., 2018). В одной из работ у гастрюлоидов пространственно-временной паттерн экспрессии маркеров соответствовал формированию зачатков нервной трубки и кишечной энтодермы (хотя морфологически эти структуры не формировались) (Beccari et al., 2018). Также с использованием клеточных конструктов было получено косвенное подтверждение того,

что в эмбриогенезе человека, также как и мыши, амниотическая эктодерма является центром химической индукции и участвует в запуске гастрюляции. У мышей гастрюляция запускается при помощи сигналов, поступающих от экстраэмбриональной эктодермы. Однако аналог экстраэмбриональной эктодермы у человека отделен от эпибласта амниотической эктодермой. В созданном в работе эмбриоподобном клеточном конструкте при воздействии BMP4 выделялись уплощенные клетки – аналоги амниотической эктодермы. При сокультивировании этих клеток с эмбриональными стволовыми клетками, последние приобретают фенотип клеток заднего края первичной полоски. В индукции такой дифференцировки участвует сигнальный путь Wnt – при добавлении в среду IWP2, ингибитора сигнального пути Wnt, описанного эффекта не наблюдается (Zheng et al., 2019).

Недавно появившееся направление в развитии этого метода, заключается в том, чтобы конструировать эмбриоиды из тотипотентных (характерных для клеток эмбриона до 8-ми клеточной стадии развития) культур клеток. Таким образом, клеточные конструкты, вначале состоящие из неорганизованного агломерата клеток одного типа, или даже одной единственной клетки, сами будут развиваться и дифференцироваться в три первичные эмбриональные ткани (Li et al., 2019). Сгенерированные по такой методике бластоиды обладают множеством сходств с бластоцистой по клеточным механизмам формирования, морфологии и пространственно-временному паттерну экспрессии маркеров. Они способны к имплантации в матку мыши и вызывают децидуализацию, однако не демонстрируют черты позднего постимплантационного развития, со временем дегенерируя в матке. Также бластоиды показали способность к развитию *in vitro* с образованием аналога эмбрионов на стадии E5.5 (Li et al., 2019).

Таким образом, самоорганизующиеся эмбриоподобные клеточные конструкты являются новым мощным инструментом для изучения раннего эмбриогенеза млекопитающих. Сейчас это направление активно развивается, о чем можно судить по росту количества публикаций по этой теме. Одно из самых больших преимуществ такого подхода в экспериментальной эмбриологии – это то, что при помощи подбора используемых типов клеток и набора биологически активных стимулов появилась беспрецедентная возможность генерировать клеточные эмбриоподобные структуры, как конструктор, создавая модель с заданными свойствами, оптимальную для изучения запланированной стадии и процесса эмбриогенеза. На данный мо-

мент становится ясно, что развитие подобных методов планомерно приближает нас к созданию жизнеспособного и полностью функционального эмбриона из культивируемых клеток. Формируется направление, которое можно обозначить как “синтетическая эмбриология”.

Одним из новых многообещающих современных методов являются системы для культивирования эмбрионов на основе микрофлюидики. Данная группа методов появилась в 1990-х гг. и с тех пор стремительно развивается. Микрофлюидные системы культивирования могут быть открытыми и закрытыми, статическими или динамическими в зависимости от целей конкретного исследования. Данные системы позволяют создать циркуляцию жидкости вокруг эмбриона для его эффективного обмена молекулами со средой (отвода продуктов обмена и поставки питательных веществ и биоактивных молекул). Кроме того, эмбрионы мыши лучше развиваются при совместном культивировании и микрофлюидная система поддерживает их молекулярное взаимодействие друг с другом. В микрофлюидных системах возможно более точно контролировать все характеристики среды, также полностью закрытые системы не дают микрообъемам жидкости пересыхать. Еще одним важным преимуществом данной модели культивирования является то, что при движении в камерах с микрофлюидикой эмбрион получает механические сигналы, схожие с получаемыми *in vivo* (Esteves et al., 2013; Gas, Nordhoff, 2017).

