

**СОПОСТАВЛЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
КЛОНАЛЬНЫХ ЛИНИЙ МОНОСЛОЙНОЙ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА С ПРИЗНАКАМИ
СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК**

***Н.П. Терюкова, Е.И.Сахенберг, В.А.Иванов, С.А.Снопов**

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [*npter@yandex.ru](mailto:npter@yandex.ru).

Продолжено исследование клональных линий гепатомы Зайдела, полученных нами после эксплантации в культуру клеток асцитной формы опухоли. Ранее мы показали, что клетки линий 5F и 1E происходят из голоклонов и мероклонов, соответственно, и проявляют признаки опухолевых стволовых и опухолевых прогениторных клеток (ОСК и ОПК). По данным морфометрического анализа клеточные линии значительно различаются по морфологии и площади клеток, по размерам ядер и по ядерно-цитоплазматическому отношению. С помощью теста на зарастание “раны” и видеомикроскопии мы впервые выявили принципиальные отличия в миграционных способностях ОСК и ОПК: клетки линии 5F отличаются автономным поведением и используют амебоидный тип движения для активной миграции в “рану”; клетки-предшественники линии 1E формируют плотные межклеточные контакты, и быстрое зарастание “раны” происходит за счет коллективной миграции клеток. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что мигрирующие клетки линии 5F представляют собой популяцию метастатических ОСК. Кроме того, нами впервые выявлена в клетках культивируемых линий ядерная локализация внутриклеточного домена молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), что свидетельствует об активации EpcAM-сигнального пути в ОСК и ОПК метастатической опухоли.

Ключевые слова: гепатома, метастазирование, опухолевые стволовые клетки, молекула адгезии эпителиальных клеток, клеточная миграция, амебоидный тип движения.

Метастазирование является основной и пока неразрешимой проблемой в борьбе с онкологическими заболеваниями. По существующим представлениям диссеминация опухолевых клеток в организме осуществляется за счет наиболее агрессивной субпопуляции опухолеиницирующих клеток с высокой миграционной активностью – метастатических опухолевых стволовых клеток (мОСК), и включает ряд дискретных шагов, которые могут быть объединены понятием “метастатического каскада” [1, 2, 3, 4]. Для опухолей эпителиального

происхождения процесс метастазирования начинается с эпителиально-мезенхимного перехода, который связан с приобретением клетками миграционного фенотипа – ослаблением межклеточных контактов, потерей клетками апикально-базолатеральной полярности, подавлением экспрессии эпителиальных маркеров и усилением мезенхимных. Проникновение мигрирующих ОСК в сосудистое русло приводит к появлению циркулирующих опухолевых клеток, которые с током крови или лимфы разносятся по организму и оседают в отдаленных органах с образованием метастазов.

Опухолеассоциированный антиген ЕрСAМ представляет собой трансмембранный гликопротеид с мол. массой 32—42 кДа, гиперэкспрессия которого, как правило, наблюдается в опухолевых клетках эпителиального происхождения и ОСК [5]. В норме ЕрСAМ используется в качестве маркера плюрипотентных эмбриональных и соматических стволовых клеток. В большинстве органов ЕрСAМ синтезируется клетками эпителия и локализуется на базолатеральной поверхности эпителиоцитов, где выполняет функцию молекулы межклеточной гомотипической адгезии [6]. Другая недавно установленная функция ЕрСAМ связана с поддержанием пролиферативной активности и низкодифференцированного статуса эмбриональных стволовых клеток [7,8] и ОСК [9]. Активация ЕрСAМ-сигнального пути [10] начинается с регулируемого внутримембранного протеолиза ЕрСAМ, в результате которого эктодомен ЕрСAМ (ЕрЕХ) отщепляется в межклеточную среду, а эндодомен ЕрlCD – в цитоплазму, где в комплексе с FHL2, бета-катенином и Lef-1 перемещается в ядро и связывается с ДНК для непосредственного участия в регуляции транскрипции генов репрограммирующих факторов – с-Мус, Oct4, Nanog и Sox2 [11,12,13].

