

УДК 611-013;57.086.835;577.218

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭТОПОЗИДА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛ, СФОРМИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ МЫШИ¹

© 2013 г. О. Ф. Гордеева

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.07.13 г.

Окончательный вариант получен 10.07.13 г.

Начальные стадии *in vitro* дифференцировки эмбриональных стволовых клеток рассматривают в качестве уникальных трехмерных моделей раннего развития млекопитающих для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований. Ранее было показано (Гордеева, 2012), что оценка эмбриотоксичности на модели недифференцированных эмбриональных стволовых клеток может быть недостаточно точной при прогнозировании токсических воздействий на эмбрионы млекопитающих, поэтому мы провели сравнительное изучение повреждающих эффектов на примере цитостатика этопозид в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках и эмбрионидных телах разных стадий дифференцировки, которые имеют сходные трехмерные структуры с ранними эмбрионами. Анализ роста, клеточной гибели и динамики дифференцировки недифференцированных эмбриональных стволовых клеток и эмбрионидных тел, подвергшихся воздействию этопозид, показал, что цитостатические и цитотоксические эффекты этопозид являются специфическими. Максимальные повреждающие эффекты этопозид выявлены в недифференцированных эмбриональных стволовых клетках, а в процессе роста и дифференцировки эмбрионидных тел степень его цитотоксичности снижается. Мы предполагаем, что увеличение клеточного объема эмбрионидных тел и развитие гипертрофированного слоя внезародышевой энтодермы приводят к снижению диффузии, транспорта и метаболизма химических и биологически активных веществ и препятствуют действию повреждающих факторов.

Ключевые слова: эмбрионидные тела, эмбриональные стволовые клетки, этопозид, цитостатики, цитотоксичность, эмбриотоксичность дифференцировка.

DOI: 10.7868/S0475145013060037

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) млекопитающих представляют собой уникальную *in vitro* модель раннего развития млекопитающих для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований. В исследованиях механизмов раннего развития млекопитающих с использованием модели *in vitro* дифференцировки ЭСК важную роль играет экспериментальное трехмерное (3D) воспроизведение межклеточных взаимодействий в эмбриональных клеточных субпопуляциях, т.к. 3D-модели наиболее адекватно отражают процессы, протекающие в биологических объектах (Yamada et al., 2007).

На ранних стадиях дифференцировки ЭСК формируют клеточные сфероиды – эмбрионидные тела (ЭТ), которые являются аналогами эмбрионов

на предгастрюляционных стадиях развития. Несмотря на отсутствие трофобласта в ЭТ, 3D-структуры ЭТ начальных стадий дифференцировки имеют значительное сходство с 3D-структурами эмбрионов на стадиях морулы, бластоцисты и раннего яйцевого цилиндра. В процессе дифференцировки ЭТ происходит реорганизация их 3D-структуры: формируется внешний слой внезародышевой энтодермы и внутренний слой эпибласт-подобных клеток, в котором дифференцируются клетки-предшественники трех зародышевых листков (Ducibella et al., 1975; Gardner, 1982; Гордеева и др., 2002). В дифференцирующемся “двухслойном” ЭТ изменяются взаимодействия между соседними клетками и клетками разных слоев, что оказывает влияние на межклеточный транспорт сигнальных белков и низкомолекулярных веществ (Sachlos et al., 2008; Van Winkle et al., 2012). В связи с этим в исследованиях молекуляр-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а).

ных механизмов, регулирующих процессы специализации клеток-предшественников трех зародышевых листков и внезародышевых структур, а также при изучении фармакологических и токсикологических эффектов различных химических веществ и лекарственных препаратов необходимо учитывать изменения 3D-структуры и межклеточных коммуникаций в ЭТ в процессе дифференцировки.

В исследованиях влияния цитостатиков на плюрипотентные клетки и бластоцисты мыши было установлено, что цитостатики разных групп вызывали сильный цитотоксический эффект в недифференцированных ЭСК и клетках внутренней клеточной массы бластоцист, тогда как дифференцирующиеся ЭСК и клетки трофобласта бластоцист были менее чувствительны к повреждающим эффектам (Гордеева, 2012). Кроме того, бластоцисты с интактной 3D-структурой продолжали нормальное развитие в течение 48 ч после воздействия цитостатиков. Эти данные свидетельствуют о том, что 3D-структура ранних эмбрионов и различная чувствительность клеток разных эмбриональных популяций к химическим веществам являются ключевыми элементами защиты эмбрионов от повреждающих факторов. В связи с полученными результатами возник вопрос о формировании защитных механизмов от повреждающих факторов в аналогах ранних эмбрионов – ЭТ разных стадий дифференцировки. Поэтому целью данной работы являлось исследование эффектов биологически активных веществ в ЭТ разных стадий дифференцировки с различной 3D-структурой на примере изучения прямых и отсроченных повреждающих эффектов цитостатика этопозида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование ЭСК *in vitro*. В работе были использованы ЭСК мыши линии R1, ранее любезно предоставленные доктором А. Макларен (A. McLaren, WTCR Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge, UK). Для поддержания в недифференцированном состоянии ЭСК мыши культивировали в среде DMEM, содержащей 2 mM L-глутамин, 0.1 mM заменимых аминокислот, 0.1 mM β-меркаптоэтанола и 15% телячьей фетальной сыворотки (“HyClone”, США). Недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши поддерживали на фидере из первичных эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ), инактивированных митомицином C (10 мкг/мл) (“Sigma”, США), как описано ранее (Гордеева и др., 2009). В ходе экспериментов ЭСК мыши культивировали в бесфидерной системе, в среде с фактором ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF, 10 нг/мл) (“Sigma”, США).