Системы на основе микрофлюидики могут использоваться как для фундаментальных научных исследований, так и в клинической практике для культивирования эмбрионов, гамет, стволовых клеток. На данный момент уже разработаны модельные микрофлюидные системы, позволяющие культивировать эмбрионы человека и проводить искусственное оплодотворение в рамках протоколов вспомогательных репродуктивных технологий (Smith et al., 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование развития эмбрионов в культуре позволяет детально изучать эмбриональное развитие мыши и человека и факторы, влияющие на него. Преимуществом модели является то, что эмбрион, содержащийся в культуре, легко доступен для наблюдения и экспериментальных воздействий, что дает возможность изучения влияния любых экспериментальных факторов непосредственно на развивающийся эмбрион. С помощью культивирования эмбриона в условиях *in vitro* были описаны множество аспектов эмбри-

онального развития млекопитающих, относящихся к морфологии, физиологии и молекулярным аспектам эмбриогенеза.

Несмотря на преимущества данного метода и его широкое применение для изучения эмбриогенеза млекопитающих, у него также есть определенные ограничения. Во-первых, эмбрионы, содержащиеся в культуре, имеют ряд отличий от тех, которые развивались в нормальных условиях, во-вторых, поддерживать эмбрион мыши в культуре возможно только в течение половины срока эмбрионального развития, а эмбрион человека в соответствии с международными нормами только 14 сут, в-третьих, моделирование процесса имплантации не совсем соответствует тому, как данный процесс проходит *in vivo*. Таким образом, у метода есть большие перспективы для дальнейшего развития.

Основные направления развития методов культивирования эмбрионов млекопитающих включают в себя подбор условий среды для максимального повторения условий, окружающих эмбрион *in vivo*. В том числе совершенствование субстрата для моделирования процесса имплантации, приближенного к жизни. Наиболее перспективными для моделей имплантации являются субстраты, включающие в себя клетки матки материнского организма, находящиеся на 3D матриксе, имитирующем эндометрий. Необходимо создание модели имплантации, которая позволяла бы наблюдать как имплантацию эмбриона, так и его раннее постимплантационное развитие в рамках одного эксперимента.