Вопрос об экспрессии ЕрСAМ клетками в ходе метастатического процесса обсуждается. Получены данные, что гиперэкспрессия ЕрlCD значительно увеличивает миграционную активность и инвазивность опухолевых клеток [14]. В ряде исследований показано, что экспрессия эпителиальных маркеров, включая ЕрСAМ, на поверхности циркулирующих опухолевых клеток снижается, тогда как повышается уровень экспрессии мезенхимных маркеров [15,16, 17, 18].

В печени синтез ЕрСAМ осуществляется в низкодифференцированных клетках гепацитарного ряда – гепатобластах и овальных клетках, и прекращается в зрелых гепатоцитах [19]. Примерно 35% гепатоцеллюлярных карцином экспрессируют ЕрСAМ, что, по данным Ямашито с соавт. [20], указывает на их происхождение от низкодифференцированной ЕрСAМ-позитивной клетки-прародительницы. Отмечается

повышенная туморогенность ЕрСAМ-позитивных клеток, их способность к самообновлению и дифференцировке [21].

Ранее мы идентифицировали ЕрСAМ в клетках асцитной гепатомы Зайдела крыс, которая является метастатической опухолью и может служить адекватной моделью для изучения мОСК. Далее мы эксплантировали клетки в культуру и клонировали с использованием метода предельных разведений [22]. В результате экспансии образовавшихся голоклонов и мероклонов нами были получены клональные линии с характеристиками ОСК и ОПК, соответственно [23].

С целью углубленного изучения биологии метастатических ОСК и ОПК в настоящей работе мы продолжили исследование клональных линий гепатомы Зайдела – морфологии клеток, локализации в них ЕрСAМ и миграционной активности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на клетках двух клональных линий 5F и 1E гепатомы Зайдела крыс, полученных в нашей лаборатории в 2010—2011 гг. Для этого клетки перевиваемой асцитной гепатомы Зайдела были эксплантированы в культуру и путем длительного отбора разделены на две клеточные линии – монослойную и суспензионную. В результате клонирования монослойной линии с помощью метода предельных разведений были получены 3 голоклона и 2 мероклона, которые дали начало клональным линиям с характеристиками ОСК (линии 3H, 5F и 6H) и ОПК (линии 1E и 9C). Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы Sus-Biol (Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия), в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Для проведения морфометрического анализа клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали смесью Никифорова (смесь этанола с диэтиловым эфиром в соотношении 1:1) в течение 15 мин и промывали проточной водой. Затем клетки окрашивали гематоксилином (20 мин) и 0,3% эозином (15 сек), хорошо промывая клетки после каждой процедуры. Препараты обезживали в 96% спирте в течение 15 сек и исследовали с помощью микроскопа LSM 5 Pascal (10x, 40x). Площадь окрашенных ядер и клеток определяли с помощью программы анализа изображений ImageJ (NIH, USA). Для каждой клональной линии измеряли не менее 100 клеток и проводили статистическую обработку данных. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) для клеток каждой линии рассчитывали по формуле:

$$\text{ЯЦО} = \text{Средняя площадь ядер} / (\text{Средняя площадь клеток} - \text{средняя площадь ядер}).$$

Достоверность различий средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $P < 0,05$.

Локализацию EpCAM в опухолевых клетках определяли с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с последующей лазерной сканирующей конфокальной микроскопией подготовленных препаратов. Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали в течение 15 мин в 4% растворе параформальдегида (Santa-Cruz Biotechnology, USA), приготовленного на ФБС (10 mM фосфатный буфер, 150 mM NaCl, pH 7.4) и пермеабелизировали с помощью 0,5% раствора Тритона X-100. Для разведения антител и промывки препаратов использовали ФБС, содержащий 0,1% Твин-20. Клетки обрабатывали первичными козлиными антителами A-20 (Santa-Cruz Biotechnology, USA), полученными к внутриклеточному С-терминальному домену EpCAM, при титре 1:50 в течение ночи при 4°C (в контрольных образцах первичные антитела не применяли). Обработку клеток вторичными ослиными антителами, конъюгированными с FITC (Santa-Cruz Biotechnology, USA), проводили при титре 1:100 в течение 1 ч в темноте. Для визуализации ядер ДНК клеток окрашивали DAPI (Santa-Cruz Biotechnology, USA) в течение 1 мин при концентрации 1 мкг/мл. Препарат заключали в среду Fluoroshield (Sigma, USA), и иммунофлуоресцентные изображения клеток получали на электронном конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 с использованием лазеров с длинами волн 488 и 543 нм и масляно-иммерсионного объектива 40х.

