

8. **Білько Н. М.** Патент України № 2692. Спосіб виготовлення камери для культивування клітин / від 15.04.1994. Офіційний бюлетень «Промислова власність», 1994, 5: 218.

9. **Mayani H., Flores-Figueroa E., Chavez-Gonzalez A.** In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 2009, 33: 624–637.

10. **Corbin A. S., Agarwal A., Loriaux M., Cortes J., Deininger M., Druker B.J.** Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J. Clin. Invest.*, 2011, 121: 396–409.

11. **Гринева Н.И., Ахлынина Т.В., Герасимова Л.П., Манакова Т.Е., Шмаров Д.А., Сарычева Т.Г. Тимофеев А.М., Найденова Н.М., Боровкова Т.В., Саркисян Г.П., Гавричкова А.Р., Колосова Л.Ю., Колошейнова Т.И., Ковалева Л.Г., Воронцова А.В., Туркина А.Г.** Различия в пролиферации и дифференцировке Ph⁺ клеток от индивидуальных больных ХМЛ в суспензионной культуре. Ph⁺ клетки с высокой скоростью пролиферации. *Экспериментальная онкология*, 2009, 8: 53–68.

КЛЕТКИ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА В КУЛЬТУРЕ: КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ

***Н.П. Терюкова, И.В. Воронкина, Л.В. Смагина, В.А. Иванов**

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, *npter@yandex.ru

Асцитная гепатома Зайдела крыс является метастатической опухолью, или, точнее, этапом метастатического каскада, и может быть использована в качестве перспективной модели при изучении клеточных механизмов опухолевой прогрессии и метастазирования. Работа проведена на двух культивируемых *in vitro* линиях гепатомы Зайдела с разным уровнем цитодифференцировки и туморогенности – монослойной и суспензионной, представленной флолирующими многоклеточными островками. Для выявления в составе этих клеточных линий субпопуляций, обладающих опухолеиницирующим потенциалом и/или способностью к инвазии и метастазированию, проведено клонирование клеток с помощью метода предельных разведений. Показано, что обе клеточные линии формируют три типа клонов, которые отличаются по форме колоний и пролиферативному потенциалу, причем при клонировании клеток суспензионной линии впервые обнаружено образование сферических клонов в полной ростовой среде. Получены 8 клональных линий гепатомы Зайдела, из которых только клетки сферического клона и двух голоклонов при внутрибрюшинном введении беспородным крысам индуцировали развитие асцитной формы опухоли. Впервые установлено, что клетки монослойной и суспензионной линий и их клонов отличаются по характеру экспрессии адгезионной молекулы эпителиальных клеток (EpcAM) – маркера стволовых клеток печени и

опухолевых стволовых клеток (или опухолеиницирующих клеток), и активности матричной металлопротеиназы 9, уровень секреции которой может служить индикатором инвазивности опухолевых клеток. Выявление опухолевых сферических клонов и голоклонов, отличающихся по своим адгезионным свойствам, экспрессии ЕpCAM и активности матричной металлопротеиназы 9, позволяют сделать заключение о гетерогенности субпопуляции опухолеиницирующих клеток асцитной гепатомы Зайдела.

Ключевые слова: гепатома, клонирование, опухолевые стволовые клетки, опухолеиницирующие клетки, матричные металлопротеиназы, адгезионная молекула эпителиальных клеток.

Гепатома Зайдела была индуцирована у крыс 4-диметиламиноазобензолом [1]. При вскрытии животных оказалось, что одна из первичных опухолей печени имела разрыв, через который островки эпителиальных клеток отделялись от основной массы печени. Образовавшийся в брюшной полости малигнизированный асцит был привит нескольким крысам и дал начало асцитной форме опухоли, клетки которой формируют многоклеточные островки. Особенностью гепатомы Зайдела является высокая частота метастазирования в паратрахеальные лимфатические узлы: метастазы этой локализации наблюдаются у 90–100% животных. Таким образом, гепатома Зайдела прошла длительный путь опухолевой прогрессии в рамках первичной солидной опухоли, и образование асцитной формы гепатомы является промежуточным этапом на пути диссеминации опухолевых клеток в организме, т.е. этапом метастатического каскада. Для клеток первичных опухолей эпителиального происхождения начальные этапы метастатического каскада связаны с эпителиально-мезенхимным переходом, в ходе которого происходит активация цинк-пальцевых (zinc-finger) транскрипционных факторов суперсемейства SNAIL, в числе которых SNAIL1, и матричных металлопротеиназ (ММП), изменение морфологии клеток, увеличение их подвижности и инвазивности.