Получение эмбрионидных тел. Для получения стандартных ЭТ использовали метод “висячей капли”. Для формирования сфероидов на крышку чашки Петри помещали капли среды, содержащие 300 клеток. Для формирования и культивирования ЭТ использовали среду для поддержания ЭСК мыши без добавления LIF. Сформированные в течение трех суток культивирования ЭТ собирали из капель, переносили в планшеты с низкоадгезивной поверхностью для дальнейшего культивирования и дифференцировки в течение 10 дней. На 1, 5 и 10 дни культивирования ЭТ (ЭТ1, ЭТ5 и ЭТ10) переносили в новые планшеты и подвергали воздействию этопозида (“Sigma”, США).

Изучение эффектов этопозида в ЭСК и ЭТ. Для изучения цитостатических и эмбриотоксических эффектов этопозида в ЭСК и ЭТ разных стадий развития были выбраны две активные дозы 1 и 10 μM на основании данных литературы из базы данных TOXNET, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) и наших предыдущих исследований (Гордеева, 2012). Все эксперименты проводили в трех сериях.

Недифференцированные ЭСК, ЭТ1, ЭТ5 и ЭТ10 ($n = 30$) культивировали в течение 24 ч в среде, содержащей 1 и 10 μM этопозида. После завершения экспериментов подсчитывали число выживших ЭСК и измеряли диаметры ЭТ в контрольных и опытных группах для определения их объемов.

Для изучения отсроченных эффектов этопозида ЭСК и ЭТ разных стадий развития, подвергшиеся воздействию этопозида, отмывали средой DMEM трижды и культивировали в течение последующих 72 ч в среде без этопозида (24 + 72 ч). По завершении экспериментов подсчитывали число выживших ЭСК и измеряли диаметры ЭТ.

Для оценки эффектов этопозида в сфероидах вычисляли изменения объемов ЭТ в опытных группах по отношению к соответствующей контрольной группе. Статистический анализ размеров ЭТ проводили с использованием ANOVA и парного критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $p < 0.001$.

Анализ клеточной гибели в ЭТ. Ранние и поздние стадии клеточной гибели исследовали в ЭТ разных стадий развития в контрольных и экспериментальных группах, используя набор для выявления апоптотических и некротических клеток Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor 488 and Propidium Iodide for Flow Cytometry (“Molecular Probes”, США). Клетки на ранних стадиях апоптоза выявляли с помощью данного набора, используя реакцию связывания фосфатидилсерина в мембранах апоптотических клеток с ре-

комбинантным аннексином V, конъюгированным с флуорохромом Alexa Fluor 488. Клетки на поздних стадиях апоптоза и некроза выявляли при окраске йодидом пропидия. Живые клетки не окрашиваются этими компонентами набора. ЭТ инкубировали в растворе аннексина V и йодида пропидиума в течение 15 мин, следуя протоколу производителя. После окраски ЭТ помещали в 18-луночные планшеты со стеклянными лунками (Ibidi, Германия) и сразу анализировали на конфокальном микроскопе Leica TSC SP5 1 ("Leica Microsystems GmbH", Германия).

Иммуногистохимический анализ. Экспрессию транскрипционных факторов Oct4 и Gata4 в ЭТ выявляли с помощью иммунофлуоресцентного анализа по методике, описанной ранее (Гордеева и др., 2009). Для выявления экспрессии белков Oct4 и Gata4 использовали антитела к этим белкам в разведениях 1 : 100 ("Santa Cruz Biotechnology", США). В качестве вторичных антител использовали антитела цыпленка против кроличьих иммуноглобулинов кролика и козы, конъюгированные флуорохромами Alexa 594 и Alexa 488, в разведении 1:900 ("Molecular Probes", США). После просветления в глицерине ЭТ сканировали на конфокальном микроскопе Leica TSC SP5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ клеточного роста в ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки, подвергшихся воздействию этопозида. Исследование цитостатических и цитотоксических эффектов этопозида в ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки выявило существенные различия в чувствительности к цитостатику между ЭСК и ЭТ, а также между ЭТ разных стадий развития. (рис. 1 и 2). Так, после 24 ч воздействия 1 и 10 μM этопозида выживали лишь 10.25 \pm 1.0% и 0.92 \pm 0.38% ЭСК от контроля соответственно и 9.61 \pm 0.89% и 0.89 \pm 0.19% сохраняли жизнеспособность через 72 ч после отмены этопозида. Причем эффекты этопозида были необратимыми, т.к. выжившие клетки прекращали пролиферировать.