В современном развитии методов изучения раннего эмбриогенеза млекопитающих преобладают два направления. Первое заключается в создании культуральных систем и эмбриоподобных клеточных конструкторов с использованием плюрипотентных клеток, отвечающих задачам конкретного эксперимента. Другое направление – это создание клеточных моделей, обладающих большой способностью к самоорганизации. Оба направления открывают перспективы экспериментального изучения раннего развития млекопитающих в околоимплантационный период.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках Госзадания ИБР РАН № 0108-2019-0004.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Необходимость соблюдения этических принципов неприменима.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Л.Ш. Измайлова и Е.А. Воротеяк написали текст обзора. Е.А. Воротеяк и А.В. Васильев отредактировали статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aach J., Lunshof J., Iyer E. et al.* Addressing the ethical issues raised by synthetic human entities with embryo-like features // *Elife*. 2017. V. 6. P. 1–20.
- Ambrosi D., Belousov L.V., Ciarletta P.* Mechanobiology and morphogenesis in living matter: a survey // *Meccanica*. 2017. V. 52. № 14. P. 3371–3387.
- Ashary N., Tiwari A., Modi D.* Embryo Implantation: War in times of love // *Endocrinology*. 2018. V. 159. № 2. P. 1188–1198.
- Beccari L., Moris N., Girgin M. et al.* Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids // *Nature*. 2018. V. 562. № 7726. P. 272–276.
- Bedzhov I., Leung C.Y., Bialecka M. et al.* *In vitro* culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. № 12. P. 2732–2739.
- Bedzhov I., Bialecka M., Zielinska A. et al.* Development of the anterior-posterior axis is a self-organizing process in the absence of maternal cues in the mouse embryo // *Cell Res.* 2015. V. 25. № 12. P. 1368–1371.
- Bedzhov I., Zernicka-Goetz M.* Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation // *Cell*. 2014. V. 156. № 5. P. 1032–1044.
- Belousov L.V.* Morphomechanics of development // Springer International Publishing. 2015. 195 p.
- Belousov L. V., Louchinskaia N.N., Stein A.A.* Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // *Dev. Genes Evol.* 2000. V. 210. № 2. P. 92–104.
- Bentin-Ley U., Horn T., Sjogren A. et al.* Ultrastructure of human blastocyst-endometrial interactions *in vitro* // *J. Reprod. Fertil.* 2000. V. 120. № 2. P. 337–350.
- Berkhout R.P., Lambalk C.B., Huirne J. et al.* High-quality human preimplantation embryos actively influence endometrial stromal cell migration // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018. V. 35. № 4. P. 659–667.
- Bouillon C., Leandri R., Desch L. et al.* Does embryo culture medium influence the health and development of children born after *in vitro* fertilization? // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 3. P. 1–14.
- Brink S.C., Alemany A., Batenburg V. et al.* Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells // *Dev.* 2014. V. 141. № 22. P. 4231–4242.
- Brosens J.J., Salker M.S., Teklenburg G. et al.* Uterine selection of human embryos at implantation // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4–11.
- Buck V.U., Gellersen B., Leube R.E., et al.* Interaction of human trophoblast cells with gland-like endometrial spheroids: A model system for trophoblast invasion // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 4. P. 906–916.
- Carson D.D., Tang J.P., Gay S.* Collagens support embryo attachment and outgrowth *in vitro*: Effects of the Arg-Gly-Asp sequence // *Dev. Biol.* 1988. V. 127. № 2. P. 368–375.
- Christodoulou N., Weberling A., Strathdee D. et al.* Morphogenesis of extra-embryonic tissues directs the remodeling of the mouse embryo at implantation // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1–12.
- Coucovanis E., Martin G.R.* Signals for death and survival: A two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo // *Cell*. 1995. V. 83. № 2. P. 279–287.
- Cuman C., Menkhorst E.M., Rombauts L.J. et al.* Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative to IVF success // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 5. P. 1161–1171.
- Deglinerti A., Croft G.F., Pietila L.N. et al.* Self-organization of the *in vitro* attached human embryo // *Nature*. 2016. V. 533. P. 251–254.
- Doherty A.S., Mann M.R.W., Tremblay K.D. et al.* Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo1 // *Biol. Reprod.* 2000. V. 62. № 6. P. 1526–1535.
- Domínguez F., Simon C., Quinero A. et al.* Human endometrial CD98 is essential for blastocyst adhesion // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 10.
- Drakou K., Georgiades P.* A serum-free and defined medium for the culture of mammalian postimplantation embryos // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 468. № 4. P. 813–819.
- Ecker D.J., Stein P., Xu Z. et al.* Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 6. P. 1595–1600.
- Edwards R.G., Steptoe P.C., Purdy J.M.* Fertilization and cleavage *in vitro* of preovulator human oocytes // 1971. P. 287–289.
- Esteves T.C., Rossem F.V., Nordhoff V. et al.* A microfluidic system supports single mouse embryo culture leading to full-term development // *RSC Adv.* 2013. V. 3. № 48. P. 26451–26458.
- Evans J., Walker K.J., Bilandzic M. et al.* A novel “embryo-endometrial” adhesion model can potentially predict “receptive” or “non-receptive” endometrium // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019.
- Fauque P., Mondon F., Letourneur F. et al.* *In vitro* fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 2.
- Gac S. Le, Nordhoff V.* Microfluidics for mammalian embryo culture and selection: Where do we stand now? // *Mol. Hum. Reprod.* 2017. V. 23. № 4. P. 213–226.
- Gardner D.K.* *Ex vivo* early embryo development and effects on gene expression and imprinting // *Reprod. Fertil. Dev.* 2005. P. 361–370.
- Giritharan G., Piane L., Donjacour A. et al.* *In vitro* culture of mouse embryos reduces differential gene expression between inner cell mass and trophoctoderm // *Reprod. Sci.* 2012. V. 19. № 3. P. 243–252.