Миграционную способность клеток оценивали с помощью теста на “заращение раны” и микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оснащенного оборудованием для длительного прижизненного наблюдения за культивируемыми клетками. Клетки выращивали в чашке Петри с диаметром 35 мм (Nunk, Дания) примерно до 90%-й конфлюэнтности, наносили на монослой “рану” по диаметру чашки с помощью пластикового наконечника для автоматического дозатора, открепившиеся клетки удаляли промывкой чашек и добавляли свежую среду DMEM с 10% СПК. Чашку Петри помещали на столик микроскопа под объектив Plan-Neofluar X10/0,25 и регистрировали изображения клеток с помощью цифровой камеры AxioCam HRm с разрешением 1388x1040 пикселей в режиме цейтраферной съемки в течение 24 час через каждые 2 мин. Анализ изображений проводили в видеоформате Avi и JPEG.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрический анализ клеточных препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином. Клетки клональных линий 5F и 1E происходят от клеток-прародительниц клонов с

разным уровнем цитодифференцировки – опухолеиницирующей (стволовой) клетки и прогениторной клетки, относящейся к популяции ранних транзитных амплифицированных клеток. После пересева 5F-клетки растут клонами, от которых отделяются единичные клетки (рис.1, А, В). В пролиферирующих клонах клетки плотно контактируют друг с другом, но с замедлением роста образуется монослой из клеток неправильной формы, контакты между которыми преимущественно осуществляются за счет тонких выростов. Клетки линии 1Е формируют монослой, в котором различаются зоны мелких и крупных клеток полигональной формы, плотно примыкающих друг к другу и образующих небольшие трабекулы; клетки и ядра различаются по размерам и форме, присутствуют многоядерные клетки-гиганты (рис.1, Б, Г).

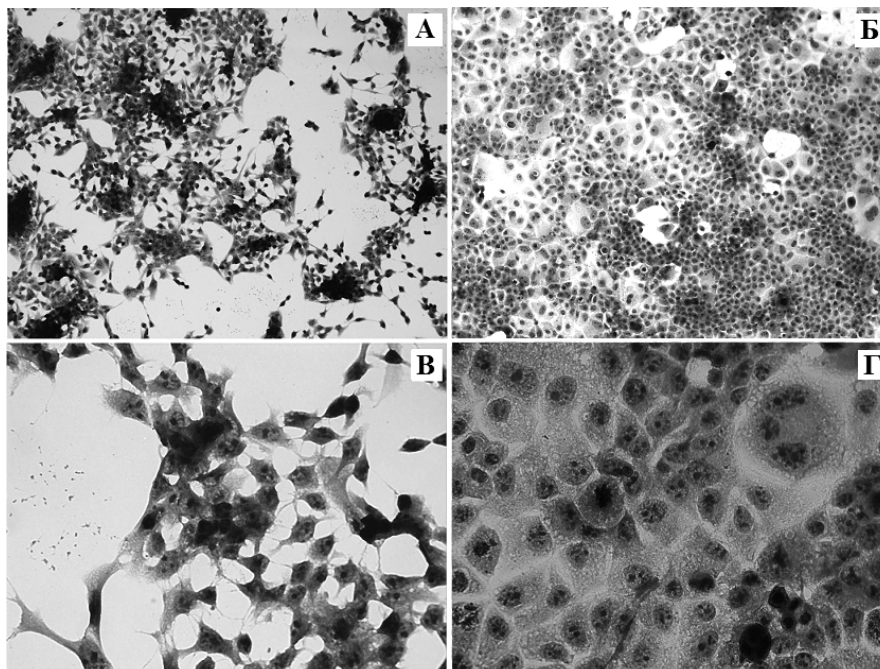


Рис.1. Препараты клеток клональных линий, окрашенные эозином и гематоксилином:

А, В – 5F линия, полученная из голоклона, 10х и 40х, соответственно; Б, Г – 1Е линия, полученная из мероклона, 10х и 40х, соответственно.

