

## ВЛИЯНИЕ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ НА МОРФОЛОГИЮ ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛ

© С. В. Буравков,<sup>1,2</sup> В. П. Черников,<sup>1</sup> Н. А. Константинова,<sup>2</sup> Л. Б. Буравкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова  
и <sup>2</sup> Институт медико-биологических проблем РАН, Москва;

<sup>1</sup> электронный адрес: buravkov@fbm.msu.ru

Изучали эффекты компенсации гравитационного влияния на начальные стадии эмбрионального развития на модели медленного клиностаტიрования эмбрионидных тел (ЭТ), полученных из эмбриональных стволовых клеток мыши линии R1. Анализ полутонких срезов ЭТ толщиной 1–2 мкм и электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры клеток позволили выявить особенности морфологии ЭТ на разных стадиях созревания. При моделировании эффектов микрогравитации с помощью клиностаტიруемых ЭТ были показаны достоверно значимое снижение количества эмбриональных стволовых клеток, вступивших в процессы апоптоза, и существенное снижение относительной площади «пустот» в клиностаტიруемых ЭТ по сравнению с контрольными. Делается предположение о том, что отсутствие больших цист при клиностаტიровании может быть вызвано замедлением начальных стадий дифференцировки и морфогенеза, связанных с процессами аутофагии в ЭТ.

Ключевые слова: эмбрионидные тела, световая микроскопия, электронная микроскопия, клиностаტიрование.

Принятые сокращения: ЭСК — эмбриональные стволовые клетки. ЭТ — эмбрионидные тела, LIF — фактор, ингибирующий лейкемию.

В последнее десятилетие предметом интенсивного изучения стали эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) млекопитающих. Возросший интерес к данной модели обусловлен новыми возможностями для исследования фундаментальных механизмов, лежащих в основе процессов дифференцировки стволовых клеток, состояния их плюрипотентности, а также роли эндогенных и экзогенных факторов, определяющих тип дифференцировки *in vivo* и *in vitro*.

ЭСК — это изолированные из внутренней клеточной массы бластоцисты (Evans, Kaufmann, 1981; Martin, 1981). Обычно для поддержания ЭСК в плюрипотентном состоянии их культивируют на подложке из эмбриональных фибробластов мыши или с добавлением в среду культивирования фактора, ингибирующего лейкемию (LIF) (Guan et al., 1999). Культивирование ЭСК без подложек из эмбриональных фибробластов или без добавления в среду LIF приводит к формированию эмбрионидных тел (ЭТ). Известно, что начальные этапы формирования ЭТ включают в себя агрегацию клеток. Клетки, образующие ЭТ, вступают на начальный путь специализации, их последующая дифференцировка отчасти напоминает ранние стадии эмбриогенеза (Guan et al., 1999; Keller, 2005).

ЭТ — это трехмерная шарообразная структура, сфероид, состоящий из наружного и внутреннего слоев клеток, которые разделены базальной мембраной. Как правило, наружный слой состоит из довольно крупных клеток, имеющих отростки и синтезирующих компоненты базальной мембраны. Их поверхность, обращенная к внеш-

ней среде, покрыта многочисленными микроворсинками, внутренний слой состоит из большого количества делящихся клеток. В центре иногда располагается полость с апоптотическими клетками (Мануилова и др., 2001).

Во внешнем клеточном слое ЭТ, как известно, имеются высокоадгезивные межклеточные контакты типа щелевых, благодаря которым внутрь ЭТ не способны проникать высокомолекулярные вещества (Saitou et al., 1998). Межклеточные взаимодействия клеток внутреннего слоя осуществляются при помощи контактов типа щелевых и плотных контактов. После прикрепления ЭТ к субстрату система плотных контактов между клетками внешнего слоя разрушается, базальная мембрана дезинтегрируется, клетки начинают мигрировать по субстрату, активно пролиферировать и спонтанно дифференцироваться (Гордеева и др., 2002).

Большое число экспериментальных данных, выполненных на различных типах клеток, свидетельствует об их чувствительности к сдвигам гравитационной стимуляции, которые вызывают как структурные изменения, так и изменения функциональной активности клеток (Cogoli, 1993; Таирбеков, 2002; Crawford-Young, 2006; Буравкова, 2008).

Однако данных о влиянии гравитационной составляющей на состояние культивируемых ЭСК крайне мало. Ранее нами было показано, что клиностаტიрование не влияет на пролиферацию ЭСК, но снижает на 30 % последующее образование ЭТ и приводит к задержке дифференцировки в кардиомиоцитарном направлении. Кроме того, внешний вид ЭТ, подвергавшихся клиностаტიрова-

нию в течение 72 ч, изменялся (Константинова и др., 2006а, 2006б).