В то же время, после 24 ч воздействия этопозида рост ЭТ замедлялся, однако большинство клеток сохраняли жизнеспособность (рис. 1–3). Анализ роста ЭТ показал, что размеры диаметров ЭТ, подвергшихся воздействию этопозида, были статистически достоверно меньше для ЭТ1 и ЭТ5, однако эти изменения были не столь значительными, как в недифференцированных ЭСК. С другой стороны, анализ изменений объемов ЭТ показал, что клеточные потери в ЭТ1 и ЭТ5 составляли 30–50% клеточной массы по сравнению с контролем, а в ЭТ10 – 5–30%.

Однако наибольшие повреждающие эффекты цитостатика в ЭТ были обнаружены через 72 ч куль-

тивирования после отмены этопозида. Так, объемы ЭТ1, подвергшихся воздействию 1 и 10 μM этопозида, составляли только 10.00 \pm 0.30% и 4.90 \pm 0.15% от контроля, ЭТ5 – 28.10 \pm 0.85% и 16.15 \pm 0.64%, а ЭТ10 – 81.75 \pm 1.91% и 30.75 \pm 0.92% соответственно (рис. 2а). Необходимо отметить, что в отличие от ЭСК, все ЭТ, подвергшиеся действию этопозида, за исключением группы ЭТ1 + 10 μM этопозида, были способны восстанавливать свой рост через 7 дней после отмены цитостатика (данные не представлены). Таким образом, анализ роста показал, что цитостатический эффект этопозида наиболее выражен в ЭСК и наименее в ЭТ10.

Анализ клеточной гибели в ЭТ разных стадий дифференцировки, подвергшихся воздействию этопозида. Анализ клеточной гибели в ЭТ показал, что цитотоксические эффекты этопозида являются дозозависимыми (рис. 3). В ЭТ, подвергшихся воздействию этопозида, число клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза (аннексин V- и пропидий-позитивных), было существенно больше, чем в контроле. Наибольшее число погибших клеток было выявлено в ЭТ1 и ЭТ5, в особенности через 72 ч после отмены этопозида (ЭТ1, ЭТ5 24 + 72 ч). В то же время доля погибших клеток в ЭТ10 в контрольных и опытных группах различалась незначительно. Учитывая значительное уменьшение объема ЭТ10 через 72 ч после воздействия 10 μM этопозида, можно предположить, что погибающие клетки быстро слущивались с поверхности ЭТ, поэтому их доля была невелика.

Эффекты этопозида на динамику дифференцировки ЭТ, подвергшихся воздействию этопозида. Для изучения эффектов этопозида на процессы дифференцировки был проведен иммуногистохимический анализ экспрессии транскрипционных факторов Oct4 и Gata4, являющихся специфическими факторами для плюрипотентных клеток и клеток внезародышевой энтодермы соответственно (рис. 4). Было обнаружено, что цитотоксические и цитостатические эффекты этопозида имели опосредованное влияние и на процессы дифференцировки. В ЭТ1, подвергшихся воздействию этопозида, экспрессия Oct4 снижалась в большом числе клеток через 24 ч после воздействия и максимально через 72 ч после отмены. Причем в клетках ЭТ1, подвергшихся воздействию 10 μM этопозида, экспрессия Oct4 полностью прекращалась, а Gata4 не экспрессировался, что указывает на массовую гибель и плюрипотентных, и дифференцированных клеток. В ЭТ5 и ЭТ10 эти эффекты этопозида значительно снижались, даже при дозе 10 μM . Экспрессия Oct4 сохранялась в большинстве клеток ЭТ5 и ЭТ10. Однако динамика дифференцировки ЭТ5 и ЭТ10 изменялась, т.к. экспрессия фактора Gata4 была выявлена в меньшем числе клеток по сравнению