- Glanville-Jones H.C., Woo N., Arkell R.M.* Successful whole embryo culture with commercially available reagents // *Int. J. Dev. Biol.* 2013. V. 57. № 1. P. 61–67.
- Harrison S.E., Sozen B., Zernicka-Goetz M.* *In vitro* generation of mouse polarized embryo-like structures from embryonic and trophoblast stem cells // *Nat. Protoc.* 2018. V. 13. № 7. P. 1586–1602.
- Heo Y.S., Cabrera L., Bormann C. et al.* Dynamic microfunnel culture enhances mouse embryo development and pregnancy rates // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. № 3. P. 613–622.
- Hiramatsu R., Matsuoka T., Kimura-Yoshida C. et al.* External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos // *Dev. Cell.* 2013. V. 27. № 2. P. 131–144.
- Hsu Y.C.* Differentiation *in vitro* of mouse embryos to the stage of early somite // *Dev. Biol.* 1973. V. 33. № 2. P. 403–411.
- Hsu Y.C., Baskar J. et al.* Development *in vitro* of mouse embryos from the two-cell egg stage to the early somite stage // *Development.* 1974. V. 31. № 1. P. 235–245.
- Hsu Y.C.* *In vitro* development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage // *Dev. Biol.* 1979. V. 68. № 2. P. 453–461.
- ISSCR. Guidelines for the Conduct of Human Embryonic Stem Cell Research. 2006.
- ISSCR. Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation. 2016.
- Jenkinson E.J., Wilson I.B.* *In vitro* support system for the study of blastocyst differentiation in the mouse // *Nature.* 1970. V. 228. № October 17th. P. 227–231.
- Kalaskar V.K., Lauderdale J.D.* Mouse embryonic development in a serum-free whole embryo culture system // *J. Vis. Exp.* 2014. № 85. P. 1–8.
- Kaneko Y., Lecce L., Day M.L. et al.* B1 and B3 integrins disassemble from basal focal adhesions and B3 integrin is later localised to the apical plasma membrane of rat uterine luminal epithelial cells at the time of implantation // *Reprod. Fertil. Dev.* 2011. V. 23. № 3. P. 481–495.
- Kaneko Y., Day M.L., Murphy C.R.* Integrin $\beta 3$ in rat blastocysts and epithelial cells is essential for implantation *in vitro*: Studies with Ishikawa cells and small interfering RNA transfection // *Hum. Reprod.* 2011. V. 26. № 7. P. 1665–1674.
- Kaneko Y., Murphy C.R., Day M.L.* Extracellular matrix proteins secreted from both the endometrium and the embryo are required for attachment: A study using a coculture model of rat blastocysts and Ishikawa cells // *J. Morphol.* 2013. V. 274. № 1. P. 63–72.
- Kang Y.J., Forbes K., Karver J. et al.* The role of the osteopontin-integrin $\alpha v \beta 3$ interaction at implantation: Functional analysis using three different *in vitro* models // *Hum. Reprod.* 2014. V. 29. № 4. P. 739–749.
- Kang Y.J., Lees M., Matthews L.C. et al.* miR-145 suppresses embryo-epithelial juxtacrine communication at implantation by modulating maternal IGF1R // *J. Cell Sci.* 2015. V. 128. № 4. P. 804–814.