Целью данной работы явилось изучение морфологии ЭТ после клиностаტიрования в течение 72 ч.

### Материал и методика

ЭСК были любезно предоставлены Лабораторией молекулярной генетики соматических клеток Института молекулярной генетики РАН. Культивирование ЭСК происходило по методике, подробно представленной ранее (Константинова и др., 2006а). Для получения ЭТ клетки снимали с подложки из эмбриональных фибробластов мыши, клетки агрегировали с образованием ЭТ, образовавшиеся ЭТ помещали в культуральные флаконы (по 600 тел на флакон) и подвергали клиностаტიрованию (скорость 6 об/мин, экспозиция 72 ч). Контрольные флаконы экспонировали в течение того же времени в горизонтальном статическом положении.

Фиксирование ЭТ происходило непосредственно в среде инкубации с помощью глутаральдегида в конечной концентрации 2.5 % в течение 2—4 ч при комнатной температуре. Далее клеточную суспензию центрифугировали при скорости 1500 об/мин в течение 10 мин в стеклянных центрифужных пробирках. Промывали полученный осадок в 5 мл фосфатного буфера (рН 7.4) в течение 15 мин. Дополнительное фиксирование осадка в 1%-ном OsO<sub>4</sub> на фосфатном буфере происходило в течение 1 ч при комнатной температуре. После центрифугирования образцы промывали в 5 мл фосфатного буфера 15 мин и опять центрифугировали. Препараты обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации (30, 50 и 70 %) по 5 мл в течение 20 мин при комнатной температуре с последовательным центрифугированием. Контрастирование производили в 3 мл 0.5%-ного раствора уранил-ацетата в 70%-ном этаноле в холодильнике в течение ночи, затем препараты промывали в 70%-ном этаноле 30 мин при комнатной температуре. Далее продолжали обезвоживание в 96%-ном этаноле 30 мин. Окончательное обезвоживание осадка осуществляли в пропиленоксиде (или в 100%-ном этаноле) 30 мин. Осадок пропитывали в 1 мл смеси Эпона с пропиленоксидом (1 : 1) в течение не менее 1 ч при комнатной температуре. Затем проводили суспендирование осадка в 1 капле эпоксидной смолы с последующим переносом в пластмассовые заливочные капсулы и доводили объем смолы до полного заполнения капсулы. Полимеризацию эпоксидной смолы Эпон—Аралдит в капсулах осуществляли при 60 °С в течение 48 ч.

В дальнейшем из клеточного осадка, залитого в эпоксидную смолу, изготавливали серийные полутонкие срезы толщиной 1—2 мкм с помощью ультрамикротомы Nova (LKB, Швеция). Срезы помещали на предметное стекло и окрашивали метиленовым синим с азуром 2 и фуксином. Ультратонкие срезы толщиной 70—90 нм получали с тех же эпоксидных блоков, переносили на медные сеточки для электронной микроскопии, дополнительно окрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM 100CX (Япония), оснащенном цифровой камерой Gatan ES-500W.

Для окрашивания полутонких срезов смолу удаляли в насыщенном растворе КОН в течение 5—7 мин (1.5—3 г КОН на 100 мл метанола). Далее стекла промывали в трех

сменах абсолютного спирта по 3—5 мин и в трех сменах дистиллированной воды по 3—5 мин. Срезы сушили на воздухе или в термостате. Затем производили стандартное двойное окрашивание метиленовым синим с азуром 2 и фуксином. Исследование срезов проводили на микроскопах Axioskop 40 (Zeiss, Германия) и инвертированном микроскопе Axiovert 200 (Zeiss, Германия), оснащенном цифровой видеокамерой AxioCam HRC высокого разрешения.

Полученные изображения ЭТ анализировали в программе Sigma ScanPro 5, подсчитывали количество апоптотических клеток в расчете на 1 мм<sup>2</sup> площади полутонкого среза ЭТ и площади полостей в расчете на общую площадь среза ЭТ (так называемую относительную площадь сформированных полостей).

### Результаты и обсуждение

Анализ строения ЭТ (контрольная и опытная серии после воздействия клиностаტიрования в течение 72 ч) проводили на полутонких срезах толщиной 1—2 мкм. Полученные результаты показали, что ЭТ были на разных стадиях созревания, поскольку с момента пассирования ЭСК для получения ЭТ до момента изготовления полутонких срезов прошло 7—8 сут; вполне возможно, что некоторые ЭТ уже достигли полной стадии созревания, а другие — нет, причем подобное явление было обнаружено как в опыте, так и в контроле.