Ранее с помощью масс-спектрометрического анализа в составе наружных мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела нами были выявлены и идентифицированы некоторые опухолеассоциированные антигены, которые можно рассматривать как маркеры дисдифференцировки зрелых гепатоцитов; в числе этих антигенов ЕpCAM – маркер стволовых/прогениторных клеток печени, альфа-фетопротеин (АФП) – маркер прогениторных клеток печени и басигин/CD147 – индуктор ММП [2]. Синтез ЕpCAM и АФП осуществляется в

низкодифференцированных клетках гепацитарного ряда – гепатобластах и овальных клетках, и прекращается в зрелых гепацитатах [3]. Экспрессия EpCAM в клетках гепацителлюлярных карцином регулируется активностью Wnt-beta-катенинового сигнального пути, непосредственной мишенью которого является ген EpCAM [4]. Вместе с тем активация Wnt-beta-катенинового сигнального пути индуцирует эпителиально-мезенхимный переход через свои нижележащие мишени, в том числе SNAIL1 [5]. Трансмембранный гликопротеид EpCAM с Мол.м. 32–42 кДа состоит из эктодомена, трансмембранного домена и короткого С-терминального эндодомена (EpiCD). В большинстве нормальных EpCAM-позитивных эпителиальных тканей функциональная роль EpCAM сводится только к межклеточной гомотипической адгезии. Однако в опухолях эпителиального происхождения и в опухолеиницилирующих клетках EpCAM участвует в передаче митогенного сигнала и поддержании низкодифференцированного статуса клеток: в результате регулируемого внутримембранного протеолиза молекулы освобождается внутриклеточный домен EpiCD, который в комплексе с FHL2, бета-катенином и Lef-1 перемещается в ядро и связывается с ДНК для непосредственного участия в регуляции транскрипции репрограммирующих генов (c-Myc, Oct4, Nanog, and Sox2) и генов эпителиально-мезенхимного перехода, в числе которых гены виментина и SNAIL1 [6,7]. У человека EpCAM обнаруживается в 35 % опухолей гепацителлюлярного происхождения, и по номенклатуре, предложенной Ямашита с соавт., EpCAM и АФП-позитивные опухоли относятся к подтипу гепацитоканцином, возникшим из печеночных стволовых клеток [8]. EpCAM-позитивные популяции клеток, выделенные из клеточных линий гепацитоканцином человека, содержат высоко туморогенные клеточные субпопуляции с характеристиками опухолевых стволовых, или опухолеиницилирующих клеток [9].

Ранее мы эксплантировали клетки асцитной гепацитомы Зайдела в культуру, и путем отбора прикрепляющихся к субстрату клеток от флоатирующих получили две клеточные линии – монослойную (ZH-ad) и суспензионную (Zd-fl), отличающиеся по уровням цитодифференцировки и туморогенности [10]. С целью выявления в составе асцитной гепацитомы Зайдела клеточных субпопуляций, обладающих опухолеиницилирующими свойствами и участвующих в диссеминации опухолевых клеток в организме, продолжено изучение культивируемых линий гепацитомы – проведено клонирование клеток с помощью метода предельных разведений, определение экспрессии клетками маркеров дисдифференцировки гепацитотов – EpCAM, Ov6 и SNAIL1, а также активности секретируемых ММП.

Материал и методы

Клетки монослойной и суспензионной линий гепатомы Зайдела *in vitro* культивировали в средах DMEM и RPMI-1640 (Биолот, Россия), соответственно, содержащих 10 % сыворотки крови плодов коровы (СПК) Sus-Biol (Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Клонирование клеток проводили с помощью метода предельных разведений [11]. Для получения одноклеточной суспензии клетки суспензионной линии дезагрегировали путем пипетирования при 37°C в течение 15 мин в 10 мл буфера следующего состава: 0.02 % ЭДТА, 0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, 0.286 % Na₂HPO₄·12H₂O, 0.02 % KH₂PO₄ и 0.02 % глюкозы. Затем суспензию пропускали через нейлоновый фильтр, и клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин. Жизнеспособность клеток контролировали с помощью трипанового синего. Для проведения клоногенного анализа готовили клеточные суспензии из расчета 50–70 клеток на 10 мл соответствующей полной ростовой среды и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного планшета. На 2-е и 3-и сут планшеты просматривали под инвертированным микроскопом ЛОМО Биолам П-1 (объектив 2.5 - 10×, окуляр 6.3×) и отмечали лунки, содержащие не более одной клетки. Наблюдение за ростом клонов продолжалось в течение 2–3 нед и сопровождалось фотофиксацией с помощью цифровой камеры Canon PowerShot A1100 IS с 4х оптическим зумом.

Для определения туморогенности клональных линий клетки вводили внутрибрюшинно беспородным крысам-самцам (питомник “Рапполово” РАМН) в дозе 10–40×10⁶ клеток на крысу.

Маркеры дисдифференцировки гепатоцитов выявляли с помощью методов непрямой иммунофлуоресценции и иммуноблотинга с использованием поликлональных антител к EpCAM (A-20), Ov6 и SNAIL1 (G7) фирмы Santa-Cruz. Для проведения иммунофлуоресцентного анализа клетки монослойных линий выращивали в среде DMEM с добавлением 10 % СПК в чашках Петри с вложенными покровными стеклами. Клетки суспензионных линий осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин, промывали раствором 0.15 М NaCl, приготовленном на 0.01 М натрий-фосфатном буфере (ФБС). Клетки суспендировали в капле 0.04 М раствора NaCl и наносили на покровное стекло; через 1 мин аккуратно удаляли избыток жидкости и в потоке воздуха подсушивали мазок. Клетки на покровных стеклах фиксировали 4 %-ным раствором параформальдегида в ФБС в течение 15 мин и пермеабелизировали 0.5%-ным раствором Тритона X-100.

