

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЕТЕРООРГАНЫХ АНТИГЕНОВ ГЕПАТОМНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ

© Н. П. Терюкова, Г. И. Блинова, Ю. М. Розанов, В. А. Иванов

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: iva@mail.cytspb.rssi.ru*

Продолжено изучение антигенной дивергенции клеток гепатоцеллюлярных опухолей крыс, обусловленной экспрессией нормальных антигенов, присущих дефинитивным тканям почек, так называемых гетероорганных почечных антигенов. С помощью иммуносыворотки узкой специфичности в составе фракций плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела и культивируемых клеток гепатомы НТС выявлены гетероорганные антигены 110—115 и 125—130 кДа; гетероорганный антиген 75—80 кДа обнаружен только для клеток гепатомы Зайдела. Методами радиоизотопного анализа и точной ДНК-цитометрии показано участие этих гетероорганных антигенов в процессе клеточной пролиферации.

Ключевые слова: антигенная дивергенция, гепатома, канцерогенез, опухолеассоциированные антигены.

Принятые сокращения: ГК — гепатокарцинома, ИФА — иммуноферментный анализ, МА — моноклональные антитела, ПААГ — полиакриламидный гель, СПК — сыворотка плода коровы, ЭФР — эпидермальный фактор роста.

Феномен антигенной дивергенции опухолевых клеток является типичным проявлением нарушения цитодифференцировки при канцерогенезе и обусловлен экспрессией опухолеассоциированных гетероорганных антигенов, т. е. антигенов, свойственных нормальным дефинитивным тканям, не гомологичным исследуемой опухоли (Фель, 1990). Задача настоящего исследования заключается в выявлении, идентификации и определении биологической роли гетероорганных антигенов, присущих дефинитивной ткани почек и ассоциированных с плазматическими мембранами клеток гепатоцеллюлярных опухолей крыс. Работа выполнена с использованием иммуносыворотки узкой специфичности, полученной путем иммунизации кроликов полосами преципитации, образованными в агаре между лизатом фракции плазматических мембран гепатомы Зайдела и органоспецифической антипочечной сывороткой.

Ранее показано, что органоспецифическая антипочечная сыворотка, полученная против «клеточных теней» почек крысы, при обработке срезов почки в реакции непрямой иммунофлуоресценции вызывает яркое свечение в базальных мембранах и щеточной каемке извитых канальцев почки, тогда как при обработке срезов печени флуоресценции клеточных структур не наблюдается (Иванов и др., 1975). В то же время установлено активное взаимодействие антипочечной сыворотки с антигенами плазматических мембран клеток перевивных опухолей — крысиных гепатомы Зайдела и рабдомиосаркомы РА-2,

мышинной гепатомы 22а, а также монослойных культивируемых клеток крысы — гепатом НТС и 27, миогенных клеток L8 и L6J1 (Фель, 1990; Терюкова и др., 1996, 2007). Методом иммуноблоттинга показано, что антипочечная сыворотка взаимодействует с антигенами фракций плазматических мембран клеток крысиных гепатом Зайдела и НТС с мол. массами 200—210 и 43 кДа, идентифицированными методом масс-спектрометрии как ламинин-8/9 и β -актин соответственно (Тюряева и др., 2005; Терюкова и др., 2007). Кроме того, антипочечная сыворотка связывается с компонентом 116 кДа клеток гепатомы НТС и с компонентами 105—110 и 125—130 кДа клеток гепатомы Зайдела, которые в отдельных экспериментах сливаются в одну широкую полосу 105—130 кДа; в образцах клеток гепатомы Зайдела также определяется антиген 75—80 кДа, отсутствующий в интактных гепатоцитах и гепатоме НТС.

В свою очередь иммуносыворотка узкой специфичности в реакции непрямой иммунофлуоресценции вызывает свечение только базальных мембран извитых канальцев почек крысы и примерно 98 % клеток гепатомы Зайдела, не вызывая такового ни на срезах печени, ни на поверхности изолированных гепатоцитов интактных взрослых крыс (Иванов, 1982; Фель, 1990). Настоящее исследование направлено на дальнейшее изучение экспрессии гетероорганных антигенов, свойственных дефинитивной ткани почек, на поверхности гепатомных клеток с использованием иммуносыворотки узкой специфичности.