В результате анализа полутонких срезов около 100 ЭТ были обнаружены три стадии созревания ЭТ как в опытных, так и в контрольных сериях: сформированное ЭТ без базальной мембраны, ограничивающей внутренний слой клеток от внешнего (рис. 1, а), с частично образованной мембраной (рис. 1, б) и полностью сформированные, созревшие ЭТ с четко выраженной мембраной (рис. 1, в) (представлены контрольные группы ЭТ).

Как видно на рис. 1, ЭТ без оболочки (базальной мембраны) состоят из однотипных клеток, в которых практически не наблюдалось вакуолизации цитоплазмы. Однако в ЭТ, где была четко сформирована базальная мембрана, видны вакуолизированные области. Они представлены как во внутреннем, так и во внешнем слое, где, как известно, клетки более дифференцированы (Гордеева и др., 2002). К тому же в сформированных ЭТ во внутреннем пуле клеток, где были обнаружены «пустоты», ядра были фрагментированными, с сильно конденсированным хроматином, расположенным зачастую по периферии ядер, что указывает на процессы апоптоза (Ярилин, 1998; Самуилов и др., 2000). Ранее было показано, что апоптотические клетки располагаются в основном центре ЭТ (Мануилова и др., 2001; Гордеева и др., 2002). Однако в нашем исследовании их можно было встретить не только в центре, но и по всему пространству внутреннего слоя ЭТ.

Во внешнем клеточном слое ЭТ были обнаружены клетки, имеющие отростки, что подтверждает данные других исследователей (Saitou et al., 1998; Мануилова и др., 2001) и говорит об их дифференцированности (рис. 2). Видно, что в опытной группе клетки внутреннего слоя расположены менее плотно, чем в контроле; имеются пустые места (возможно, остатки погибших клеток). Видно, что в таких клетках в опыте также обнаружены фрагментированные ядра.

Аутофагия может быть активирована *in vivo* как клеточный защитный механизм (Levine et al., 2005). При эмб-

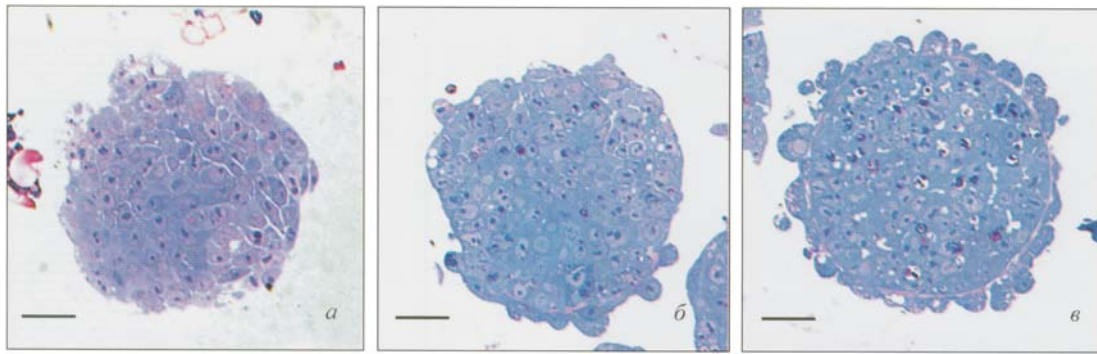


Рис. 1. Три стадии созревания эмбрионидных тел (ЭТ, контрольные группы). Полутонкие срезы (1—2 мкм).

*a* — без базальной мембраны, ЭТ состоит из однотипных клеток, в которых не наблюдалось вакуолизации цитоплазмы; *б* — с частично сформированной базальной мембраной; *в* — с полностью сформированной базальной мембраной; в клетках ЭТ видны вакуолизованные области как во внутреннем, так и во внешнем слое, где клетки более дифференцированы. Масштабная линейка — 20 мкм.

риональном развитии млекопитающих проявлением программируемой клеточной гибели является образование «пустот», когда часть клеток эмбриональной эктодермы, уходя в апоптоз, формирует впадину (Soucovanis, Martin, 1995). Этот процесс в условиях *in vitro* может быть воспроизведен при культивировании ЭСК без «фидерной» подложки и без добавления фактора LIF (Poirier et al., 1991).

При использовании в качестве модели эмбриогенеза ЭТ было показано, что после 10 сут культивирования во внутреннем эктодермальном слое ЭТ образовывались полости, или кавитации, которые со временем увеличивались в размерах (Qu et al., 2007). В нашем случае как большие полости, так и маленькие «пустоты», оставшиеся от гибели единичных клеток, внутри ЭТ были обнаружены примерно на 6-е сут с начала культивирования (рис. 3). Возможно, подобное отличие временного интервала обнаружения «пустот» в нашей работе от данных других исследователей связано с индивидуальными особенностями ЭТ. Как видно на рис. 3, в ЭТ контрольной группы в центральной части располагались достаточно большие по размеру «пустоты» по сравнению с ЭТ опытной группой (стрелки); причем вокруг них можно было встретить клетки, по морфологическим признакам напоминающие эпителий.