Неспецифическое связывание антител блокировали 3%-ной нормальной ослиной сывороткой. Обработку клеток первыми антителами проводили при разведении 1/50 в течение 24 ч при 4 °С, вторыми – при разведении 1/100 в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Анализ проводили с использованием микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal.

Для проведения иммуноблотинга клетки лизировали в ФБС, содержащем 0.1 % SDS, 0.5 % Тритон X-100, ингибиторы протеаз и фенилметилсульфонилфторид. Белки разделяли с помощью SDS-электрофореза в 12.5%-ном полиакриламидном геле с последующим иммуноблотингом.

Протеолитическую активность секретируемых ММП оценивали с помощью метода зимографии, как описано ранее [12]. В качестве образцов были взяты пробы среды, кондиционированной исследуемыми клетками на 4-е сут их культивирования.

Результаты

Клонирование клеток с помощью метода предельных разведений. Впервые три типа колоний, отличающихся по морфологии и пролиферативному потенциалу, были обнаружены при клонировании кератиноцитов человека, а термины голоклон (holoclone), мероклон (meroclone) и параклон (paraclone) стали синонимами клонов, происходящих от стволовой клетки и транзитных амплифицированных клеток-предшественников ранней и поздней стадий, соответственно [13]. Клеточные линии опухолей эпителиального происхождения при клонировании также формируют три типа клонов, а "тест на голоклоны", состоящие из самообновляющихся опухолеиницирующих клеток, стал суррогатным тестом на опухолевые стволовые клетки [11]. При клонировании клеток суспензионной линии гепатомы Зайдела мы выявили три типа образующихся клонов – неприкрепляющиеся сферические клоны и два типа монослойных клонов, различающихся по пролиферативному потенциалу, форме колоний и клеточному составу. Сферические клоны образуются в результате деления неприкрепленной к субстрату клетки. Достигая критических размеров, флотирующие колонии расщепляются на островки меньших размеров и одиночные клетки, часть которых прикрепляется к субстрату и расплывается (рис. 1, А, Б). Формирование сферических клонов в полной ростовой среде выявлено впервые и не описано в литературе. Два типа монослойных колоний, образованных клетками суспензионной линии, соответствуют меро- (рис. 1, В) и параклонам (рис. 1, Г).

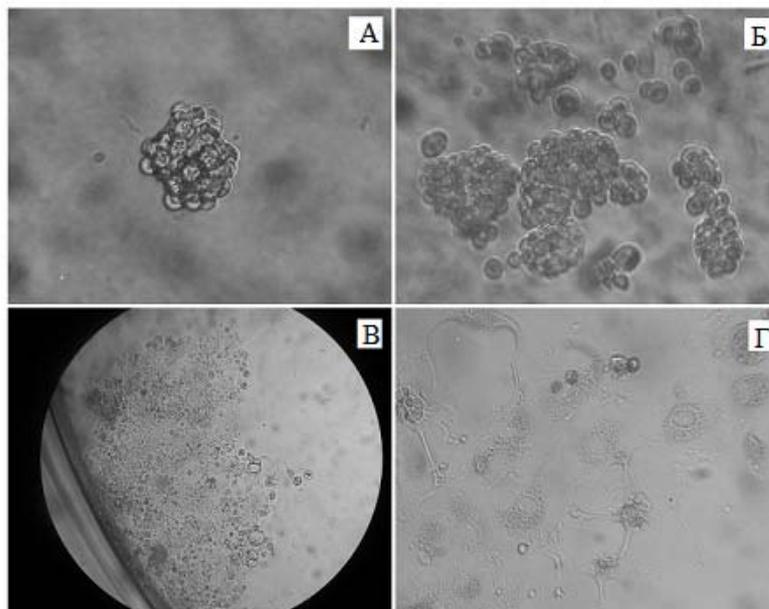


Рис. 1. Формирование сферического клона, меро- и параклонов при клонировании клеток суспензионной линии гепатомы Зайдела. А – сферический неприкрепляющийся к субстрату клон 1С, 6 сут., 10х; Б – флотирующие островки того же клона на 10 сут., 10х; В – мероклон 4G, 10 сут., 2.5х; Г – погибающие клетки параклона 10F, 14 сут., 10х.

С разрастанием мероклонов в среде появляются флотирующие клеточные кластеры, которые отделяются от монослоя в результате спонтанного открепления (*shedding*). В то же время не исключено, что в составе мероклонов (переходная форма между голоклонами и параклонами) присутствуют клетки-предшественники, способные генерировать сферические колонии. Клетки параклонов обладают низким пролиферативным потенциалом и через 2 недели их рост прекращается. Получены 3 клональные линии клеток: 1С – в результате экспансии сферического клона, 4G и 10Е – из мероклонов. При культивировании *in vitro* все три линии преимущественно состоят из флотирующих клеток.