Материал и методика

В опытах использовали беспородных крыс-самцов массой 120—150 г (питомник «Рапполово» РАМН). Суспензию гепатоцитов из печени интактных крыс получали в соответствии с рекомендациями Назарова с сотрудниками (1989). Клетки перевивной гепатомы Зайдела осаждали из асцита крысы центрифугированием при 50 g в течение 15 мин и отмывали раствором Рингера (8.5 г NaCl, 0.25 г NaHCO₃ и 0.3 г CaCl₂ на 1 л H₂O, pH 7.0—7.2). Культура крысиных клеток гепатомы НТС получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург); клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки плода коровы (СПК).

Иммуносыворотку узкой специфичности получали против полос преципитации, образованных в агаре между лизатом фракции, обогащенной плазматическими мембранами гепатомы Зайдела, и органоспецифической антипочечной сывороткой. Исследования проводили с фракцией IgG, выделенной на CNBr-агарозе с иммобилизованным белком А, из иммуносыворотки узкой специфичности после 2-й реиммунизации кроликов. В качестве контроля использовали фракцию IgG, очищенную из сыворотки крови неиммунизированного кролика. Концентрация белка во фракциях IgG составляла около 5 мг/мл.

Для изучения поверхностных антигенов иммунохимическими методами культивируемые клетки НТС снимали с пластика механическим путем без использования трипсин-версена. Тестирование поверхностных антигенов на живых клетках проводили методом непрямой иммунофлуоресценции по Лежневой (1968). Для этого 2 · 10⁶ клеток в 0.5 мл раствора Рингера инкубировали 15 мин при 37 °С с иммуносывороткой или с сывороткой интактного кролика в разведении 1 : 10. Клетки промывали и обрабатывали ослиной иммуносывороткой против иммуноглобулинов кролика, меченной изотиоцианатом флуоресцеина.

Фракции, обогащенные плазматическими мембранами исследуемых клеток, выделяли по методу Хеффнера с сотрудниками (Haeffner et al., 1980). Белок во фракциях определяли по методу Марквелла с сотрудниками (Markwell et al., 1978). Количественная характеристика взаимодействия иммуносыворотки с антигенами фракций плазматических мембран получена методом иммунофлуоресцентного анализа (ИФА), как описано ранее (Терюкова и др., 1996). Белки фракций плазматических мембран разделяли методом электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0.1 % додецилсульфата натрия, и гетероорганные опухолеассоциированные антигены выявляли методом иммуноблотинга, как описано ранее (Laemmli, 1970; Терюкова и др., 2007).

Влияние сыворотки узкой специфичности на пролиферацию клеток изучали методами радиоизотопного анализа и проточной ДНК-цитометрии. Определение интенсивности включения ³H-тимидина в ДНК опухолевых клеток выполняли следующим образом. Клетки гепатомы НТС сеяли в лунки 24-луночного планшета фирмы Costar (США) из расчета 10⁵ клеток на 1 мл среды с добавлением СПК и инкубировали в СО₂-инкубаторе при 37 °С с добавлением иммуносыворотки узкой специфичности или сыворотки интактного кролика. Через 1 сут среду удаляли, клетки промывали средой без СПК и в лунки вносили по 0.3 мл среды, содержащей 4 мкл/мл ³H-тимидина (37 МБк/мл) и 0.1 % бычьего сывороточного альбумина.