Был проведен количественный анализ всех полученных срезов ЭТ на выявление как количества апоптотических клеток в расчете на 1 мм<sup>2</sup> площади среза ЭТ, так и площади «пустот» в расчете на общую площадь среза ЭТ (так называемую относительную площадь сформированных «пустот»). В результате подсчета числа клеток, вступивших в процессы апоптоза, было показано (рис. 4) существенное уменьшение количества апоптотических клеток, приходящихся на 1 мм<sup>2</sup> площади среза в клиностатируемых ЭТ по сравнению с контролем ( $P < 0.01$ ; критерий Манна—Уитни;  $n_1 = 24$  (опыт),  $n_2 = 67$  (контроль)) (Гланс, 1999). Относительная площадь «пустот» в опытной группе была также существенно ниже, чем в контрольной (рис. 5) ( $P < 0.05$ ; критерий Манна—Уитни;  $n_1 = 24$  (опыт),  $n_2 = 70$  (контроль)) (Гланс, 1999).

При исследовании с помощью трансмиссионной электронной микроскопии периферийной части контрольных ЭТ была выявлена уплощенная форма клеток, на поверхности которых отмечались многочисленные микроворсинки. Можно видеть хорошо организованные органеллы: митохондрии, гладкий и шероховатый эндоплазматический

ретикулум; ядра веретенообразной, уплощенной формы занимают значительную часть клетки (рис. 6). Отсутствие конденсированного хроматина свидетельствует об интерфазном состоянии ядра.

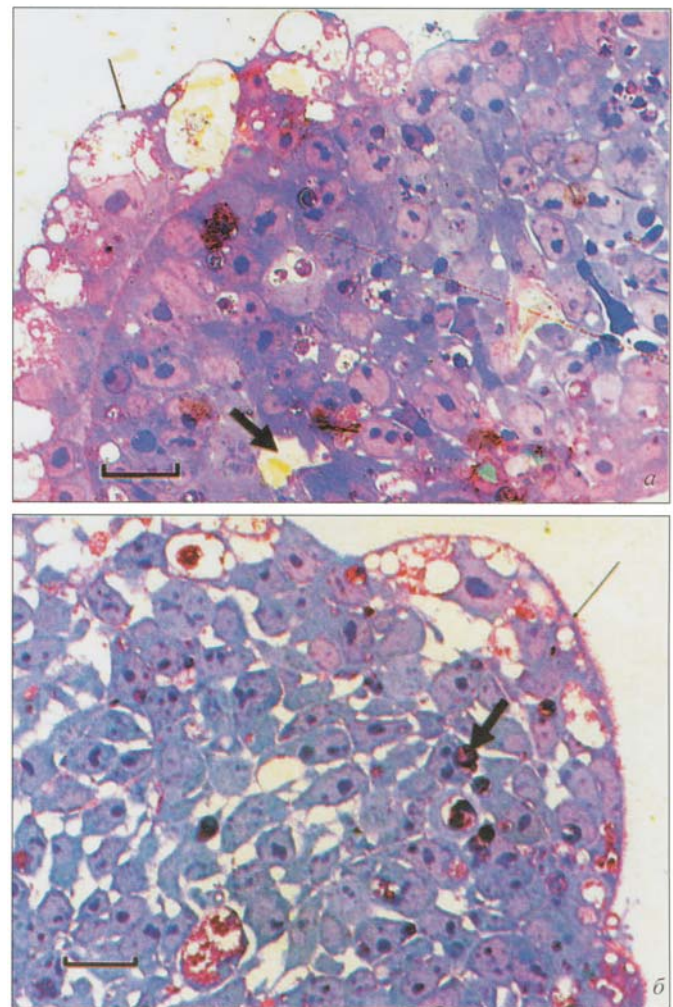


Рис. 2. Полутонкие срезы ЭТ (толщина 1—2 мкм), окрашенные метиленовым синим с азур—фуксином.

*a* — контроль; *б* — опыт; толстыми стрелками показаны «пустоты» и ядра апоптотических клеток; тонкими стрелками — клетки внешнего слоя. Масштабная линейка — 10 мкм.