При клонировании клеток монослойной линии получено 6 отличающихся по форме клонов, два из которых – 3Н и 6Н – классические компактные голоклоны округлой формы с четко очерченной границей образованы плотно упакованными мелкими клетками (рис. 2, А, В). Клон 5F в первые дни формирования похож на голоклон, но по мере развития утрачивает округлую форму и правильный контур (рис. 2, Б). Клон 1F состоит из “разбегающихся”, почти не контактирующих между собой клеток с низким пролиферативным потенциалом, и по своим характеристикам соответствует параклонам (рис. не представлен). Через две недели культивирования клон состоит из погибающих клеток. Два других клона – 1Е и 9С – мероклоны имеют неправильную форму и изрезанную пограничную линию (рис. 2, Г, Д). В результате

культивирования клеток голо- и мероклонов получены 5 клональных монослойных линий гепатомы Зайдела – 1Е, 3Н, 5F, 6Н и 9С.

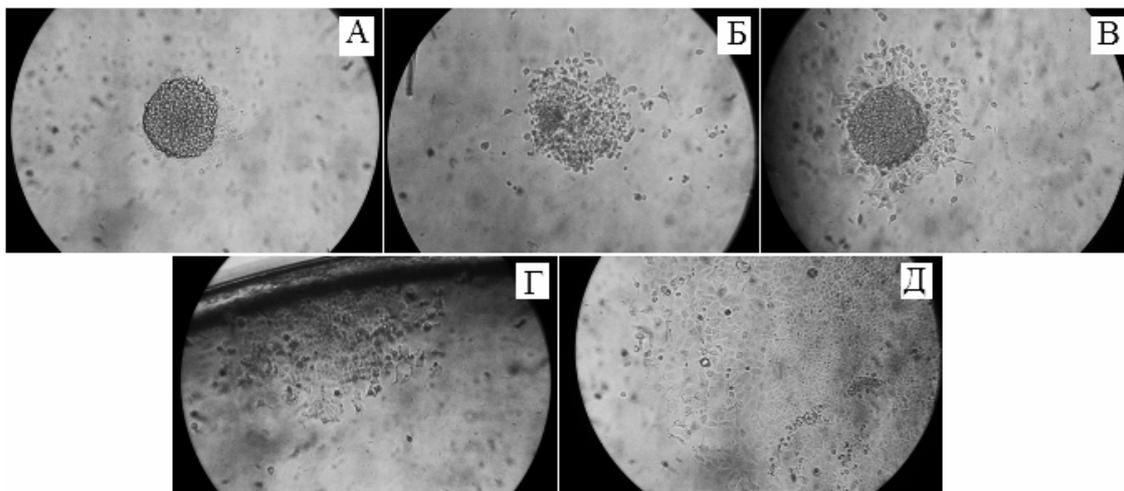


Рис. 2. Формирование голо- и мероклонов при клонировании клеток монослойной линии гепатомы Зайдела. А, Б, В – голоклоны 3Н, 5F и 6Н, соответственно; Г, Д – мероклоны 1Е и 9С; 2,5х.

Определение туморогенности клональных линий гепатомы Зайдела.

Туморогенность клеточных линий является основным доказательством наличия в их составе субпопуляции опухолеиницирующих клеток. Как правило, тест на туморогенность проводят на иммунодефицитных бестимусных голых мышах. В нашем исследовании туморогенность клональных клеточных линий *in vivo* определяли на иммунокомпетентных беспородных крысах-самцах, обычно используемых нами для ведения перевиваемой асцитной гепатомы Зайдела. Клетки клональных линий 1С, 4G и 10Е, полученных при клонировании суспензионной линии, вводили животным внутривентриально в дозе 1×10^7 на одну крысу. Развитие асцитной формы опухоли у двух животных из четырех наблюдалось через 4 недели только после введения клеток сферического клона 1С. При введении животным клональных линий, полученных из голо- и мероклонов монослойной культуры, доза варьировала в пределах $10\text{--}40 \times 10^6$ клеток на крысу. В этом случае развитие малигнизированного асцита происходило у одной крысы из трех в течение трех недель только после введения клеток голоклонов 5F и 6Н в дозе 20×10^6 (рис. 3).