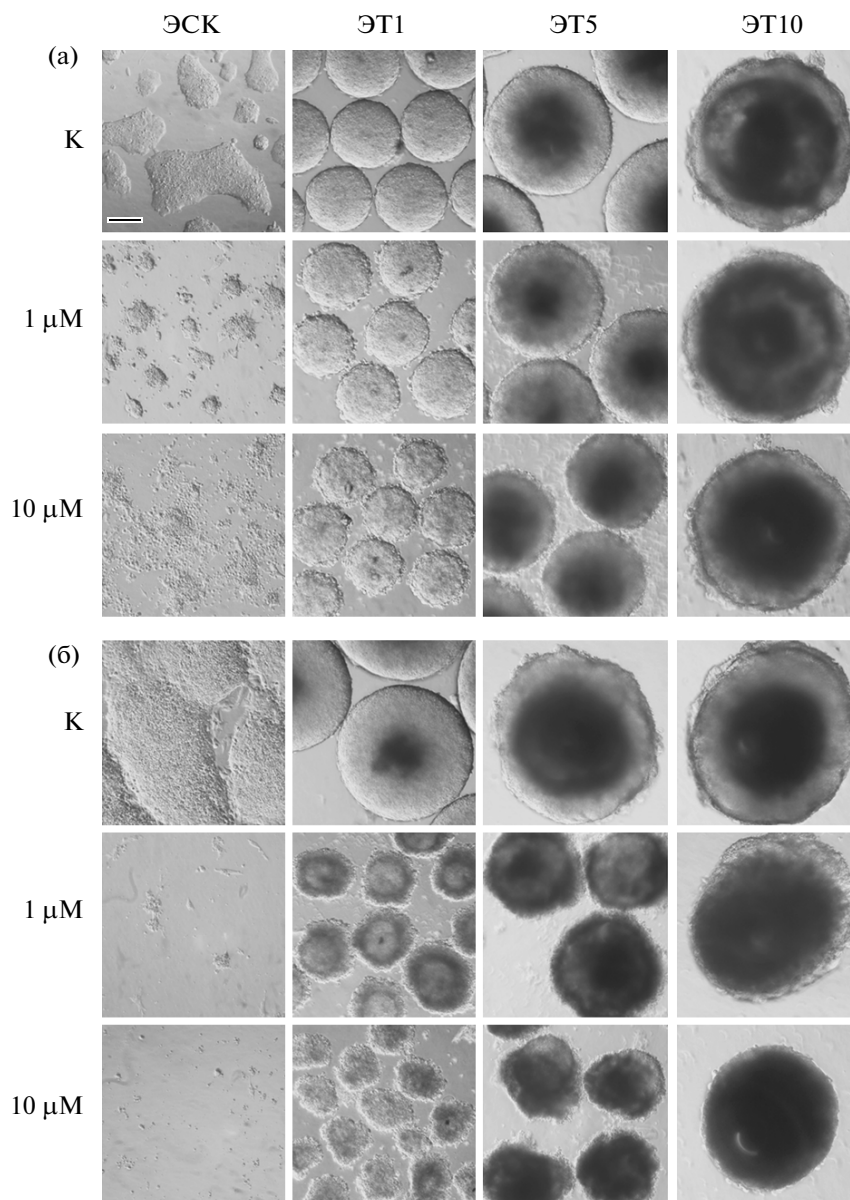


Рис. 1. Морфология ЭСК и ЭТ разных стадий развития после воздействия этопозиды. а – через 24 ч после воздействия; б – через 72 ч после отмены этопозиды (24 + 72 ч). Масштаб: 100 мкм.

с контролем (рис. 4; белые клетки на поверхности ЭТ5 и ЭТ10).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что цитостатические и цитотоксические эффекты этопозиды в недифференцированных ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки являются дозозависимым и стадиейспецифическими. В недифференцированных ЭСК, поддерживаемых в монослойной культуре, эти эффекты были максимальными и необратимыми. В то же время наибольшие эффекты в ингибировании роста и дифференцировки были выявлены в ранних ЭТ1 и

они постепенно снижались по мере роста и дифференцировки ЭТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Активно делящиеся клетки в ранних эмбрионах имеют высокую чувствительность к химическим и физическим повреждающим факторам. Степень повреждения эмбрионов при воздействии химических веществ зависит от многих факторов: степени токсичности веществ, дозы и времени воздействия, а также стадии развития и чувствительности разных эмбриональных клеток к этому веществу. При создании эффективных