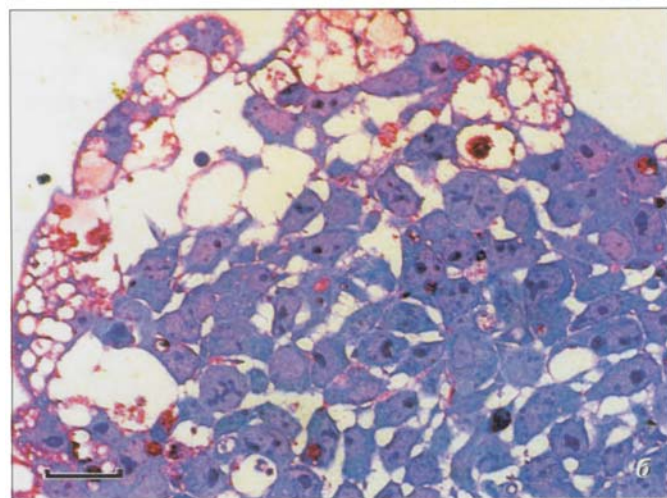
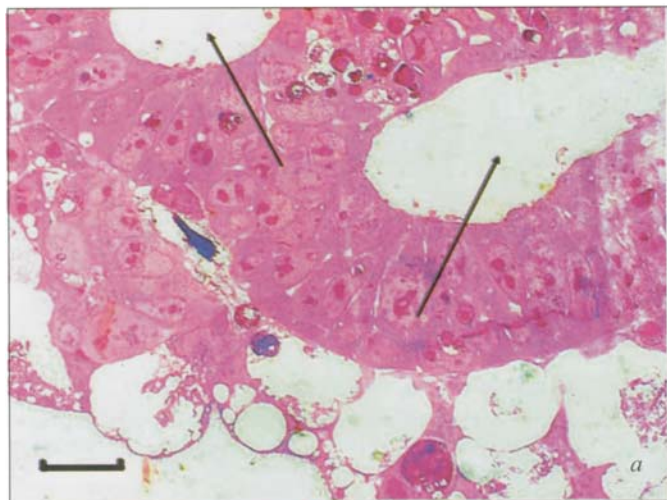


Рис. 3. Полутонкие срезы ЭТ (толщина 1—2 мкм) контрольной (а) и экспериментальной (б) групп.

Видны как большие полости, так и маленькие «пустоты», образовавшиеся после гибели единичных клеток (стрелки), которые были обнаружены внутри ЭТ примерно на 6-е сут с начала культивирования. Окраска метиленовым синим с азур-фуксином. Масштабная линейка — 10 мкм.

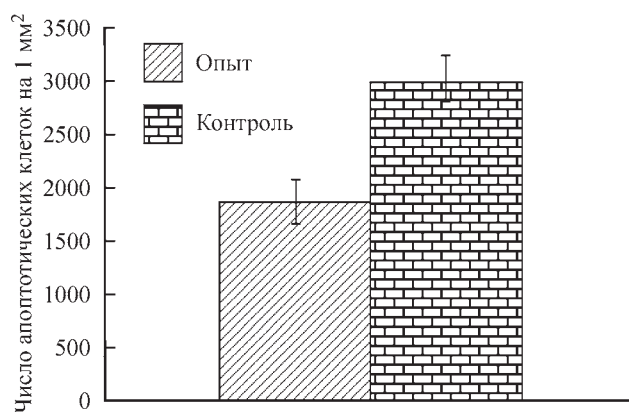


Рис. 4. Число эмбриональных стволовых клеток мыши, вступивших в процессы апоптоза, в расчете на 1 мм² площади полутонкого среза ЭТ.

Вертикальные отрезки — доверительные интервалы средних значений ( $P < 0.01$ ).

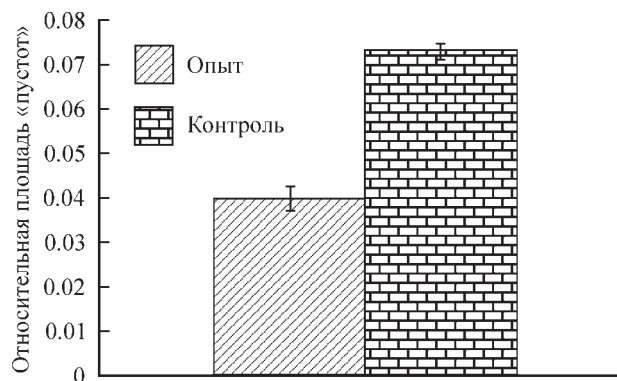


Рис. 5. Величина отношения суммарной площади «пустот» (в мкм²) к общей площади среза ЭТ (в мкм²).

Вертикальные отрезки — доверительные интервалы средних значений ( $P < 0.05$ ).

