

Данные были представлены на конференции молодых ученых
 “Актуальные проблемы биологии развития”
 12–14 октября 2021 г., Москва,
 Институт биологии развития РАН

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДЕФОРМАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНОЗАВИСИМЫХ ДВИЖЕНИЙ КЛЕТОК

© 2022 г. Д. В. Бредов^{a, b, *}, Н. Н. Лучинская^a, И. В. Володяев^a

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра эмбриологии,
 биологический факультет, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119934 Россия

^bИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: d2707bredov@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.09.2021 г.

После доработки 09.09.2021 г.

Принята к публикации 15.11.2021 г.

В основе эмбрионального развития организмов лежат скоординированные коллективные движения клеток. Данные о механочувствительности коллективных движений клеток позволяют предположить, что в нормальном развитии их может регулировать пространственное распределение механических сил, специфичное для каждой стадии развития. Экспериментальные подтверждения этой гипотезы немногочисленны и требуют дальнейших исследований. Одним из ключевых доказательств может стать регистрация траекторий движения клеток в эксплантате ткани, подвергнутом механической деформации, сопоставимой с таковой в нормальном развитии. Для этого необходимо осуществить контролируемую деформацию и последующую цейтраферную съемку образцов с разрешением, достаточным для распознавания отдельных клеток. В нашей работе представлены результаты применения методики деформации эксплантатов эмбриональной ткани на эластичном субстрате с помощью разработанной в нашей лаборатории установки для контролируемой одноосевой деформации. Этот подход позволил зарегистрировать движения индивидуальных клеток в растянутых эксплантатах крыши бластоцеля средней гастролы *X. laevis* и установить пороговые значения скорости и времени деформации, необходимые для инициации движений клеток внутри эксплантата.

Ключевые слова: механические силы, механозависимые движения клеток, развитие, гастрюляция, эмбрион, деформация ткани, *Xenopus laevis*

DOI: 10.31857/S0475145022020045

ВВЕДЕНИЕ

Направленные коллективные движения клеток выполняют ключевую роль в процессах эмбрионального формообразования (Solnica-Krezel, 2005). Физический контакт между мигрирующими клетками важен для поддержания направления миграции (Dumortier et al., 2012). Показано, что при миграции клеточного монослоя физический контакт обеспечивает передачу механической силы от лидирующих клеток вглубь пласта, что приводит к изменению активности сигнальных комплексов, регулирующих поляризованное формирование ламеллоподий (Weber et al., 2012; Das et al., 2015). Эти данные о механочувствительности клеточной миграции позволяют предпо-

ложить, что существующее в эмбриональных тканях стадийспецифическое пространственное распределение механической силы (Belousov et al., 1975) может являться одним из факторов, регулирующих подвижность клеток при коллективных движениях в нормальном развитии. Экспериментальные подтверждения этой гипотезы, на данный момент, немногочисленны и требуют дальнейших исследований (Belousov et al., 2018).

Первые экспериментальные свидетельства участия далекодействующих механических сил в регуляции коллективных движений клеток были продемонстрированы в работе Белоусова и соавторов (Belousov et al., 2000). В этой работе было выполнено многоэтапное растяжение эксплантатов кры-

ши бластоцеля ранней гастролы *X. laevis*, которое вызывало пассивное удлинение клеток вдоль оси деформации образца. В течение часа после окончательного растяжения клетки демонстрировали активную реакцию, постепенно возвращаясь к изодиаметрической форме. Филоподии, характерные для клеток нерастянутых образцов, замещались на ламеллоподии, часть из которых была ориентирована перпендикулярно оси растяжения. Через несколько часов после изменения морфологии клеток изменялась и форма эксплантата как целого. Изначально округлый эксплантат постепенно удлинялся вдоль оси растяжения, у него формировались медиальная борозда или характерные гантелевидные утолщения на концах (Belousov et al., 2000). Аналогичное изменение морфологии клеток предшествует началу медиолатеральной интеркаляции в хордомезодерме *X. laevis*, которая приводит к удлинению последней (Pfister et al., 2016).

Перечисленные факты позволяют предположить, что механическая сила способна инициировать интеркаляцию клеток в эмбриональных тканях. Однако, чтобы однозначно говорить об интеркаляции, необходимо продемонстрировать, что за изменением морфологии следует переупаковка клеток. Для этого нужно проследить траектории движения отдельных клеток в растянутом эксплантате эмбриональной ткани.