После 1-часовой инкубации при 37 °С клетки трижды промывали раствором Хенкса, обрабатывали 5%-ной трихлоруксусной кислотой в течение 30 мин, споласкивали раствором Хенкса и лизировали 0.1 N NaOH в течение 20 мин. Радиоактивность в образцах измеряли на сцинтилляционном счетчике фирмы Beckman. Для проведения анализа клеточного цикла клетки инкубировали с сыворотками при тех же условиях в чашках Петри объемом 5 мл. Через 1 сут клетки снимали смесь 0.25%-ного раствора трипсина и 0.02%-ного раствора версена в соотношении 1 : 1. Для анализа на проточном цитометре приготавливали 0.5—1.0 мл клеточной суспензии на 10 mM фосфатном буфере, содержащем 0.7 mM EDTA (pH 7.5), с концентрацией 10⁶ клеток в 1 мл. Клетки обрабатывали 0.1%-ным Тритоном X-100, окрашивали оливомицином и этидиум бромидом в конечных концентрациях 20 и 40 мкг/мл соответственно в присутствии 15 mM MgCl₂. Окрашенные клетки анализировали после 24-часового хранения при 4 °С. Проточная ДНК-цитометрия выполнена с использованием лабораторной модели проточного цитометра, созданной на основе микроскопа ЛЮМАМ в Институте цитологии РАН (Розанов и др., 1990). Флуоресценцию возбуждали светом ртутной лампы ДРШ-250 через светофильтр СС-15 (3 мм), регистрацию проводили в области спектра от 550 нм. Гистограммы ДНК были получены с помощью многоканального анализатора, соединенного с микрокомпьютером. Скорость анализа — 200—300 клеток/с; гистограммы ДНК обсчитывали с помощью программы BARS v1.04, созданной в ГМП «Март» (1992).

Результаты

Проведено изучение экспрессии гетероорганных почечных антигенов на поверхности клеток гепатоцеллюлярных опухолей крыс. На рис. 1 представлены результаты тестирования клеток методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием иммуносыворотки узкой специфичности. Светящиеся четкие контуры клеток асцитной гепатомы Зайдела и культивируемой гепатомы НТС после их обработки иммуносывороткой, отсутствие свечения клеток, обработанных сывороткой нормального кролика, свидетельствуют о специфическом характере взаимодействия иммуносыворотки с поверхностными антигенами опухолевых клеток. В то же время свечения интактных гепатоцитов, обработанных иммуносывороткой и сывороткой неиммунизированного кролика, не отмечается.

Количественная характеристика взаимодействия иммуносыворотки узкой специфичности с антигенами фракций, обогащенных плазматическими мембранами исследуемых клеток, получена методом ИФА. При титрах 1 : 10—1 : 40 иммуносыворотка активно реагирует с поверхностными антигенами клеток гепатом и слабо связывается с препаратом интактных гепатоцитов (рис. 2). Таким образом, наблюдается определенная специфичность иммуносыворотки в отношении опухолеассоциированных антигенов клеток крысиных гепатом Зайдела и НТС.

По данным электрофореза в 7%-ном ПААГ и последующего иммуноблотинга иммуносыворотка узкой специфичности выявляет в составе фракций плазматических мембран клеток гепатомы Зайдела компоненты 110—115, 125—130 и 75—80 кДа, тогда как в препаратах клеток гепатомы НТС иммуносыворотка связывается только с белками 110—115 и 125—130 кДа (рис. 4).