По данным морфометического анализа клетки линии 1Е статистически достоверно ($P < 0,05$) превосходят по размерам клетки линии 5F: примерно в 3 раза по площади клеток, и в 1,8 раза – по площади ядер. Рассчитанные нами средние значения ЯЦО (табл.) обратно коррелируют с уровнем дифференцировки клеток: высокие значения ЯЦО характеризуют низкодифференцированные ОСК линии 5F, в которых ядра занимают большую часть клеток; в

коммитированных клетках-предшественниках преобладает цитоплазма и ЯЦО снижается. Дополнительные расчеты, проведенные для отдельных клеток линии 1Е, показали, что ЯЦО варьирует в широких пределах от 1,4 для мелких клеток до 0,2 для крупных, причем клетки различаются между собой преимущественно по площади цитоплазмы.

Таблица.

Морфометрические показатели клеток клональных линий гепатомы Зайдела

Линия клеток	S клеток (в пикс.)	S ядер (в пикс.)	ЯЦО
1Е	48715,4±2687,40	18890,7±788,82	0,63
5F	16076,4±655,06 *	10605,9±493,34 *	1,94

* - отмечены статистически достоверные отличия между линиями, $P < 0,05$.

Определение локализации ЕрСAM. Ранее с помощью поликлональных антител к ЕрICD мы выявили внутриклеточную локализацию ЕрСAM в культивируемых клетках гепатомы Зайдела. В клетках монослойных линий флуоресцентная метка диффузно распределялась в цитоплазме и отсутствовала в области наружных мембран [23]. Для решения вопроса об экспрессии и локализации ЕрСAM в клетках метастатической опухоли и ее роли в поддержании низкодифференцированного статуса клеток мы продолжили исследование с использованием возможностей конфокальной микроскопии. При послойном сканировании клеток линий 5F и 1Е, обработанных антителами к ЕрICD, видно слабое, но специфическое окрашивание цитоплазмы (уровень флуоресценции выше, чем в контрольных препаратах). Вместе с тем в ядрах клеток обеих линий обнаружено интенсивное специфическое свечение типа флуоресцирующих “глыбок” или светящихся зерен, преимущественно концентрирующихся вокруг ядрышек (рис. 2). По нашим наблюдениям в делящихся клетках флуоресцирующие “глыбки” в ядрах не определяются, но при этом усиливается диффузное свечение цитоплазмы вокруг формирующихся ядер (рис. 2, Д, Е). Обнаружение ядерной локализации ЕрСAM позволяет сделать заключение об активации ЕрСAM-сигнального пути в низкодифференцированных клетках гепатомы Зайдела и непосредственного участия ЕрICD в регуляции транскрипционной активности клеток.