Чтобы подойти к выполнению этой цели, необходимо осуществить контролируемую деформацию образцов эмбриональной ткани и последующую цейтраферную съемку растянутых образцов с высоким разрешением. Для этого требуется разработать установку для контролируемой одноосевой деформации, которая позволила бы применить методику растяжения эксплантатов эмбриональной ткани на прозрачном эластичном субстрате (Carpí, Piel, 2014; Goddard et al., 2020) и установить пороговые значения скорости и времени деформации, необходимые для инициации движений клеток внутри эксплантата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и культивирование эмбрионов

Эмбрионы *X. laevis* получали оплодотворением *in vitro* согласно стандартному протоколу (Sive et al., 2000). Через 30–45 мин после оплодотворения удаляли студенистые оболочки, инкубируя эмбрионы в 2% растворе L-цистеина на $0.1 \times$ Marc's Modified Ringer (MMR). После инкубации в цистеине эмбрионы промывали 4–5 раз $0.1 \times$ MMR и культивировали в $0.1 \times$ MMR до необходимой стадии. Стадию развития эмбрионов определяли по таблицам нормального развития (Nieuwkoop, Faber, 1958).

Инъекция РНК

Для визуализации границ клеток осуществляли инъекцию мРНК мембранного (GAP43-GFP) и ядерного (H2B-mCherry) маркеров. мРНК синтезировали с имеющихся в лаборатории плазмид рCS2+/GAP43-GFP и рCS2+/H₂B-mCherry, которые любезно предоставил доктор Dietmar Gradl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe). Выделение целевых плазмид после амплификации осуществляли с помощью набора Plasmid Miniprep (Evrogen), синтез РНК – с помощью набора mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription (Invitrogen), согласно предоставленному производителем протоколу. Оба набора были любезно предоставлены С. В. Кремневым (каф. эмбриологии МГУ им. М.В. Ломоносова).

Эмбрионы на стадиях от 2-х до 4-х бластомеров переносили из $0.1 \times$ MMR в раствор фикола на $0.3 \times$ MMR. Затем осуществляли инъекцию мембранного (РНК GAP43-GFP) и ядерного (РНК H2B-mCherry) маркеров общим количеством 230 пг в случае GAP43-GFP и 230 пг в случае H2B-mCherry. Инъекцию производили в каждый из двух (четырёх) анимальных бластомеров, суммарный объём инъекции составлял 9.2 нл. После инъекции эмбрионы оставляли в растворе фикола на $0.3 \times$ MMR для предотвращения образования протрузий в местах инъекции и культивировали при температуре 14–15°C до достижения зародышами стадии 10–10.5 согласно таблицам нормального развития.

Микрохирургические операции

В ходе микрохирургических операций проводили экстирпацию крышки бластоцеля эмбрионов на стадиях 10–10.5 для экспериментов по искусственной деформации (Nieuwkoop, Faber, 1967). Перед началом операции студенистую оболочку снимали 2.5% раствором цистеина в $1 \times$ MMR, желточную оболочку снимали пинцетами вручную. Затем эмбрионы переносили в чашку Петри, заполненную $1 \times$ MMR, где с помощью микрохирургического ножа и стеклянной палочки экстрипировали выбранную зону. Получившиеся эксплантаты переносили в заранее подготовленные инкубационные камеры (см. раздел “Искусственная деформация эксплантатов”) с помощью пластиковой пипетки.

Искусственная деформация эксплантатов

Для искусственной деформации эксплантаты прикрепляли к эластичному субстрату с помощью адгезионного покрытия из белков внеклеточного матрикса, после чего растягивали субстрат. Адгезионное покрытие обеспечивало передачу растяжения от субстрата к эксплантату. Растяжение субстрата осуществляли с помощью изготовленной на