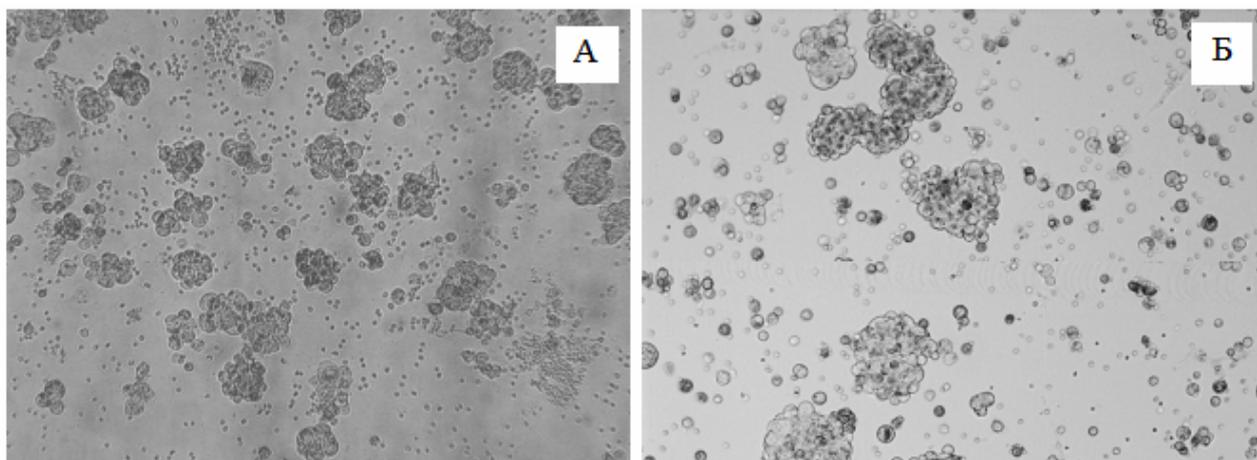


Рис. 3. Развитие асцитной формы гепатомы Зайдела при внутрибрюшинном введении крысам клеток клональных линий 6H (А) и 5F(Б): образование многоклеточных кластеров.

Фенотипирование клеток культивируемых линий гепатомы Зайдела. Для выявления в клетках гепатомы Зайдела опухолеассоциированных антигенов EpCAM, Ov6 и SNAIL1 использовали методы иммунофлуоресцентного анализа и иммуноблотинга. С помощью поликлональных антител, полученных против EpICD, показана внутриклеточная локализация EpCAM в клетках гепатомы Зайдела. Причем многоклеточные островки суспензионной линии и ее клонов (рис. 4, А–В) отличаются интенсивным точечным свечением в районе ядра, тогда как для клеток монослойных линий характерно диффузное распределение флуоресцентной метки в цитоплазме (рис. 4, Г–И). Интенсивность флуоресценции клеток монослойных клональных линий оценивали в усл. ед. с помощью программы анализа изображений ImageJ (NIH, USA). Высокий уровень флуоресценции клеток обнаружен для голоклонов, тогда как клетки мероклонов отличаются умеренным, или даже слабым свечением (линия 9С).

При обработке клеток моноклональными антителами к Ov6 и SNAIL1 наблюдается слабое диффузное свечение цитоплазмы клеток, уровень которого мало отличается от контрольных значений, что не позволяет на основании иммунофлуоресцентного анализа судить об экспрессии этих маркеров клетками.