- Kauma S.W., Matt D.W.* Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development *in vitro* // *J. Assist. Reprod. Genet.* 1995. V. 12. № 2. P. 153–156.
- Khalifa E.A.M., Tucker M.J., Hunt P.* Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse // *Hum. Reprod.* 1992. V. 7. № 4. P. 532–536.
- Khosla S., Dean W., Brown D. et al.* Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes1 // *Biol. Reprod.* 2001. V. 64. № 3. P. 918–926.
- Kime C., Kiyonari H., Ohtsuka S. et al.* Induced 2C expression and implantation-competent blastocyst-like cysts from primed pluripotent stem cells // *Stem Cell Reports.* 2019. V. 13. № 3. P. 485–498.
- Kleijkers S.H.M., Montfort A.P.A., Bekers O. et al.* Ammonium accumulation in commercially available embryo culture media and protein supplements during storage at 2–8°C and during incubation at 37°C // *Hum. Reprod.* 2016. V. 31. № 6. P. 1192–1199.
- Kolahi K.S., Donjacour A., Xiaowei L. et al.* Effect of substrate stiffness on early mouse embryo development // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7.
- Li R., Zhong C., Yang Y. et al.* Generation of blastocyst-like structures from mouse embryonic and adult cell cultures // *Cell.* 2019. V. 179. № 3. P. 687–702. e18.
- Ma W., Song H., Das S.K. et al.* Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 5. P. 2963–2968.
- Mahdavinzhad F., Kazemi P., Fathalizadeh P. et al.* *In vitro* versus *in vivo*: Development-, apoptosis-, and implantation-related gene expression in mouse blastocyst // *Iran. J. Biotechnol.* 2019. V. 17. № 1. P. 90–97.
- Mantikou E., Jonker M.J., Wong K.M. et al.* Factors affecting the gene expression of *in vitro* cultured human preimplantation embryos // *Hum. Reprod.* 2016. V. 31. № 2. P. 298–311.
- Morbeck D.E., Krisher R.L., Herrick J.R. et al.* Composition of commercial media used for human embryo culture // *Fertil. Steril.* 2014. V. 102. № 3.
- Morris S.A., Grewal S., Barrios F. et al.* Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 610–673.
- Munsie M., Hyun I., Sugarman J.* Ethical issues in human organoid and gastruloid research // *Dev.* 2017. V. 144. № 6. P. 942–945.
- New D.A.* Development of rat embryos cultured in blood sera // *J. Reprod. Fertil.* 1966. V. 12. № 3. P. 509–524.
- Olalekan S.A., Burdette J.E., Getsios S. et al.* Development of a novel human recellularized endometrium that responds to a 28-day hormone treatment // *Biol. Reprod.* 2017. V. 96. № 5. P. 971–981.
- Pera M.F., DeWert G., Dondorp W. et al.* What if stem cells turn into embryos in a dish? // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 10. P. 917–919.
- Piliszek A., Kwon G.S., Hadjantonakis A.-K.* *Ex utero* culture and live imaging of mouse embryos // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 770. P. 439–455.
- Rinaudo P., Schultz R.M.* Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse