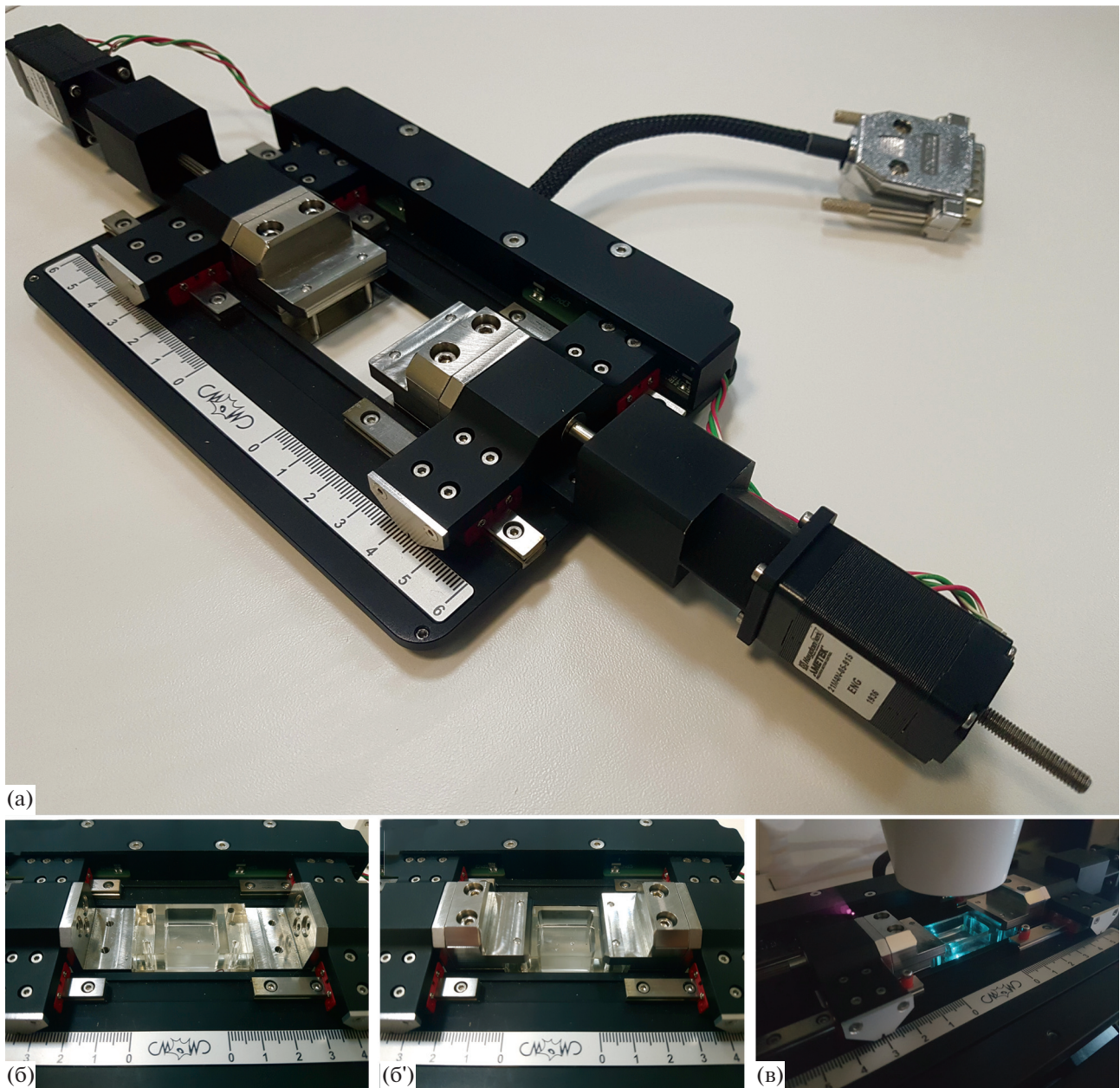


Рис. 1. (а) Общий вид установки для растяжения. (б) Монтаж эластичной инкубационной камеры в зажимы установки для растяжения. (в) Общий вид установки для растяжения, смонтированной на ЛСЖМ.

заказ установки для высокоточного одноосевого растяжения эластичных субстратов для культивирования клеток и эмбриональных тканей (рис. 1а; патент RU2723726С1, ООО “Троицкий инженерный центр”, Россия). Далее в тексте статьи мы будем называть ее “установкой для растяжения”.

В качестве эластичного субстрата использовали дно инкубационной камеры, изготовленной из полидиметилсилоксана (PDMS), которое представляет собой ультратонкую прозрачную мембрану толщиной 100–200 мкм. Использовали два типа камер: самодельные камеры, изготовленные в нашей

лаборатории, с диапазоном растяжения до 85% и коммерческие инкубационные камеры производства STREX (STREX Inc., США) с диапазоном растяжения до 20%.