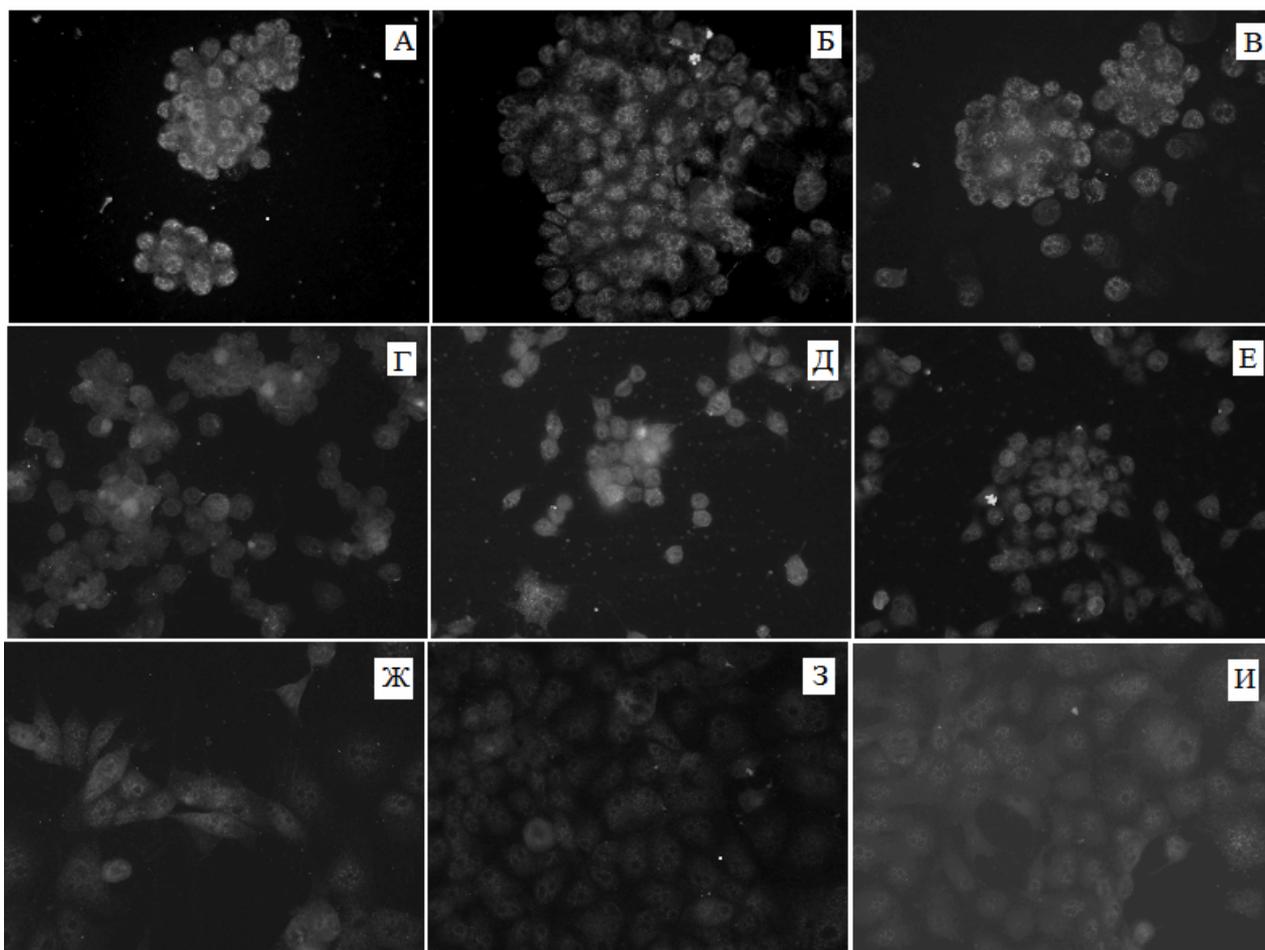


Рис. 4. Экспрессия EpCAM клетками гепатомы Зайдела. А – суспензионная линия; Б, В – клональные линии 1С и 10Е, соответственно; Г, Д, Е – клональные линии 3Н, 5F и 6Н, полученные из голоклонов, соответственно; Ж, З – клональные линии 1Е и 9С, полученные из мероклонов, соответственно; И – монослойная линия; 40х.

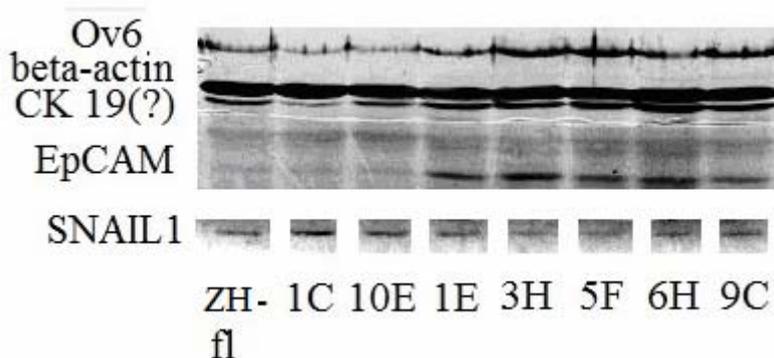


Рис. 5. Выявление маркеров дисдифференцировки гепатоцитов – EpCAM, Ov6 и SNAIL1 – с помощью метода иммуноблоттинга.

В то же время все антитела успешно взаимодействуют с маркерами дисдифференцировки при анализе клеточных лизатов с помощью метода иммуноблоттинга (рис. 5). В клетках клональных линий, полученных при клонировании монослойной линии, выявлена полоса с

Мол.м. 32 кДа, соответствующая ЕрСAM. При этом, несмотря на интенсивную флуоресценцию многоклеточных островков, антитела к ЕрСAM не реагируют с антигенами клеточных лизатов суспензионной линии и ее клонов.

При обработке блота антителами к Ovb в составе всех клеточных линий выявляется протеин с Мол.м. 56 кДа, соответствующий маркеру овальных клеток Ovb. По данным литературы цитокератин (СК) Ovb имеет общие эпитопы с СК19, который также синтезируется овальными клетками и тесно связан с повышенной инвазивностью и устойчивостью клеток к химиотерапевтическим препаратам. Показано, что антитела к Ovb также связываются с СК19, поэтому выявленная нами в клетках гепатомы Зайдела тонкая четкая полоса в области 40 кДа, по-видимому, соответствует СК19. При обработке блота антителами к SNAIL1 обнаруживается слабая полоса в области 36 кДа, соответствующая маркеру эпителиально-мезенхимного перехода. Однако не выявлены различия в экспрессии SNAIL1 клетками суспензионных и монослойных линий, или между клональными линиями голо- и мероклонов

Определение активности секретируемых матриксных металлопротеиназ.

Активность ММП 9, 2 и 1 определяли в культуральной среде на 4-е сутки культивирования клеток с помощью метода зимографии на желатине и казеине, соответственно (рис. 6).