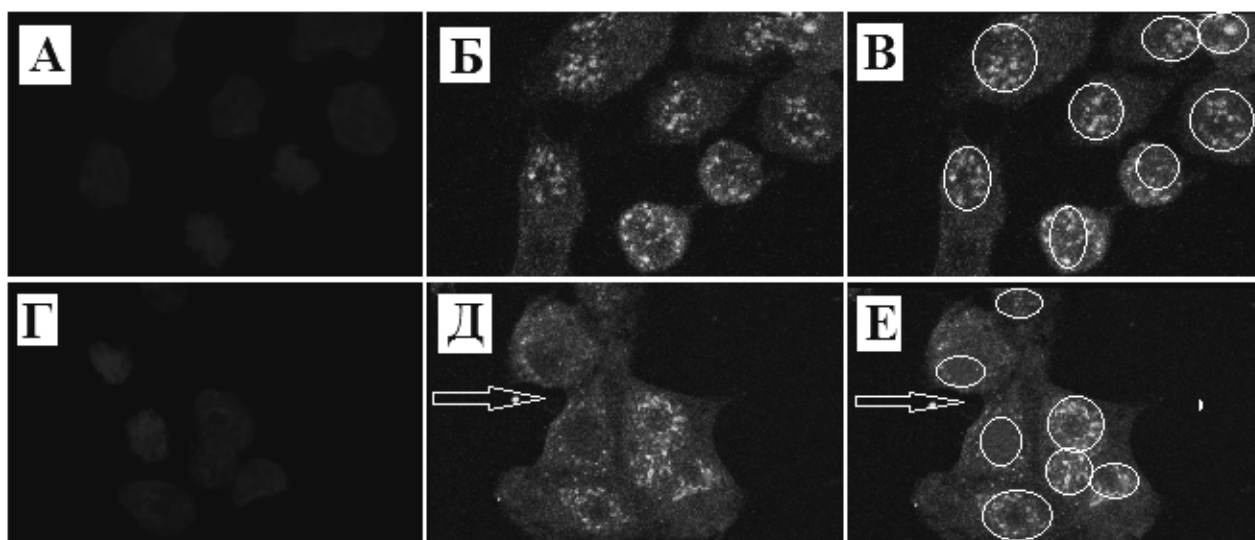


Рис.2. Выявление EpCAM в ядрах клеток линии 5F (А-В) и 1Е (Г-Е).

А и Г – ядра, окрашенные DAPI; Б и Д – клетки, обработанные антителами к EpICD; В и Е – совмещение окраски ядер DAPI с EpCAM-флуоресценцией. Стрелками указаны разделившиеся клетки. Кругами обведены ядра клеток.

Определение миграционной способности опухолевых стволовых клеток и клеток-предшественников метастатической гепатомы Зайдела.

Предполагается, что метастатические ОСК отличаются от субпопуляции опухолеиницирующих клеток способностью к миграции [24]. Изучение подвижности клеток линий 5F и 1Е мы проводили с помощью теста на “заращение раны”. Изменения в количестве клеток в ране, их местоположение и форму фиксировали с помощью цифровой фотокамеры с 2-х минутным интервалом в течение 24 ч. При анализе полученного материала в видео и фото форматах (рис. 3, представлены одни и те же участки раны с интервалом примерно в 4,5 ч) видно, что клеточные линии принципиально различаются между собой по миграционному поведению.