Для изготовления камер в лаборатории, вырезали фрагмент сверхтонкой эластичной пленки Gel-Pak PF-40-X0 (Gel-Pak, США) с необходимыми геометрическими размерами, снимали защитный слой и с помощью пинцета переносили пленку в пластиковую чашку Петри с 70% этанолом, после чего инкубировали в течение 20 мин на качалке для удаления остатков липкого осно-

вания защитного покрытия. Затем пленку переносили в сухую крышку чашки Петри и сушили под ламинатором. После полного высыхания спирта на пленку устанавливали бортики из PDMS и герметизировали соединение между бортиками и пленкой с помощью силиконовой смазки High Vacuum Grease (Dow Corning, США).

Чтобы обеспечить адгезию эксплантатов ко дну камер, на него наносили адгезионное покрытие из фибронектина человека. Для нанесения адгезионного покрытия как коммерческие, так и самодельные камеры перед экспериментом подвергали предварительной обработке. Для этого дно камеры облучали под УФ-лампой ламинатора на расстоянии 3 см от лампы в течение 30–45 мин, чтобы сделать изначально гидрофобный материал камеры более гидрофильным и увеличить его сродство к фибронектину (Azioune et al., 2011; Goddard et al., 2020). Немедленно после облучения внутрь камеры вносили 1 мл фибронектина человека с концентрацией 1 мг/мл (ООО “Имтек”, Россия) и оставляли инкубироваться на ночь при 4°C (Davidson et al., 2002; Ramos, DeSimone, 1996). На следующий день удаляли остатки раствора фибронектина, заливали в инкубационную камеру 1–2 мл 1× MMR и монтировали ее в установку для растяжения (рис. 1б'–1б"). Перед внесением эксплантатов инкубационную камеру прерастягивали на 0.5 мм, чтобы минимизировать провисание дна.

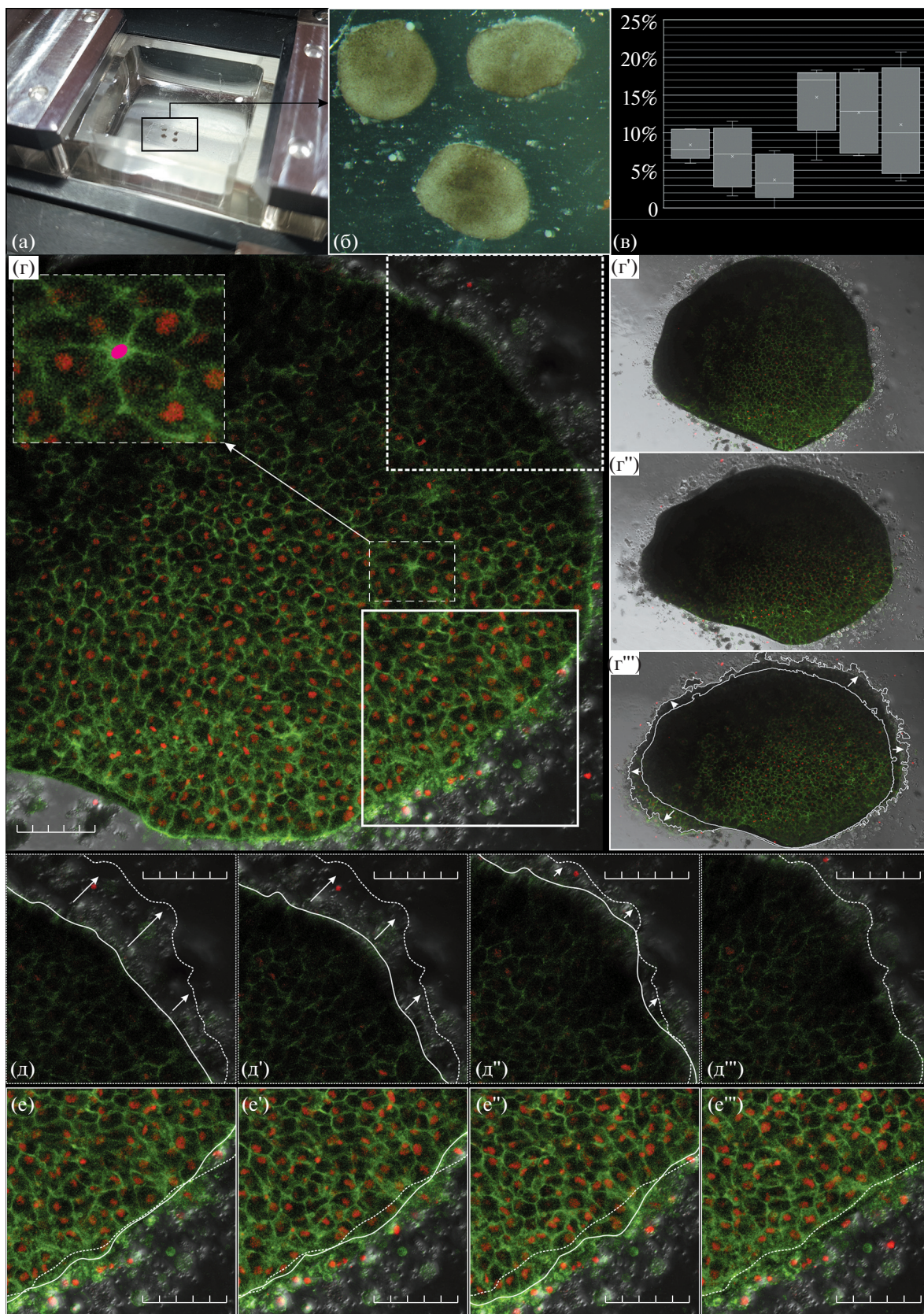
После подготовки инкубационной камеры экспирпировали крышку бластоцеля эмбрионов *X. laevis* на стадии 10–10.5 (см. раздел “Микрохирургические операции”) (Nieuwkoop, Faber, 1958). Эксплантаты крыши помещали в инкубационную камеру гипоектодермой на субстрат, аккуратно прижимали покровным стеклом на силиконовых ножках, после чего инкубировали в течение двух