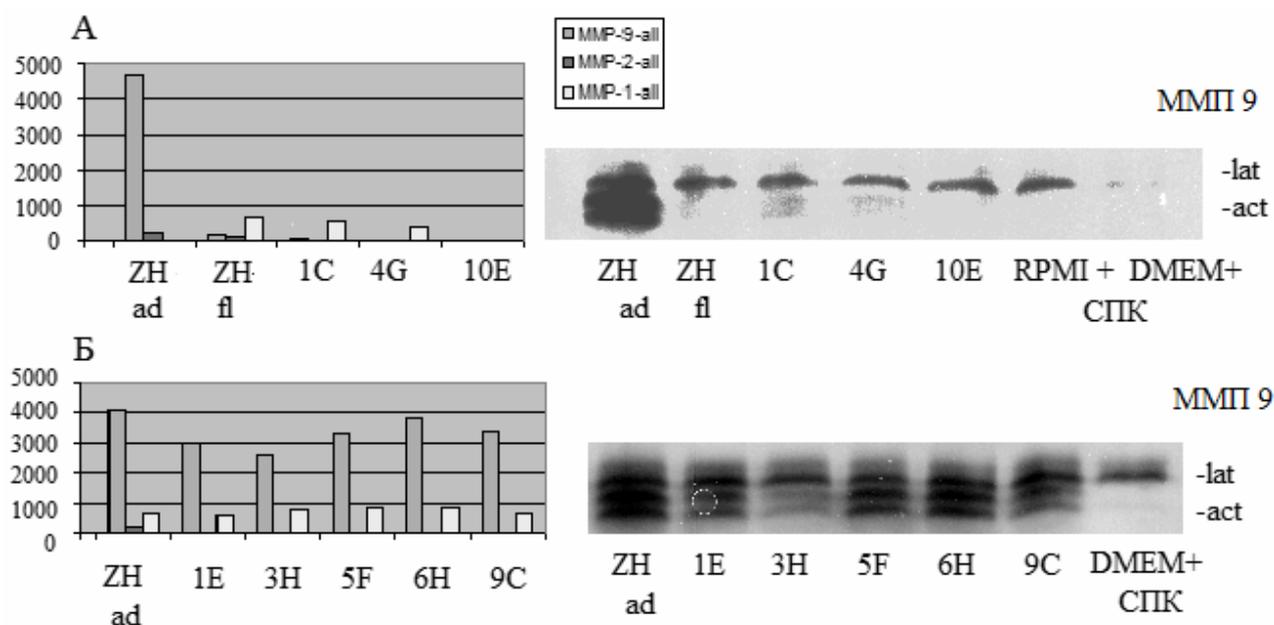


Рис. 6. Определение активности матриксных металлопротеиназ с помощью метода зимографии.

Выявлены принципиальные различия в активности одной из трех протеиназ – ММП 9 – для клеток монослойных и суспензионных линий гепатомы Зайдела: клетки монослойной линии и ее клонов характеризуются высокой суммарной активностью ММП 9 (рис. 6, Б – диаграмма) за счет активных форм ММП 9 (рис. 6, Б – зимограмма), тогда как в культуральной среде

флотирующих островков суммарная активность ММП 9 практически отсутствует (рис.6, А - диаграмма, зимограмма). Важно также отметить, что клетки клональных линий, полученных из голо- и мероклонов, не только характеризуются очень высоким уровнем активности ММП 9, но и близки между собой по этому показателю.

Обсуждение

Для выявления в составе монослойной и суспензионной линий гепатомы Зайдела субпопуляций опухолевых стволовых клеток и их фенотипирования в нашей работе был использован “тест на голоклоны”. Мероклоны изучены в меньшей степени, и данные по их клеточному составу и опухолеиницирующему потенциалу противоречивы. Клонирование клеток монослойных и флотирующих линий гепатомы Зайдела с помощью метода предельных разведений демонстрирует значительную гетерогенность клеточного состава метастатической опухоли. Впервые обнаружено формирование клетками суспензионной линии неприкрепляющихся сферических клонов, а также мероклонов, клетки которых стремятся к откреплению от субстрата. Важно отметить, что сферические клоны обладают более высоким уровнем туморогенности, чем голоклоны. На наш взгляд, сферические клоны являются аналогами голоклонов, формирующихся при клонировании монослойных культур кератиноцитов и опухолевых клеток иного происхождения, и содержат субпопуляцию злокачественных опухолеиницирующих клеток. Можно ожидать, что в клетках суспензионных линий, в которых ЕрСAM не определяется с помощью метода иммуноблоттинга, происходит регулируемый внутримембранный протеолиз ЕрСAM с образованием низкомолекулярных фрагментов ЕрICD (6кДА), которые мигрируют в низкомолекулярную область геля.

Все клетки гепатомы Зайдела синтезируют ЕрСAM, Оv6 и СК19, что, по-видимому, указывает на происхождение опухоли от низкодифференцированных овальных клеток. Также во всех клетках монослойных и суспензионных линий, голо- и мероклонов обнаружен синтез SNAIL1, при том, что активация ММП 9 – другого маркера эпителиально-мезенхимного перехода – связана только с монослойными линиями гепатомы. По данным литературы существуют SNAIL1-негативные и SNAIL1-позитивные линии опухолевых клеток с цитоплазматической локализацией SNAIL1. Процесс эпителиально-мезенхимного перехода связан с ядерной экспрессией SNAIL1, но даже при низком его содержании в цитоплазме существует возможность быстрого ответа на изменившееся микроокружение с модуляцией SNAIL-чувствительных генов [14]. Требуются дальнейшие исследования для решения вопроса об участии клеток монослойных линий в процессе метастазирования.