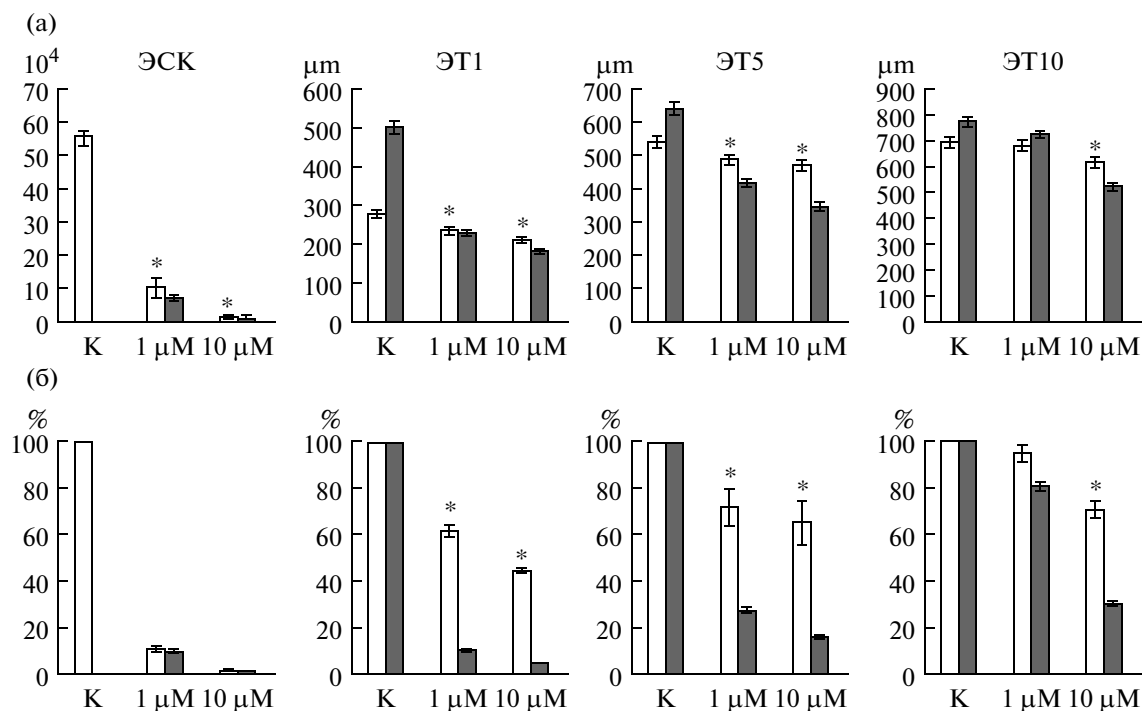


Рис. 2. Анализ роста ЭСК и ЭТ разных стадий развития после воздействия этопозида. Представлены данные по абсолютному числу ЭСК ($\times 10^4$) и диаметрам ЭТ, μm (а), а также изменению числа клеток и объемов ЭТ в процентах от соответствующих контрольных групп (б) через 24 ч после воздействия этопозида (светлый столбец) и через 72 ч после отмены этопозида (темный столбец). Обозначения: К – контроль; 1 и 10 μM – этопозид в соответствующих концентрациях; * – различия достоверны при $p < 0.001$. Различия достоверны при $p < 0.001$ для всех групп по сравнению с контрольной через 72 ч после отмены этопозида.

тест-систем на основе линий ЭСК животных и человека для изучения эмбриотоксичности химических веществ и новых лекарств необходимы исследования, направленные на сопоставление эмбриотоксических эффектов в *in vitro* клеточных моделях и ранних эмбрионах (Seiler et al., 2011).

Как было обнаружено ранее, цитотоксические эффекты в ЭСК и клетках внутренней клеточной массы бластоцисты были одинаковыми (Гордеева, 2012). Однако эффекты цитостатиков в тотальных бластоцистах и ЭСК различались, т.е. бластоцисты мыши с интактной 3D-структурой были более устойчивыми, чем ЭСК. Эти эксперименты показали, что оценка эмбриотоксичности на модели недифференцированных ЭСК недостаточна для точного прогноза токсичности в эмбрионах млекопитающих. В связи с этим в представленной работе мы провели сравнительное изучение повреждающих эффектов цитостатика этопозида в недифференцированных ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки.

Цитостатические препараты, применяемые в клинической практике для лечения онкологических заболеваний, обладают высокой эмбриотоксичностью и тератогенностью. Этопозид, являющийся ингибитором топоизомеразы II, способен

ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз (Arriola et al., 1999). Он также обладает высокой эмбриотоксичностью и тератогенностью (Nagao et al., 1999; Palo et al., 2005; Mooney et al., 2006; Grandela et al., 2007; Nam et al., 2010; Bueno et al., 2011). На основании полученных нами данных можно заключить, что цитостатические и цитотоксические эффекты этопозида в недифференцированных ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки являются дозозависимым и стадиейспецифическими. Максимальные повреждающие эффекты этопозида выявлены в недифференцированных ЭСК, тогда как его цитотоксичность снижалась в процессе дифференцировки ЭТ.