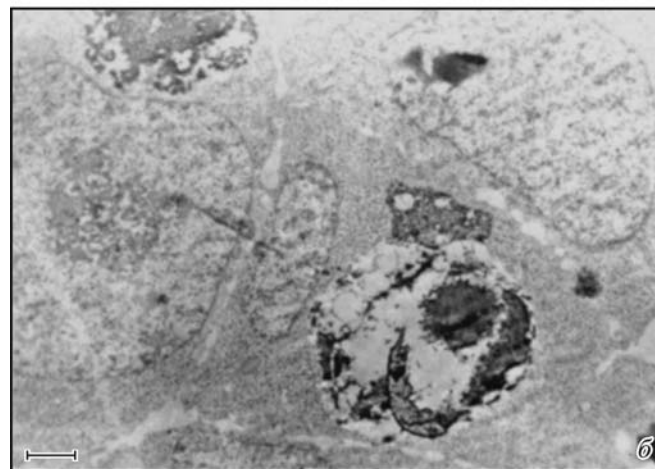
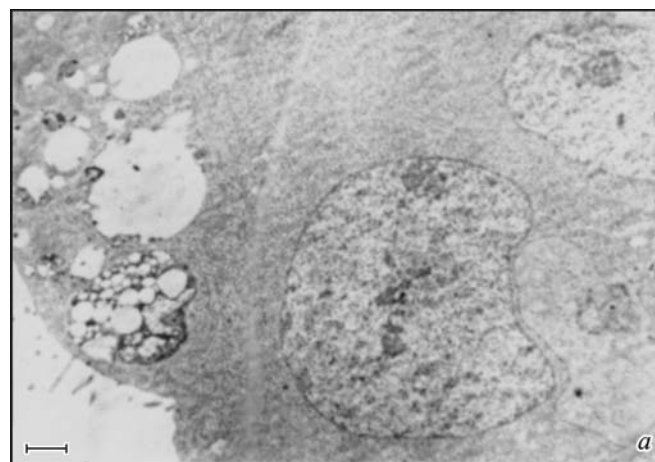


Рис. 6. Трансмиссионная электронная микроскопия клеток периферийной части ЭТ в контроле (а, б).

В периферийной части контрольных ЭТ выявляется уплощенная форма клеток, на поверхности отмечаются многочисленные микроворсинки. Видны хорошо организованные органеллы: митохондрии, гладкий и шероховатый эндоплазматический ретикулум; ядра веретенообразной, уплощенной формы занимают значительную часть клеток. Масштабная линейка — 1 мкм.

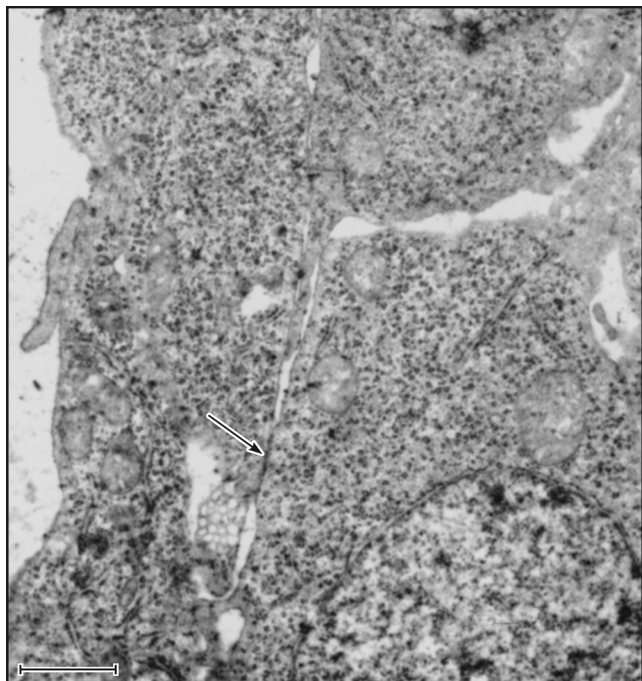


Рис. 7. Трансмиссионная электронная микроскопия клеток периферийной части ЭТ в контроле.

Видны хорошо развитые межклеточные контакты в виде плотных соединений (стрелка). Митохондрии имеют электронно-плотный матрикс, их кристы увеличены, хорошо развита гранулярная эндоплазматическая сеть. Масштабная линейка — 1 мкм.

Клетки центральной части сфер имеют треугольную или сферическую форму. Они также имеют развитую ультраструктуру, однако в них часто встречаются лизосомоподобные тельца и фрагментированные ядра с характерным перинуклеарным расположением хроматина.

Можно отметить сформированные межклеточные контакты в виде плотных соединений (рис. 7). Митохондрии имеют электронно-плотный матрикс с увеличенными кристами и находятся в энергизованном состоянии, обеспечивая энергией синтетические процессы в клетках. Высокая синтетическая активность клеток также подтверждается хорошо развитой гранулярной эндоплазматической сетью. Видны несколько расширенные межклеточные пространства, обеспечивающие межклеточный транспорт веществ. В некоторых клетках выявляется конденсированный хроматин, а митохондрии приобретают округлую форму.