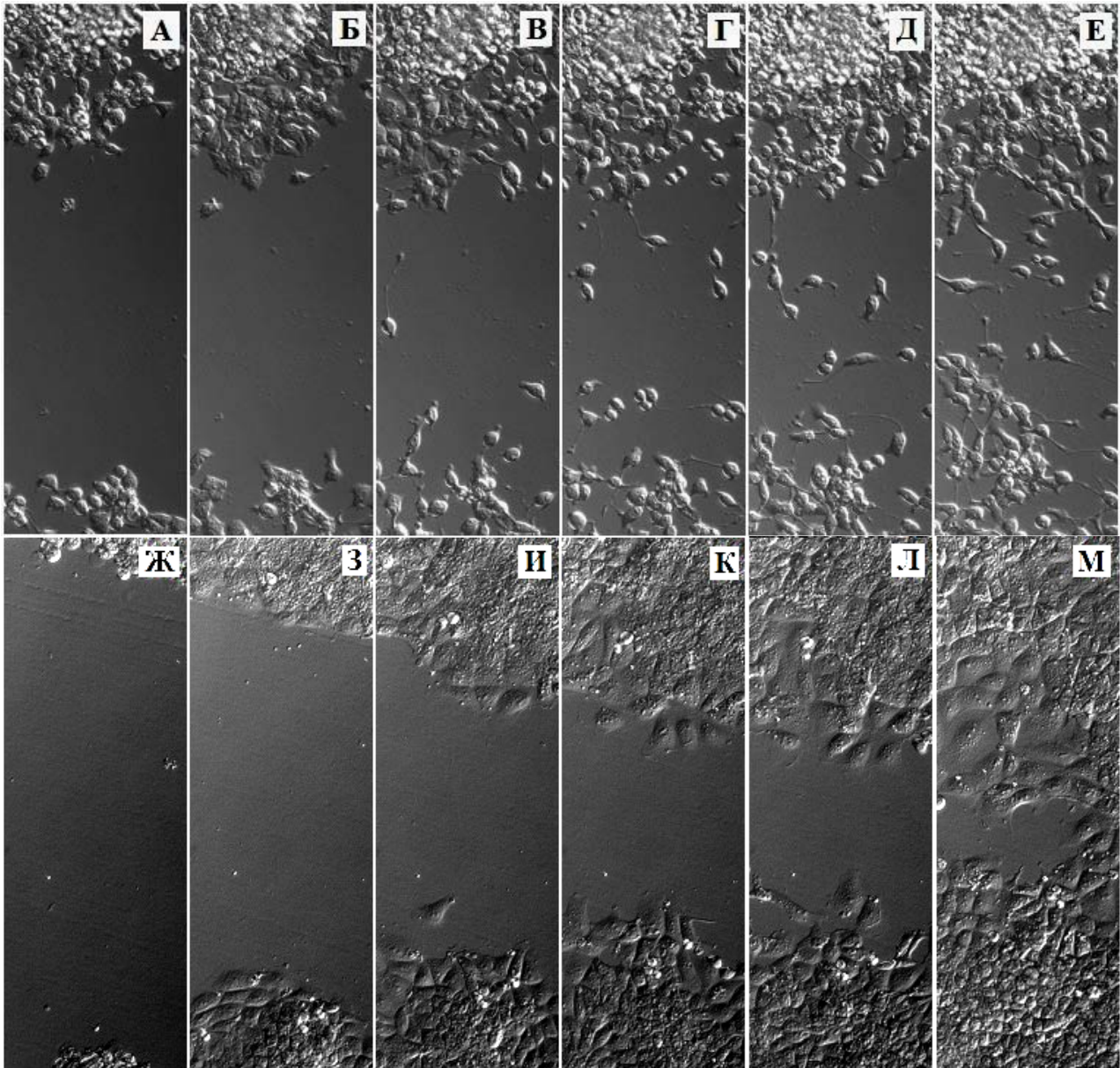


Рис.3. Тест на “заращение раны”: преимущественно амебоидный тип миграции клеток линии 5F (А-Е) и коллективная миграция клеток линии 1Е (Ж-М).

Края “раны” клеточной линии 5F (А-Е) начинают незначительно сближаться примерно через 4 ч с начала эксперимента. Это движение сопровождается дезинтеграцией клеточного монослоя по краям “раны” и миграцией клеток в свободное пространство. Требуется проведение дополнительного анализа механизмов миграции клеток, но уже сейчас можно говорить о сочетании мезенхимного типа миграции с амебоидным типом при преобладании последнего и о быстром переходе от одного механизма движения к другому. Наблюдается образование клетками псевдоподий (ламеллиподий и филоподий) и “хвостов” –

цитоплазматических образований, которые вытягиваются из клеток в начале их передвижения, по-видимому, из-за высокой адгезии клеток к субстрату. Обращает на себя внимание высокая миграционная активность клеток, характерная для амебоидного типа движения. Кроме того, подтверждаются данные морфологического анализа об отсутствии плотного контакта между клетками в монослой у линии 5F - клетки при появлении свободного пространства начинают в него мигрировать.

Иная картина складывается для клеток линии 1E. Уже в первые минуты наблюдения края «раны» начинают движение навстречу друг другу. При этом отмечается коллективная миграция клеток, когда клетки переднего края тянут за собой остальной монослой, клетки которого находятся в плотном контакте. При этом трудно сказать, в какой степени это процесс миграции, а в какой степени сближение краев происходит за счет клеточной пролиферации. По нашим наблюдениям, пролиферативный процесс захватывает зоны мелких клеток, из которых клетки выдвигаются в «рану» и увеличиваются в размерах. В случае клеток линии 1E одиночные клетки практически не покидают монослой и в «рану» не мигрируют, а те, которые появляются в «ране» – через мезенхимно-эпителиальный переход примыкают к монослою.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточные линии, полученные из опухолей эпителиального происхождения, при клонировании *in vitro* формируют колонии сходные по морфологии с колониями, которые продуцируют стволовые и транзитные амплифицированные клетки-предшественники нормального эпителия – голоклоны, меро- и параклоны [25]. Нам известны три исследования, в которых с целью углубленного изучения клеток с характеристиками ОСК были получены клеточные линии из голоклонов [26, 27, 28]. При этом не было создано ни одной линии клеток из мероклонов и, тем более, из параклонов. Нам удалось получить клеточные линии из голо- и мероклонов монослойной линии гепатомы Зайдела, которые пережили неоднократную криозаморозку и более 30 пассажей, сохранив присущие своему происхождению характеристики. Клеточные популяции 5F и 1E отличаются по существу. Клетки линии 5F (обладающие опухолеиницирующими свойствами и индуцирующие развитие асцитной формы опухоли при внутрибрюшинном введении беспородным крысам) не обладают морфологическими признаками эпителиальных клеток, они не формируют плотного монослоя и отличаются определенной автономностью. Наблюдение за поведением клеток в видеоформате показывает их высокую миграционную активность, причем передвижение клеток осуществляется преимущественно по амебоидному типу. Совсем иной тип клеточной