- embryos // *Reproduction*. 2004. V. 128. № 3. P. 301–311.
- Rivron N.C., Frias-Aldeguer J., Vrij E.J. et al. Blastocyst-like structures generated solely from stem cells // *Nature*. 2018. V. 557. № 7703. P. 106–111.
- Roode M., Blair K., Snell P. et al. Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling // *Dev. Biol.* 2012. V. 361. № 2. P. 358–363.
- Shahbazi M.N., Jedrusik A., Vuoristo S. et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues // *Nat. Cell Biol.* 2016. V. 18. № 6. P. 700–708.
- Shahbazi M.N., Siggia E.D., Zernicka-Goetz M. Self-organization of stem cells into embryos: A window on early mammalian development // *Science*. 2019. V. 364. № 6444. P. 948–951.
- Shao Y., Taniguchi K., Townshend R.F. et al. A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 1–15.
- Shao Y., Taniguchi K., Gurdziel K. et al. Self-organized angiogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche // *Nat. Mater.* 2017. V. 16. № 4. P. 419–425.
- Simón C., Mercader A., Garcia-Velasco J. et al. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999. V. 84. № 8. P. 2638–2646.
- Simunovic M., Metzger J.J., Eto F. et al. Molecular mechanism of symmetry breaking in a 3D model of a human epiblast // *bioRxiv* (preprint). 2018. V. 21. № July. P. 330704.
- Smith G.D., Swain J.E., Bormann C.L. Microfluidics for gametes, embryos, and embryonic stem cells // *Semin. Reprod. Med.* 2011. V. 29. № 1. P. 5–14.
- Sozen B., Amadei G., Cox A. et al. Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures // *Nat. Cell Biol.* 2018. V. 20. № 8. P. 979–989.
- Stepoe P.C., Edwards R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1978. V. 116. № 4. P. 321.
- Tam P.P.L. Postimplantation mouse development: Whole embryo culture and micro-manipulation // *Int. J. Dev. Biol.* 1998. V. 42. № 7. P. 895–902.
- Tao T., Robichaud A., Mercier J. et al. Influence of group embryo culture strategies on the blastocyst development and pregnancy outcome // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013. V. 30. № 1. P. 63–68.
- Teklenburg G., Salker M., Molokhia M. et al. Natural selection of human embryos: Decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 4. P. 2–7.
- Turco M.Y., Gardner L., Kay R.G. et al. Trophoblast organoids as a model for maternal–fetal interactions during human placentation // *Nature*. 2018. V. 564. № 7735. P. 263–281.
- Vergaro P., Tiscornia G., Rodriguez A. et al. Transcriptomic analysis of the interaction of choriocarcinoma spheroids with receptive vs. non-receptive endometrial epithelium cell lines: an *in vitro* model for human implantation // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019. V. 36. № 5. P. 857–873.
- Vrij E.J., Reimer Y.S., Javier F.A. et al. Self-organization of post-implantation-like embryonic tissues from blastoids // *bioRxiv*. 2019. P. 510396.
- Wang H., Pila F., Anderson S. et al. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids // *Mol. Hum. Reprod.* 2012. V. 18. № 1. P. 33–43.
- Wang H., Bocca S., Anderson S. et al. Sex steroids regulate epithelial-stromal cell cross talk and trophoblast attachment invasion in a three-dimensional human endometrial culture system // *Tissue Eng. Part C. Methods*. 2013. V. 19. № 9. P. 676–687.
- Watkins A.J., Platt D., Papenbrock T. et al. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 13. P. 5449–5454.
- Ye T.M., Pang R.T.K., Leung C.O.N. et al. Development and characterization of an endometrial tissue culture model for study of early implantation events // *Fertil. Steril.* 2012. V. 98. № 6. P. 1581–1589.
- Zhang S., Chen T., Chen N. et al. Implantation initiation of self-assembled embryo-like structures generated using three types of mouse blastocyst-derived stem cells // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1.
- Zheng Y., Xue X., Shao Y. et al. Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells // *Nature*. 2019. V. 573. № 7774. P. 421–425.

Modeling of Early Development of Mouse and Human Embryos *in vitro*

L. Sh. Izmailova^{1,*}, E. A. Vorotelyak¹, and A. V. Vasiliev^{1,2}

¹*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

²*Faculty of Biology, Department of Embryology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234 Russia*

*e-mail: luba.ranaway-94@yandex.ru

Mammalian embryonic development includes preimplantation, implantation and post-implantation development, during which the embryo is attached to the uterus wall. Remodeling of embryo development in culture allows us to study the process of ontogenesis in dynamics, which is especially valuable for studying early post-implantation development. We reviewed existing cultivation systems for mouse and human embryos.

Also we considered a new experimental approach for studying early mammalian embryogenesis – embryo-like cell constructs. Using these methods, the most important results were obtained about embryonic germ layers formation, molecular and cellular mechanisms of morphogenesis of the mouse and human embryos. The purpose of this review is to generalize the possibilities and limitations of such systems for studying mammalian embryogenesis and to find directions for the further development of this approach.

Keywords: embryo cultivation, embryonic development, mouse, human, remodeling of the implantation