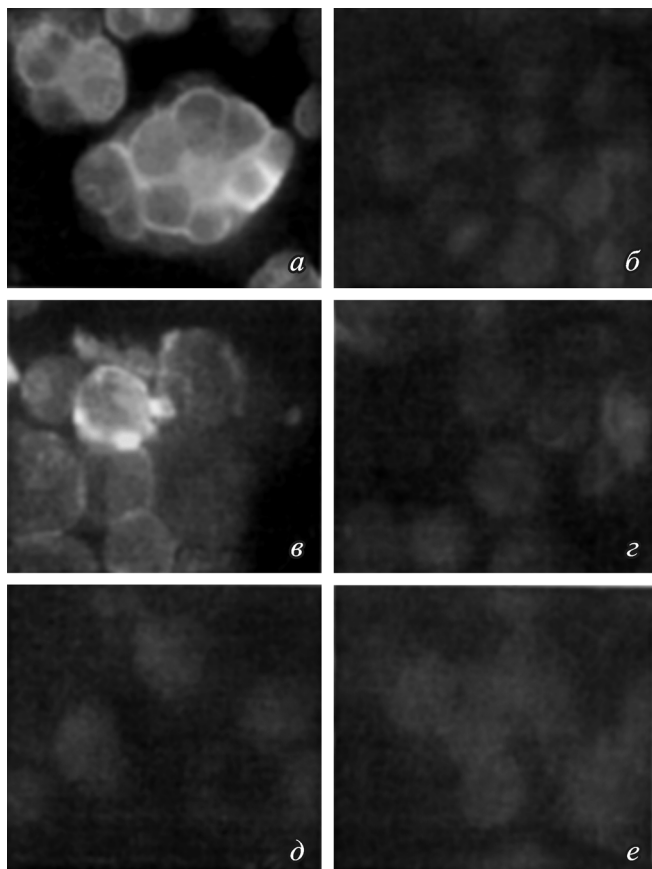


Рис. 1. Выявление гетероорганных почечных антигенов на поверхности живых клеток методом непрямого иммунофлуоресценции.

Специфическое свечение клеток асцитной гепатомы Зайдела (а) и культивируемой гепатомы НТС (е), обработанных иммуносывороткой узкой специфичности; свечения intactных гепатоцитов (д) и клеток, обработанных сывороткой неиммунизированного кролика (б, в, е), не зарегистрировано.

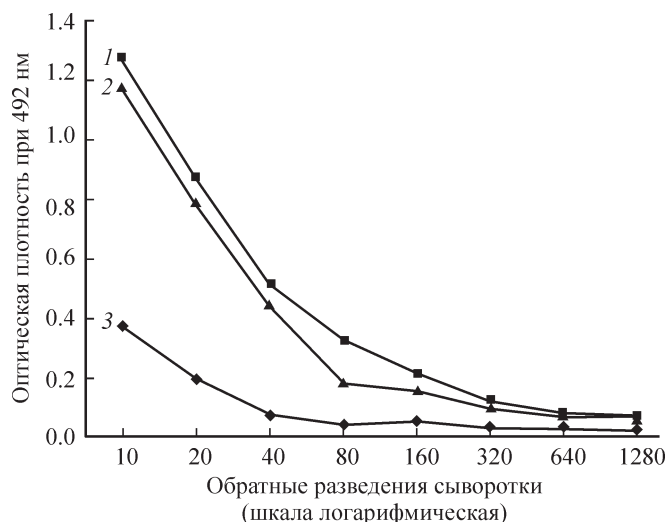


Рис. 2. Определение связывания иммуносыворотки узкой специфичности с антигенами фракций, обогащенных плазматическими мембранами клеток гепатом Зайдела (1) и НТС (2), а также intactных гепатоцитов (3) методом иммуноферментного анализа.

Влияние иммуносыворотки узкой специфичности на пролиферацию культивируемых клеток НТС определяли по включению ^3H -тимидина в ДНК и путем анализа клеточного цикла на проточном цитометре. Как видно из результатов двух экспериментов, представленных в табл. 1, включение ^3H -тимидина в ДНК опухолевых клеток, инкубированных с 50 мкл иммуносыворотки, снижается на 33 и 14 % по сравнению с включением изотопа в клетки, инкубированные с сывороткой intactного кролика, а при инкубации клеток со 100 мкл иммуносыворотки — на 47 и 30 % соответственно. Таким образом, 24-часовая инкубация клеток гепатомы НТС с иммуносывороткой приводит к дозозависимому и статистически достоверному подавлению включения ^3H -тимидина в ДНК.

Аналогично 24-часовая инкубация клеток гепатомы НТС в присутствии иммуносыворотки узкой специфичности приводит к увеличению количества клеток, находящихся в G_1 -фазе, по сравнению с контрольными лунками, в которых клетки инкубировали с сывороткой intactного кролика, т. е. связывание антител с поверхностными антигенами 110—115 и 125—130 кДа гепатомных клеток замедляет их переход в S-фазу (рис. 3; табл. 2).