часов при комнатной температуре для стимуляции адгезии эксплантатов к матриксу. После двух часов инкубации снимали покровное стекло и, в зависимости от задачи, монтировали установку для растяжения с закрепленной в ней инкубационной камерой на предметный столик выбранного микроскопа (рис. 1б").

Для определения эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани, деформацию субстрата и последующую съемку эксплантатов осуществляли на стереомикроскопе Olympus SZX 9 (рис. 2а). Для механической деформации эксплантатов инкубационную камеру растягивали на 20% с шагом 3/8 мкм в течение 10 с (выбор времени растяжения объясняется в разделе “Результаты”). Эксплантаты фотографировали до и после растяжения, после чего измеряли удлинение эксплантата при заданной величине деформации субстрата.

Для регистрации движений клеток после механической деформации эксплантатов эмбриональной ткани, деформацию субстрата и последующую цейтраферную съемку осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Zeiss LSM800 (рис. 2г). Чтобы оценить изменение формы эксплантатов в ходе растяжения, перед искусственной деформацией, эксплантаты фотографировали в проходящем свете на минимальных значениях цифрового увеличения. Одновременно регистрировали сигнал по флуоресцентным каналам, чтобы оценить степень прикрепления эксплантата по морфологии клеток его на периферии (рис. 2г'–2г"). Если клетки данной области демонстрировали характерную для клеток эпидермы эпителиальную морфологию, отличную от мезенхимальной морфологии клеток гипоектодермы, то это свидетельствовало о подворачивании краев эксплантата, и, следова-