Различную токсичность этопозида в ЭСК и ЭТ разных стадий дифференцировки можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, в отличие от ЭСК ЭТ являются 3D объектами, а процессы диффузии и транспорта веществ из внешней среды в 2D и 3D клеточных моделях значительно различаются (Casciari et al., 1992; Van Winkle et al., 2012). Скорость диффузии и метаболизма веществ в ЭТ изменяется по мере их роста и дифференцировки, поэтому более крупные ЭТ5 и ЭТ10 были более устойчивыми к по-

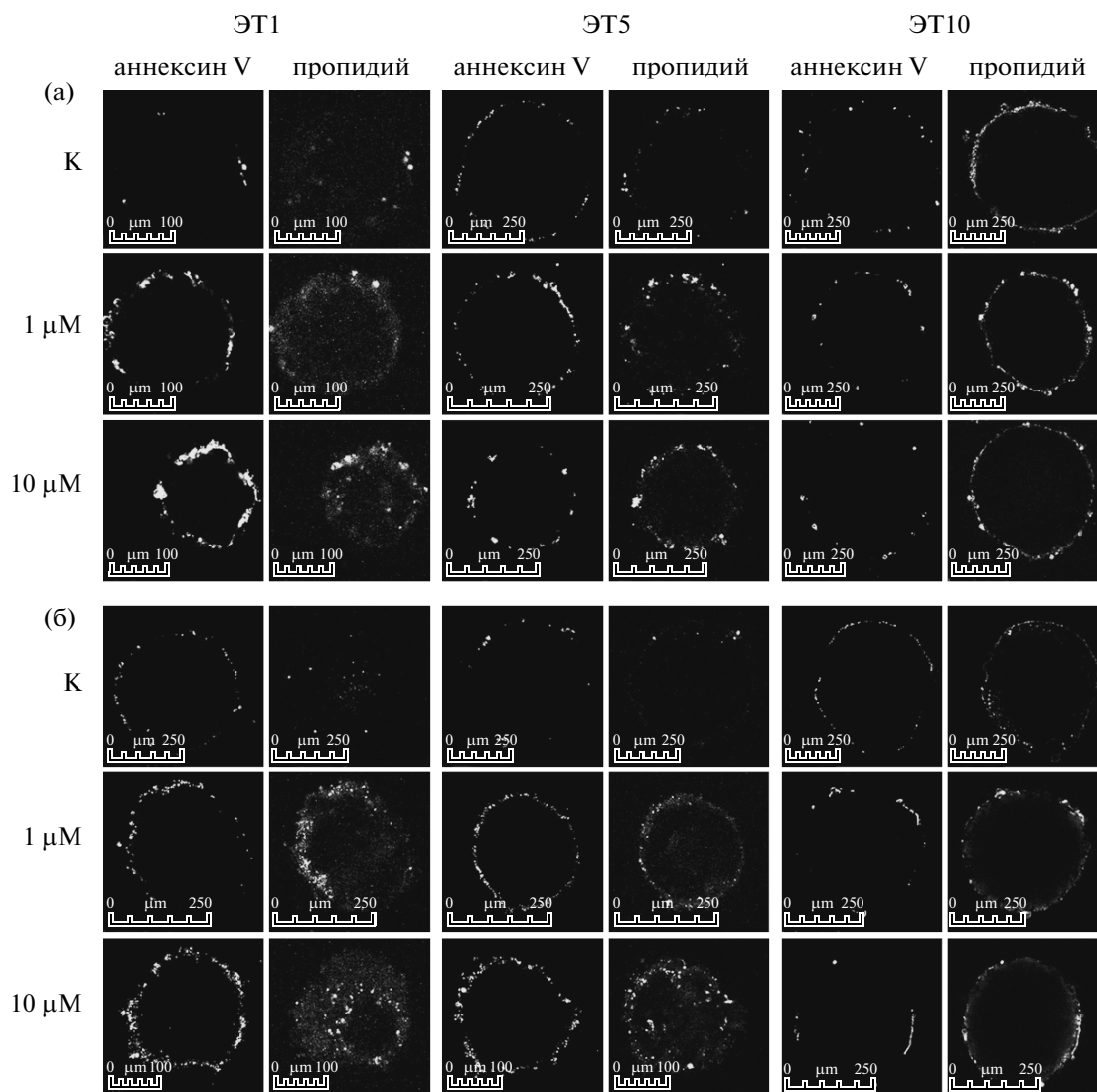


Рис. 3. Анализ клеточной гибели в ЭТ разных стадий развития после 24 ч воздействия этопозиды (а) и через 72 ч после его отмены (б).

вреждающим эффектам этопозиды, чем ранние ЭТ1. Клетки центральных слоев ЭТ выживали лучше и были способны к восстановлению роста и дифференцировки после отмены цитостатика. Различия в скорости диффузии биологически активных веществ в разных клеточных слоях ЭТ, вероятно, обуславливают и различную направленность и эффективность их дифференцировки в различные типы эмбриональных клеток (Bauwens et al., 2008; Messana et al., 2008; Mohr et al., 2010; Valamehr et al., 2008). Собственно трехмерность ЭТ, как и эмбрионов, обеспечивает концентрационный градиент веществ, который способствует продвижению развития и защите клеток от повреждающих факторов.