популяции продуцируют мероклоны. Клетки линии 1Е не туморогенны, что было показано ранее, образуют монослой, в котором клетки плотно примыкают друг к другу и мигрируют в «рану» единым фронтом. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что клеточная линия 5F представлена метастатическими ОСК, миграция которых осуществляется по амебоидному типу.

Недавно в серии работ на биопсийном материале опухолей эпителиального происхождения с использованием антител к EpEX и EpICD было установлено, что плохой прогноз заболевания и развитие метастатического процесса коррелируют со сменой мембранной локализации EpCAM на ядерную [29, 30, 31, 32]. При этом, по мнению авторов, иммуноцитохимическое исследование ткани не позволяло однозначно говорить о ядерной локализации EpICD.

В нашей работе впервые выявлена ядерная локализация EpICD в культивируемых клетках. Тот факт, что эти клеточные линии были получены в результате эксплантации клеток метастатической опухоли, подтверждает формирующееся представление об активации EpCAM-сигнального пути в ходе метастатического процесса.

Авторы статьи выражают искреннюю благодарность заведующему Лабораторией йонных механизмов клеточной сигнализации, д.б.н. Ю.А. Негуляеву за предоставленную возможность и неоценимую помощь в проведении исследований на микроскопе AxioObserver.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Mimeault M., Batra S.K.** New advances on critical implications of tumor- and metastasis-initiating cells in cancer progression, treatment resistance and disease recurrence. *Histol. Histopathol.* 2010, 25:1057-1073.
2. **Baccelli I., Trumpp A.** The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J. Cell Biol.* 2012, 198: 281-293.
3. **Shiozawa Y., Nie B., Pienta K.J., Morgan T.M., Taichman R.S.** Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacol Ther.* 2013, 138: 285-293.
4. **Geiger T.R., Peeper D.S.** Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009, 1796: 293-308.
5. **Imrich S., Hachmeister M., Gires O.** EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh. Migr.* 2012, 6: 30-38.
6. **Litvinov S.V., Velders M.P., Bakker H.A., Fleuren G.J., Warnaar S.O.** Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 1994, 125: 437-446.
7. **González B., Denzel S., Mack B., Conrad M., Gires O.** EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells.* 2009, 27:1782-1791.