Нередко наблюдаются просветление и вакуолизация цитоплазмы, в таких случаях клетки также становятся округлыми. Скорее всего, это может говорить о начавшемся деструктивном процессе в клетке. Иногда в ядрах отмечается конденсированное маргинальное расположение хроматина, что свидетельствует о морфологических признаках проявляющегося апоптоза. Наличие одного или нескольких ядрышек определяется, вероятно, тем, как прошел срез через клетку.

Все отмеченные особенности говорят о том, что клетки находятся в разных физиологических состояниях и (или) на разных стадиях своего развития. Иногда можно встретить выросты клеток, расположенных под наружным слоем, доходящие до поверхности сфер. Однако при этом процессов активного эндо- или экзоцитоза не отмечается.

Действие клиностатирования приводит к возрастанию электронной плотности цитоплазмы и плохой различимости органелл; ядра клеток становятся вытянутыми, а в отдельных случаях ядерная мембрана приобретает извилистую форму (рис. 8). Так же как и в контрольной группе, часто можно встретить деградацию хроматина в клетках.

Сходные ультраструктурные особенности были обнаружены при исследовании образования ЭТ *in vitro* из различных клеточных линий тератокарциномы (Martin, Evans, 1975). Было показано, что на 5-е сут культивирования клетки внутреннего слоя имеют треугольную вытянутую форму, содержат большое ядро, цитоплазма клеток богата митохондриями и характеризуется большим количеством свободных рибосом (Martin, Evans, 1975). В то же время наружный слой клеток обладал свойствами энтодермальных клеток, эти клетки содержали набухший эндоплазматический ретикулум, а их наружная поверхность была покрыта многочисленными микроворсинками. Под этим внешним слоем располагалась базальная мембрана, которая отделяла внешний слой от внутреннего и характеризовалась фибриллярными структурами (Pierce et al., 1962).

Таким образом, было показано, что клиностатирование ЭТ в течение 72 ч приводит к достоверно значимому

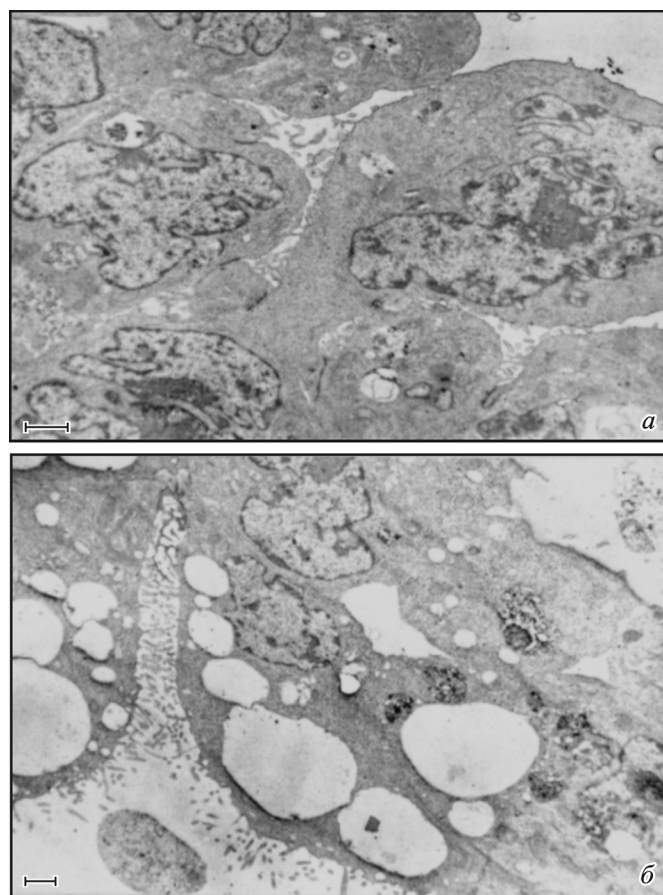


Рис. 8. Трансмиссионная электронная микроскопия ЭТ при воздействии клиностатирования (а, б).

Отмечается возрастание электронной плотности цитоплазмы; ядра клеток вытянутые, извилистой формы, а в отдельных случаях ядерная мембрана приобретает извилистую форму; встречается деградация хроматина в клетках, как и в контрольной группе. Масштабная линейка — 1 мкм.