Во-вторых, в процессе дифференцировки ЭТ на поверхности сфероидов формировался и развивался слой внезародышевой энтодермы, которая является не только продуцентом сигнальных факторов, но и ограничивает поступление веществ из внешней среды, т.к. формирует плотные контакты между клетками (Гордеева и др., 2002). Поэтому наименьший повреждающий эффект этопозиды был выявлен в ЭТ10 с развитой внезародышевой энтодермой. Эта внезародышевая структура гипертрофирована в ЭТ10 по сравнению с таковой в раннем эмбрионе, что в некоторой степени компенсирует отсутствие защитного слоя трофобласта в ЭТ.

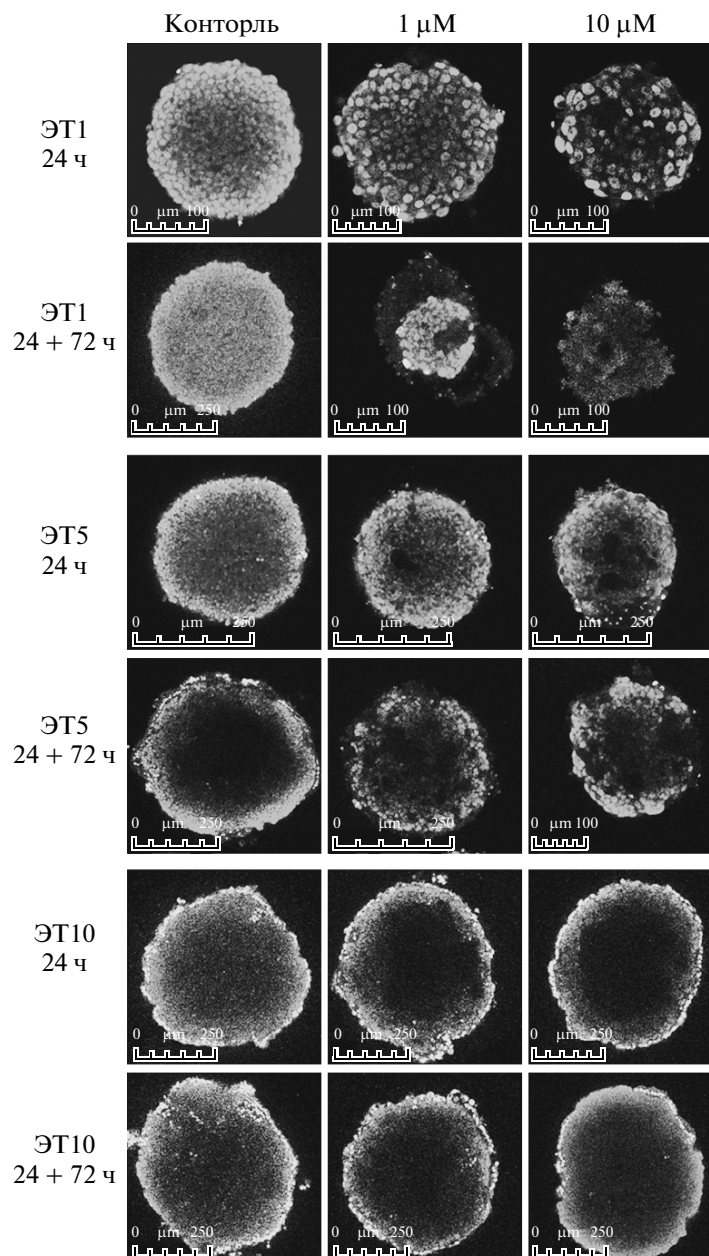


Рис. 4. Анализ дифференцировки ЭТ, подвергшихся воздействию этопозида. Экспрессия транскрипционных факторов Oct4 (серые клетки) и Gata4 (белые клетки на поверхности ЭТ5 и ЭТ10) в ЭТ разных стадий дифференцировки.

Таким образом, развитие гипертрофированного слоя внезародышевой энтодермы и увеличение клеточного объема ЭТ хотя и приводят к снижению диффузии, транспорта и метаболизма химических и биологически активных веществ, необходимых для роста и дифференцировки, но одновременно препятствуют действию повреждающих факторов. В этом контексте, ЭТ можно рассматривать как 3D клеточные структуры более близкие к структурам ранних эмбрионов, а соответственно как более адекватные *in vitro* модели для фармакологических и токсикологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гривенников И.А., и др. Характеристика плюрипотентной популяции на начальных стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре // Доклады Академии наук. 2002. Т. 386. С. 555–558.
- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Никонова Т.М. Регуляция *in vitro* и *in vivo* дифференцировки эмбриональных стволовых, эмбриональных герминативных и тератокарциномных клеток мыши факторами семейства TGF β // Онтогенез. 2009. Т. 40. С. 403–418.