8. **Lu T.Y., Lu R.M., Liao M.Y., Yu J., Chung C.H., Kao C.F., Wu H.C.** Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 2010, 285: 8719-8732.
9. **Schnell U., Cirulli V., Giepmans B.N.** EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013, 1828:1989-2001.
10. **Oishi N., Yamashita T., Kaneko S.** Molecular biology of liver cancer stem cells. *Liver Cancer.* 2014, 3: 71-84.
11. **Hachmeister M., Bobowski K.D., Hogg S., Dislich B., Fukumori A., Eggert C., Mack B., Kremling H., Sarrach S., Coscia F., Zimmermann W., Steiner H., Lichtenthaler S.F., Gires O.** Regulated intramembrane proteolysis and degradation of murine epithelial cell adhesion molecule mEpCAM. *PLoS One.* 2013, 8 (8): e 71836.
12. **Munz M., Baeuerle P.A., Gires O.** The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 2009, 69: 5627-5629.
13. **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.
14. **Jachin S., Bae J.S., Sung J.J., Park H.S., Jang K.Y., Chung M.J., Kim D.G., Moon W.S.** The role of nuclear EpICD in extrahepatic cholangiocarcinoma: association with β -catenin. *Int. J. Oncol.* 2014, 45 (2): 691-698.
15. **Kallergi G., Papadaki M.A., Politaki E., Mavroudis D., Georgoulas V., Agelaki S.** Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2011, 13 (3): R59.
16. **Gorges T.M., Tinhofer I., Drosch M., Röse L., Zollner T.M., Krahn T., von Ahsen O.** Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2012, 12: 178.
17. **Gires O., Stoecklein N.H.** Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol. Life Sci.* 2014, 71:4393-4402.
18. **Raimondi C., Nicolazzo C., Gradilone A.** Circulating tumor cells isolation: the "post-EpCAM era". *Chin. J. Cancer Res.* 2015, 27: 461-470.
19. **Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM.** The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells.* 2006, 24: 1852-1858.
20. **Yamashita T., Forgues M., Wang W., Kim J.W., Ye Q., Jia H., Budhu A., Zanetti K.A., Chen Y., Qin L.X., Tang Z.Y., Wang X.W.** EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008, 68: 1451-1461.
21. **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 (3): 1012-1024.
22. **Терюкова Н.П., Блинова Г.И., Иванов В.А.** Клетки гепатомы Зайдела при культивировании in vitro. *Цитология.* 2013, 55 (1): 36-44.
23. **Терюкова Н.П., Воронкина И.В., Смагина Л.В., Иванов В.А.** Клетки гепатомы Зайдела в культуре: клонирование и характеристика клональных линий. В сб.: Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2015, 31: 25-37.
24. **Brabletz T., Jung A., Spaderna S., Hlubek F., Kirchner T.** Migrating cancer stem cells — an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer.* 2005, 5: 744-749.

25. Locke M., Heywood M., Fawell S., Mackenzie I.C. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005, 65: 8944-8950.
26. Miloszewska J., Gos M., Przybyszewska M., Trembacz H., Koronkiewicz M., Janik P. Mouse sarcoma L1 cell line holoclones have a stemness signature. *Cell Prolif.* 2010, 43: 229-234.
27. Rao G.H., Liu H.M., Li B.W., Hao J.J., Yang Y.L., Wang M.R., Wang X.H., Wang J., Jin H.J., Du L., Chen Q. Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs. *Acta Pharmacol. Sin.* 2013, 34: 793-804.
28. Yao J., Xie J., Li J., Wei X., Yang Y., Chen H. Establishment of subseries cell lines from tongue cancer single cell and detection of cancer stem cell markers. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2013, 31: 86-90.
29. Ralhan R., He H.C., So A.K., Tripathi S.C., Kumar M., Hasan M.R., Kaur J., Kashat L., MacMillan C., Chauhan S.S., Freeman J.L., Walfish P.G. Nuclear and cytoplasmic accumulation of Ep-ICD is frequently detected in human epithelial cancers. *PLoS One.* 2010, 5: e14130.
30. Ralhan R., Cao J., Lim T., Macmillan C., Freeman J.L., Walfish P.G. EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer.* 2010, 10: 331.
31. Fong D., Moser P., Kasal A., Seeber A., Gastl G., Martowicz A., Wurm M., Mian C., Obrist P., Mazzoleni G., Spizzo G. Loss of membranous expression of the intracellular domain of EpCAM is a frequent event and predicts poor survival in patients with pancreatic cancer. *Histopathology.* 2014, 64: 683-692.
32. Fong D., Seeber A., Terracciano L., Kasal A., Mazzoleni G., Lehne F., Gastl G., Spizzo G. Expression of EpCAM(MF) and EpCAM(MT) variants in human carcinomas. *J. Clin. Pathol.* 2014, 67: 408-414.

КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ ЧЕЛОВЕКА ESCV-304 КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И АПОПТОЗ КЛЕТОК ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ ГРИППА А И В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Т.Д. Смирнова¹, С.С. Смирнова^{1,2}, К.В. Сивак¹, Е.М. Еропкина¹, М.Ю. Еропкин¹

¹ФГБУ НИИ гриппа МЗ России, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, cellcultures@influenza.spb.ru

Заболевание, вызванное вирусом гриппа А, нередко носит тяжелый характер, особенно после наслоения вторичной бактериальной инфекции, при которой в кровь попадают эндотоксины бактерий, в том числе липополисахарид грамотрицательных бактерий. В связи с этим ведутся поиски новых лекарственных препаратов для лечения больных гриппом. Целью