Рис. 2. (а) Инкубационная камера с эксплантатами крыши бластоцеля во время двухчасовой инкубации. (б) Общий вид эксплантатов крыши бластоцеля после двухчасовой инкубации на эластичном субстрате. (в) Определение эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани. По оси ординат: удлинение эксплантата вдоль оси растяжения в %. Каждый блок диаграммы размаха соответствует группе из 4–6 эксплантатов, крестик – среднее удлинение в группе, линия – эксклюзивная медиана. Средняя эффективность удлинения составила $54.7 \pm 26.5\%$. (г) Кадр цейтраферной съемки эксплантата крыши бластоцеля после растяжения. Фрагмент, выделенный рамкой “пунктир с точкой” – клеточная розетка (центр розетки обозначен розовой точкой), фрагмент, выделенный пунктирной рамкой – участок границы эксплантата, представленный на $d-d''$, фрагмент, выделенный сплошной рамкой – участок границы эксплантата, представленный на $e-e'''$. Длина мерного отрезка 100 мкм ($g-g''$) – фотографии эксплантата крыши бластоцеля перед растяжением (g'), после растяжения (g'') и по окончании часовой цейтраферной съемки (g'''); белый контур: границы эксплантата в начале и в конце съемки, стрелки – направление смещения границы). (д, е) Региональные различия в активности направленного движения клеток. За время цейтраферной съемки граница эксплантата, ориентированная перпендикулярно направлению растяжения сместилась на расстояние от 35 до 60 мкм ($d-d''$), в то время как границы, ориентированные параллельно направлению растяжения (фрагмент, выделенный сплошной рамкой) практически не сместились ($e-e'''$). ($d-d''$) Изменение положения границы эксплантата, ориентированной перпендикулярно направлению растяжения: (д) – положение границы сразу после 13–14% растяжения эксплантата, (д') – через 19 мин после окончания растяжения, (д'') – через 39 мин после окончания растяжения, (д''') – через 59 мин после окончания растяжения; сплошная линия – текущее положение границы эксплантата, пунктирная линия – положение границы эксплантата в конце съемки, стрелки – направление движения границы эксплантата. ($e-e'''$) Изменение положения границы эксплантата, ориентированной параллельно направлению растяжения: (е) – положение границы сразу после 13–14% растяжения эксплантата, (е') – через 19 мин после окончания растяжения, (е'') – через 39 мин после окончания растяжения, (е''') – через 59 мин после окончания растяжения; обозначения те же, что и в (д). Длина мерного отрезка на (д) и (е) 100 мкм.



тельно, о низкой эффективности прикрепления. Такие эксплантаты исключались из эксперимента. Механической деформации подвергали только эксплантаты, прикрепившиеся к субстрату всей поверхностью. Для механической деформации эксплантатов инкубационную камеру растягивали на 20% с шагом 3/8 мкм в течение 10 мин (выбор времени растяжения объясняется в разделе “Результаты”). По завершении растяжения эксплантат фотографировали в проходящем свете на минимальных значениях цифрового увеличения, после чего переключались на большее значение цифрового увеличения и приступали к съемке движений клеток.

Регистрация движений клеток

Съемку производили с помощью объектива Plan-Apochromat 10×/0.45 M27 (цифровое увеличение ×1.1) в течение часа с частотой 1 кадр в 2 мин. Каждый кадр состоял из 19 оптических срезов. Регистрацию оптических срезов начинали с позиции по оси Z, на которой наблюдали появление флуоресцентного сигнала. По окончании съемки оптические срезы сводили в единое изображение с помощью алгоритма “Maximum intensity projection” программного комплекса ZEISS ZEN (black edition). В тексте статьи под формой клетки мы будем понимать форму сечения клетки, зарегистрированную на таком изображении.

Морфометрия эксплантатов

Измерение линейных размеров эксплантатов для определения эффективности растяжения осуществляли с помощью программы ICY bioimaging platform. Форму эксплантатов определяли с помощью модуля “Active contours (4.4.10.0)”, при необходимости результаты распознавания корректировали вручную. Обсчет полученных значений осуществляли в программе Microsoft Excel 365.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани

Перед началом эксперимента мы оценили эффективность методики растяжения на 6 тестовых группах эксплантатов. Эффективность растяжения эксплантатов ткани рассчитывали как частное среднего удлинения в группе из 4–6 эксплантатов и удлинения самой инкубационной камеры (рис. 2в). Амплитуда растяжения камеры для всех групп была одинакова и составляла 20% при времени растяжения 10 с. Такое малое время растяжения позволяет достичь наибольшей скорости деформации и, т.о., обеспечивает наилучшую проверку степени адгезии эксплантата ко дну камеры.

При выбранных концентрации фибронектина и протоколе его нанесения растяжение субстрата передается на эксплантаты с эффективностью $54.7 \pm 26.5\%$, что, в целом, согласуется с описанными в литературе данными (от 56 до $77.2 \pm 20.4\%$ (Nestor-Bergmann et al., 2019; Wang et al., 2001)).