- Гордеева О.Ф.* Антипролиферативные и цитотоксические эффекты различных типов цитостатиков на плюрипотентные стволовые клетки и клетки тератоканциномы мыши // *Онтогенез*. 2012. Т. 43. С. 268–277.
- Arriola E.L., Lopez A.R., Chresta C.M.* Differential regulation of p21waf-1/cip-1 and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-Mdm2 autoregulatory feedback loop // *Oncogene*. 1999. V. 18. P. 1081–1091.
- Bauwens C.L., Peerani R., Niebruegge S. et al.* Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 2300–2310.
- Bueno C., Montes R., Catalina P. et al.* Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement // *Leukemia*. 2011. V. 25. P. 400–410.
- Casciari J.J., Sotirchos S.V., Sutherland R.M.* Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH // *J. Cell. Physiol.* 1992. V. 151. P. 386–394.
- Ducibella T., Albertini D.F., Anderson E. et al.* The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development // *Dev. Biol.* 1975. V. 45. P. 231–250.
- Gardner R.L.* Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1982. V. 68. P. 175–198.
- Grandela C., Pera M.F., Grimmond S.M. et al.* p53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells // *Stem. Cell. Res.* 2007. V. 1. P. 116–128.
- Messana J.M., Hwang N.S., Coburn J. et al.* Size of the embryoid body influences chondrogenesis of mouse embryonic stem cells // *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 2008. V. 2. P. 499–506.
- Mohr J.C., Zhang J., Azarin S.M. et al.* The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells // *Biomaterials*. 2010. V. 31. P. 1885–1893.
- Moneyppenny C.G., Shao J., Song Y. et al.* MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells // *Carcinogenesis*. 2006. V. 27. P. 874–881.
- Nagao T., Yoshimura S., Saito Y. et al.* Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration // *Teratog., Carcinog. Mutagen.* 1999. V. 19. P. 233–241.
- Nam C., Doi K., Nakayama H.* Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway // *Histol. Histopathol.* 2010. V. 25. P. 485–493.
- Palo A.K., Sahu P., Choudhury R.C.* Etoposide-induced cytogenotoxicity in mouse spermatogonia and its potential transmission // *J. Appl. Toxicol.* 2005. V. 25. P. 94–100.
- Sachlos E., Auguste D.T.* Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: a strategy for stem cell differentiation // *Biomaterials*. 2008. V. 29. P. 4471–4480.
- Seiler A.E.M., Spielmann H.* The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro // *Nat. Protoc.* 2011. V. 6. P. 961–978.
- Valamehr B., Jonas S.J., Polleux J. et al.* Hydrophobic surfaces for enhanced differentiation of embryonic stem cell-derived embryoid bodies // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. P. 14459–14464.
- Van Winkle A.P., Gates I.D., Kallos M.S.* Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation // *Cells Tissues Organs (Print)*. 2012. V. 196. P. 34–47.
- Yamada K.M., Cukierman E.* Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D // *Cell*. 2007. V. 130. P. 601–610.

Cytotoxic Effects of Etoposide at Different Stages of Differentiation of Embryoid Bodies Formed by Mouse Embryonic Stem Cells

O. F. Gordeeva

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: *olgagordeeva@yandex.ru*

Received July 7, 2013; in final form, July 10, 2013

Abstract—The initial stages of in vitro differentiation of embryonic stem cells are considered as unique three-dimensional models of early development of mammals for basic, pharmacological, and toxicological studies. It has been previously shown (Gordeeva, 2012) that the assessment of embryotoxicity in the model of undifferentiated embryonic stem cells can be insufficiently accurate in predicting toxic effects on mammalian embryos. In view of this, we performed a comparative study of the damaging effects of the cytostatic etoposide in undifferentiated embryonic stem cells and embryoid bodies of different stages of differentiation that have similar three-dimensional structures with early embryos. The analysis of growth, cell death, and dynamics of differentiation of embryonic stem cells and embryoid bodies exposed to etoposide showed that the cytostatic and cytotoxic effects of etoposide are stage-specific. The damaging effects of etoposide were maximum in the undifferentiated embryonic stem cells and decreased with growth and differentiation of embryoid bodies. We assume that the increase in the cell volume of embryoid bodies and the development of the hypertrophic we suggest that the increase of embryoid body volume and overgrowth of extraembryonic endoderm layer lead to a decrease in the diffusion, transport, and metabolism of chemical and bioactive substances and prevent the damaging effects.

Keywords: embryoid bodies, embryonic stem cells, etoposide, cytostatics, cytotoxicity, embryotoxicity, differentiation