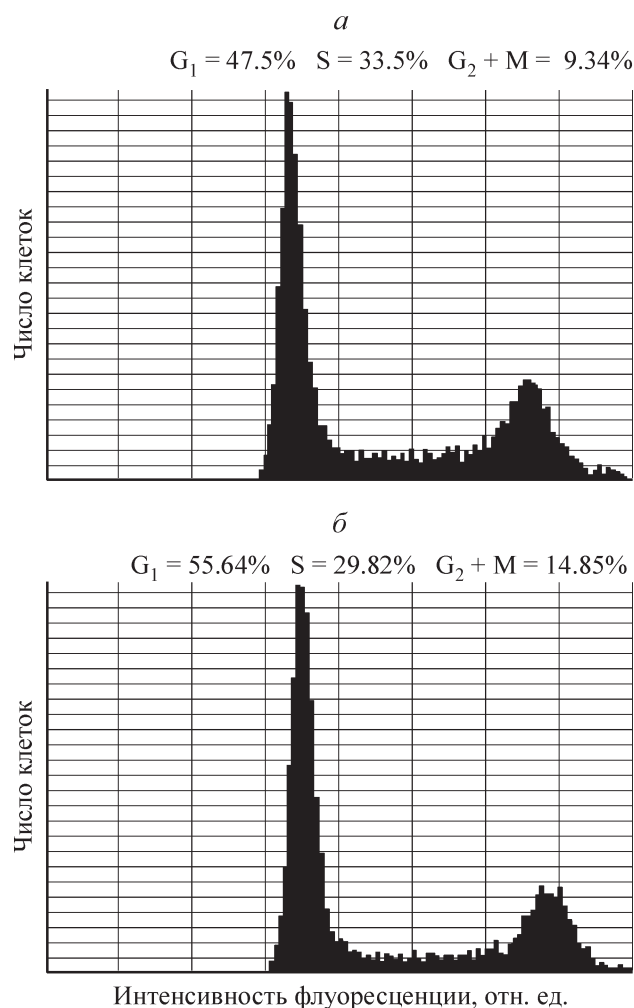


Рис. 3. Анализ клеточного цикла методом проточной ДНК-цитометрии.

Клетки гепатомы НТС культивировали с сывороткой intactного кролика (а) или с иммуносывороткой узкой специфичности (б).

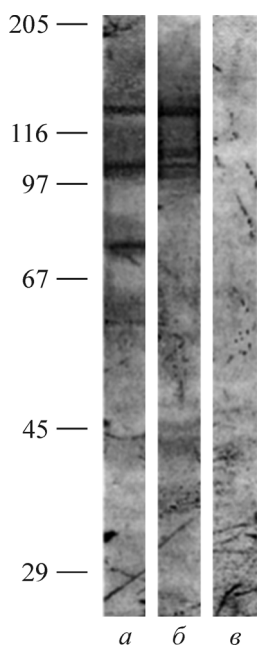


Рис. 4. Выявление гетероорганных почечных антигенов методом иммуноблоттинга.

Белки фракций, обогащенных плазматическими мембранами гепатом Зайдела (а), НТС (б), и интактных гепатоцитов (в) разделяли электрофоретически в 7%-ном ПААГ и после переноса на нитроцеллюлозу обрабатывали иммуносывороткой узкой специфичности. Числа слева — молекулярные массы маркерных белков, кДа.

Таким образом, по-видимому, представленные данные позволяют говорить об участии поверхностных гетероорганных опухолеассоциированных антигенов 110—115 и 125—130 кДа в процессе пролиферации клеток гепатомы НТС, а именно в регуляции перехода клеток из G₁-фазы в S-фазу.

Обсуждение

Нарушения генной активности в процессе неопластической трансформации приводят к дисдифференцировке клеток и изменению клеточного фенотипа. Наиболее полное представление о составе поверхностных антигенов опухолевых клеток сформировалось благодаря исследованиям, выполненным на нормальных и малигнизированных человеческих меланоцитах *in situ* и на культивируемых клетках *in vitro* (Herlyn, Koprowski, 1988). Авторы проследили за тем, как по мере опухолевой прогрессии на наружной мембране меланоцитов увеличивается экспрессия молекул, связанных с их активной пролиферацией, способностью к инвазии, формированием клеточного иммунного ответа со стороны организма.