Анализ пространственно-временной динамики движений клеток

В экспериментальной группе, включающей 4 эксплантата, нам удалось добиться 64% эффективности растяжения, т.е. преимущественно 13–14% удлинения эксплантатов при 20% равномерном растяжении субстрата в течении 10 минут. Такое значение скорости деформации эксплантатов было выбрано на основании данных, полученных в нашей лаборатории на интактных эмбрионах. В этих экспериментах деформация супрабластопоральной области средней гастролы *X. laevis* достигала 72% от изначальной длины в час (Evstifeeva et al., 2018).

По окончании растяжения эксплантат оставляли в растянутом состоянии и осуществляли съемку движений клеток в течение часа. За время съемки эксплантат преимущественно удлинился вдоль оси растяжения (рис. 2г^{'''}). в то время как изолированный эксплантат увеличивает свою площадь одинаково во всех направлениях вследствие движений радиальной интеркаляции (Stepien et al., 2018). Изменение формы эксплантата происходило за счет движений клеток. В данном случае, под движениями мы понимаем как перегруппировки клеток (смещение клетки внутри пласта, приводящее к изменению ее положения относительно соседних), так и направленную коллективную миграцию (продолжительное перемещение в выделенном направлении, не обязательно связанное со сменой соседей).

Перегруппировки клеток превалировали в центральной части всех исследованных эксплантатов. Основным механизмом перегруппировки являлось формирование клеточных розеток (рис. 2г, увеличенный фрагмент, выделенный рамкой “пунктир с точкой”, центр розетки обозначен розовой точкой). При этом частота перегруппировок была достаточно низкой: за час наблюдения нам удалось зарегистрировать формирование и начало распада 2–3 розеток, в то время как в нормальном развитии количество возникающих розеток за то же время наблюдения достигает 9.

Гораздо больший вклад в изменение формы эксплантата вносила направленная миграция клеток в периферической зоне. Периферические 4–5 рядов клеток эксплантата осуществляли миграцию в радиальном направлении, т.е. вдоль оси, соединяющей центр эксплантата с периферией (рис. 2г^{'''}, стрелки). При этом, наиболее