Представленные в работе данные позволяют сделать заключение о гетерогенности субпопуляции опухолеиницирующих клеток гепатомы Зайдела, клетки которой различаются по адгезивности, характеру экспрессии EpCAM и активности ММП 9.

Работа выполнена при финансовой поддержке, предоставленной Российским фондом фундаментальных исследований (проект 12-04-0115-а).

Список литературы

1. **Зайдела Ф.** Применение асцитной гепатомы для изучения цитологии рака. Вопросы онкологии, 1963, 9(5): 25–33.
2. **Терюкова Н.П., Миргородская О.А., Серебрякова М.В., Иванов В.А.** Выявление и идентификация опухолеассоциированных антигенов в составе фракции, обогащенной плазматическими мембранами клеток асцитной гепатомы Зайдела. Цитология, 2010, 52(10): 827–834.
3. **Schmelzer E., Wauthier E., Reid L.M.** The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. Stem Cells, 2006, 24:1852–1858.
4. **Yamashita T., Budhu A., Forgues M., Wang X.W.** Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. Cancer Res., 2007, 67:10831–10839.
5. **Yang M., Li S.N., Anjum K.M., Gui L.X., Zhu S.S., Liu J., Chen J.K., Liu Q.F., Ye G.D., Wang W.J., Wu J.F., Cai W.Y., Sun G.B., Liu Y.J., Liu R.F., Zhang Z.M., Li B.A.** A double-negative feedback loop between Wnt- β -catenin signaling and HNF4 α regulates epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. J. Cell Sci., 2013, 126 (Pt 24): 5692–5703.
6. **Lin C.W., Liao M.Y., Lin W.W., Wang Y.P., Lu T.Y., Wu H.C.** Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer. J. Biol. Chem., 2012, 287: 39449–39459.
7. **Munz M., Baeuerle P.A., Gires O.** The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. Cancer Res., 2009, 69: 5627–5629.
8. **Yamashita T., Ji J., Budhu A., Forgues M., Yang W., Wang H.Y., Jia H., Ye Q., Qin L.X., Wauthier E., Reid L.M., Minato H., Honda M., Kaneko S., Tang Z.Y., Wang X.W.** EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. Gastroenterology, 2009, 136: 1012–1024.
9. **Kimura O., Takahashi T., Ishii N., Inoue Y., Ueno Y., Kogure T., Fukushima K., Shiina M., Yamagiwa Y., Kondo Y., Inoue J., Kakazu E., Iwasaki T., Kawagishi N., Shimosegawa T., Sugamura K.** Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. Cancer Sci. 2010, 101: 2145–2155.
10. **Терюкова Н.П., Блинова Г.И., Иванов В.А.** Клетки гепатомы Зайдела при культивировании in vitro. Цитология, 2013, 55(1): 36–44.
11. **Li H., Chen X., Calhoun-Davis T., Claypool K., Tang D.G.** PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. Cancer Res., 2008, 68:1820–1825.
12. **Воронкина И.В., Кирпичникова К.М., Смагина Л.В., Гамалей И.А.** Изменение активности матриксных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мыши при действии антиоксидантов. Цитология, 2008, 50 (10): 877–881.
13. **Barrandon Y., Green H.** Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84: 2302–2306.

14. Domínguez D., Montserrat-Sentís B., Virgós-Soler A., Guaita S., Grueso J., Porta M., Puig I., Baulida J., Francí C., García de Herreros A. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.*, 2003, 23: 5078–5089.

ВЫЯВЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКОЙ СТАДИИ АВТОНОМНОСТИ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

Н.Н. Круглова, А.Е. Зинатуллина

Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Kruglova@anrb.ru

В экспериментальных условиях эмбриокультуры *in vitro* с использованием безгормональной питательной среды выявлено, что сформированный зародыш пшеницы (17.5–20 сут после опыления, длина 2,1–2,2 мм), характеризующийся наличием всех типичных для зародышей злаков органов, соответствует стадии автономности.

Ключевые слова: эмбриокультура *in vitro*, автономность зародыша, яровая мягкая пшеница.

В многочисленных исследованиях эмбриогенеза растений установлено, что развитие зародыша растений представляет собой единый процесс, в результате которого из одной исходной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциями взрослого растения. Вместе с тем в своем развитии зародыш проходит через ряд дискретных стадий (или, в терминологии различных авторов – периодов, фаз, этапов), различающихся по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, значению для дальнейшего развития растения. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию как морфогенетического потенциала зародыша, так и онтогенетической программы особи в целом [1].

Системный подход к дифференциации зародыша с учетом морфогенетических и морфофизиологических корреляций позволил выявить ряд критических стадий эмбриогенеза растений, во время которых закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша. Последовательные стадии развития зародыша рассматриваются как процесс, при котором в различные критические точки времени и пространства происходит переключение на