снижению количества эмбриональных стволовых клеток, вступивших в процессы апоптоза. Кроме этого, наблюдались отсутствие больших по размеру «пустот» и существенное снижение их относительной площади в клинотатируемых ЭТ по сравнению с контролем. Возможно, это связано в первую очередь с замедлением процесса аутофагии в ЭТ. Эти изменения могли быть причиной последующей задержки дифференцировки, обнаруженной нами после клинотатирования (Константинова и др., 2006а).

### Список литературы

- Буравкова Л. Б. 2008. Проблемы гравитационной биологии клетки. Авиакосмич. и экологич. мед. 42 (6) : 10—18.
- Глас С. 1999. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 459 с.
- Гордеева О. Ф., Мануилова Е. С., Гривенникова И. А., Гуляев Д. В., Смирнова Ю. А., Зиновьева Р. Д., Хрущев Н. Г. 2002. Характеристика плюрипотентной популяции на начальных стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре. Докл. РАН 386 (4) : 555—558.
- Константинова Н. А., Буравкова Л. Б., Мануилова Е. С., Арсеньева Е. Л., Гривенников И. А. 2006а. Клинотатирование как способ воздействия на последующее развитие эмбриональных стволовых клеток *in vitro*. Технологии живых систем. 3 (5—6) : 4—8.
- Константинова Н. А., Мануилова Е. С., Гривенников И. А., Буравкова Л. Б. 2006б. Изучение первичных эффектов длительного клинотатирования на эмбриональные стволовые клетки мыши *in vitro*. Авиакосмич. экологич. мед. 40 (5) : 34—37.
- Мануилова Е. С., Гордеева О. Ф., Гривенников И. А., Озернюк Н. Д. 2001. Эмбриональные стволовые клетки: спонтанная и направленная дифференцировка. Изв. РАН. Сер. биол. 6 : 704—710.
- Самуилов В. Д., Олескин А. В., Лагунова Е. М. 2000. Программируемая клеточная смерть. Биохимия. 65 (8) : 1029—1046.
- Таирбеков М. Г. 2002. Молекулярные и клеточные основы гравитационной чувствительности. М. 104 с.
- Ярилин А. А. 1998. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме. Пат. физиол. и эксперим. терапия. 2 : 38—48.
- Cogoli A. 1993. The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system. J. Leukocyte Biol. 54 : 259—268.
- Coucouvanis E., Martin G. R. 1995. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitations in the vertebrate embryo. Cell. 83 : 287—287.
- Crawford-Young S. J. 2006. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. Int. J. Develop. Biol. 50 : 183—191.
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 292 : 154—158.
- Guan K., Rohwedel J., Wobus A. M. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation *in vitro*. Cytototechnology. 30 : 211—226.
- Keller G. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. Genes and Develop. 19 : 1129—1155.
- Levine B., Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? J. Clin. Invest. 115 : 2679—2688.
- Martin G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78 : 7634—7638.
- Martin G. R., Evans M. J. 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72 : 1441—1445.
- Pierce G. B., Midgley A. R., Sri Ram J., Feldman J. D. 1962. Parietal yolk sac carcinoma: clue to the histogenesis of Reichert's membrane of the mouse embryo. Amer. J. Pathol. 41 : 549—566.
- Poirier F., Chain C. T., Timmons P. M., Robertson E. J., Evans M. J., Rigby P. W. 1991. The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation *in vitro* and at the time of implantation in the developing embryo. Development. 113 : 1105—1114.
- Qu X., Zou Z., Sun Q., Luby-Phelps K., Cheng P., Horgan R. N., Gilpin C., Levine B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. Cell. 128 : 931—946.
- Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furu-se M., Takano H., Noda T., Tsukita S. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. J. Cell Biol. 141 : 397—408.

Поступила 20 II 2009

### INFLUENCE OF CLINOROTATION ON EMBRYOID BODIES MORPHOLOGY

S. V. Buravkov,<sup>1,2</sup> V. P. Chernikov,<sup>1</sup> N. A. Konstantinova,<sup>2</sup> L. B. Buravkova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Fundamental Medicine, M. V. Lomonosov State University,  
and <sup>2</sup> Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow;  
e-mail: buravkov@fbm.msu.ru

The compensative effects of gravitation at the first stages of embryonic development stages have been investigated using slow clinorotation of embryoid bodies from mouse R1 stem cell lines. Semithin sections (1—2 μm) analysis and electron microscopy study of embryonic bodies cells allowed to reveal morphological features of cells at different maturation stages. Significant decrease in the number of embryonic stem cells undergoing apoptosis as well as noticeable reduction of «lacunas» relative areas were found in clinorotated embryonic bodies compared to control. We propose that large cyst absence may be caused by initial differentiation and morphogenesis stages delay associated with autophagy processes in embryonic bodies.

Key words: embryoid bodies, light microscopy, electron microscopy, clinorotation.