активно процесс миграции протекал в области границ эксплантата, ориентированных перпендикулярно направлению растяжения. Участок такой границы выделен на рис. 2г пунктирной рамкой. Миграция клеток, расположенных вдоль этих границ, привела к их смещению примерно на 35–60 мкм вдоль оси растяжения (рис. 2д–2д'''; граница эксплантата в конце съемки показана пунктирной линией). Клетки, расположенные вдоль границ эксплантата, параллельных направлению растяжения, также демонстрировали подвижность, однако мигрирующий край смещался относительно изначального положения не более чем на 10 мкм (рис. 2г, фрагмент, выделенный сплошной рамкой; рис. 2е–2е'''). Таким образом, миграция клеток и смещение границы эксплантата преимущественно происходила в направлении растяжения эксплантата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлены результаты применения методики деформации эксплантатов эмбриональной ткани с помощью установки для контролируемой одноосевой деформации эластичных субстратов. Нами были зарегистрированы траектории движения индивидуальных клеток в растянутых эксплантатах крыши бластоцеля средней гастролы *X. laevis*. Были установлены пороговые значения скорости и времени деформации, необходимые для инициации движений клеток внутри эксплантата, приводящей к изменению его формы. Таким образом, мы создали необходимые методические предпосылки для возможности экспериментального доказательства роли эндогенных механических сил в регуляции направленных коллективных движений клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доктору Dietmar Gradl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe) за любезно предоставленные плазмиды GAP43-GFP и H2B-mCherry, содержащие целевые последовательности флуоресцентных маркеров клеточных мембран и ядер соответственно, С.В. Кремневу за неоценимую помощь при синтезе РНК флуоресцентных маркеров, М.М. Мойсеновичу за помощь в реализации проекта установки для растяжения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 19-34-90191 и № 20-01-00329 и Государственного задания ИБР им Н.К. Кольцова РАН (тема 0088-2021-0009). Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.В. Бредов разработал концепцию статьи.
И.В. Володяев, Н.Н. Лучинская и Д.В. Бредов спланировали эксперимент.
Н.Н. Лучинская осуществляла получение эмбрионов и микроинъекцию флуоресцентных маркеров.
Д.В. Бредов осуществлял эксперименты по растяжению и прижизненную цейтраферную съемку эмбрионов.
Д.В. Бредов и Н.Н. Лучинская осуществляли анализ данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Azioune A. et al.* Robust method for high-throughput surface patterning of deformable substrates // *Langmuir*. 2011. V. 27. № 12. P. 7349–7352.
- Belousov L.V. et al.* Local and global dynamics in collective movements of embryonic cells // *BioSystems*. 2018. V. 173. P. 36–51.
- Belousov L.V. et al.* Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1975. V. 34. № 3. P. 559–574.
- Belousov L.V. et al.* Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // *Dev. Genes Evol.* 2000. V. 210. № 2. P. 92–104.
- Carpí N., Piel M.* Stretching micropatterned cells on a PDMS membrane // *J. Vis. Exp.* 2014. № 83. P. 1–6.
- Das T. et al.* A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. № 3. P. 276–287.
- Davidson L.A. et al.* Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: Combined roles for integrin $\alpha 5\beta 1$, fibronectin, and tissue geometry // *Dev. Biol.* 2002. V. 242. № 2. P. 109–129.
- Dumortier J.G. et al.* Collective mesendoderm migration relies on an intrinsic directionality signal transmitted through cell contacts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 42. P. 16945–16950.
- Evstifeeva A.Y. et al.* Stress-generating tissue deformations in *Xenopus* embryos: Long-range gradients and local cell displacements // *BioSystems*. 2018. V. 173. P. 52–64.
- Goddard G.K. et al.* Applying tensile and compressive force to *Xenopus* animal cap tissue // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2020. V. 2020. № 3. P. 68–74.
- Nestor-Bergmann A. et al.* Decoupling the roles of cell shape and mechanical stress in orienting and cueing epithelial mitosis // *Cell Rep.* 2019. V. 26. № 8. P. 2088–2100.e4.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin) // *Copeia*. 1958. V. 1958. № 1. P. 65.
- Pfister K. et al.* Molecular model for force production and transmission during vertebrate gastrulation // *Dev.* 2016. V. 143. № 4. P. 715–727.

- Ramos J.W., DeSimone D.W. Xenopus embryonic cell adhesion to fibronectin: Position-specific activation of RGD/synergy site-dependent migratory behavior at gastrulation // *J. Cell Biol.* 1996. V. 134. № 1. P. 227–240.
- Sive H.L. et al. Early development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual.: CSHL Press, 2000. P. 249–297.
- Solnica-Krezel L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. № 6. P. 213–228.
- Stepien T.L. et al. Using a continuum model to decipher the mechanics of embryonic tissue spreading from time-lapse image sequences: An approximate Bayesian computation approach // *PLoS One.* 2018. V. 14. № 6. P. 1–23.
- Wang J.H.C. et al. Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching // *J. Biomech.* 2001. V. 34. № 12. P. 1563–1572.
- Weber G.F. et al. A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration // *Dev. Cell.* 2012. V. 22. № 1. P. 104–115.

Establishment a Method for Controllable Deformatio of Embryonic Tissues to Study Mechanodependent Cell Movements

D. V. Bredov^{1, 2, *}, N. N. Luchinskaya¹, and I. V. Volodyaev¹

¹ Department of Embryology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/12, Moscow, 119334 Russia

² Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: d2707bredov@yandex.ru

Embryonic development in animals is underlied by coordinated collective cell movements. Mechanosensitivity of collective cell movements suggests that in the intact embryos they may be regulated by mechanical force pattern specific to each developmental stage. Experimental validation of this hypothesis requires further investigations. The key piece of evidence would be tracing of cell trajectories in a tissue explant subjected to mechanical deformation comparable to that in normal development. This requires controlled stretching and subsequent time-lapse imaging of the explant at a resolution sufficient to identify individual cells. We performed stretching of embryonic tissue explants on an elastic substrate using the device for controlled uniaxial deformation developed in our laboratory. This allowed us to register the movements of individual cells in the stretched explants of *X. laevis* midgastrula blastocell roof, and to establish the threshold values of rate and time of stretching required for the initiation of cell movements within the explant.

Keywords: mechanical forces, mechanodependent cell movements, development, embryo, tussie deformation *Xenopus laevis*