Подобного рода многоплановых исследований поверхностных компонентов клеток гепатоцеллюлярных карцином (ГК) в литературе мы не встречали. Однако установлено, что уже на самой ранней стадии гепатоканцерогенеза в составе плазматических мембран гепатоцитов появляется фермент метаболизма глутатиона — гамма-глутамилтранспептидаза, которая рассматривается в качестве одного из маркеров неопластической трансформации гепатоцитов (Williams, 1980; Hendrich, Pitot, 1987). В экспериментах на животных и при иммуногистохимическом исследовании пациентов с патологией печени выявлены значительные изменения в синтезе компонентов внеклеточного матрикса и адгезивных молекул клетками гепатокарцином (Rescan et al., 1990, 1991; Volpes et al., 1991, 1993; Jaskiewicz et al., 1993, 1995; Lietard et al., 1998; Тюреева и др., 2005); на клеточных линиях *in vitro* изучается роль этих белков в прогрессии гепатоцеллюлярных опухолей (Carloni et al., 1998, 2001; Masumoto et al., 1999).

Как показано в настоящей работе, иммуносыворотка узкой специфичности выявляет в составе фракций, обогащенных плазматическими мембранами клеток гепатомы Зайдела, компоненты 110—115, 125—130 и 75—80 кДа, тогда как в препаратах клеток гепатомы НТС иммуносыворотка связывается только с белками 110—115 и 125—130 кДа (рис. 3). Таким образом, прежде всего следует отметить, что иммуносыворотка узкой специфичности не взаимодействует с гетероорганным антигеном, идентифицированным как ламинин-8/9, и не содержит антител, которые могут реагировать с ламинин-подобными компонентами и приносить определенную неоднозначность в интерпретацию результатов (Kawagushi et al., 1994). Следовательно, в формировании полос преципитации в агаре между антипочечной сывороткой и лизатом фракции плазматических мембран гепатомы Зайдела принимают участие другие гетероорганные антигены. На первый взгляд результат представляется неожиданным, поскольку прежде всего антиламининовые антитела активно реагируют с ламинином фракций, обогащенных плазматическими мембранами, по мере увеличения титра антипочечной сыворотки при проведении иммунохимических реакций. Однако метод двойной диффузии в агаре основывается на иных принципах, и, по-видимому, сформировавшиеся преципитаты образованы антителами к тем опу-

Т а б л и ц а 1

Влияние иммуносыворотки узкой специфичности на синтез ДНК в культивируемых клетках гепатомы НТС

Фракция IgG из сыворотки кролика	Включение ³ H-тимидина в ДНК клеток после их инкубации с сывороткой кролика, имп/мин ^а	
Интактного, 50 мкл/мл	6501 ± 676	4559 ± 834
Иммунизированного, 50 мкл/мл	4360 ± 361 ^б	3920 ± 376
Интактного, 100 мкл/мл	7644 ± 376	5085 ± 167
Иммунизированного, 100 мкл/мл	4066 ± 176 ^б	3553 ± 233 ^б

^а Среднее для трех лунок. ^б Различия статистически достоверны, $P \geq 0.05$. ^в Различия статистически достоверны, $P \geq 0.01$.

Т а б л и ц а 2

Влияние иммуносыворотки узкой специфичности на распределение культивируемых клеток гепатомы НТС по фазам клеточного цикла

Клетки	Фракция IgG из сыворотки кролика, 100 мкл/мл	Доля клеток в фазах клеточного цикла, % ^а		
		G ₁	S	G ₂ + M
НТС	Интактного	49.0 ± 0.9	33.1 ± 0.1	18.4 ± 0.8
	Иммунизированного	56.1 ± 0.3 ^б	28.9 ± 0.5 ^б	15.6 ± 0.3 ^в

^а Среднее для трех измерений. ^б Различия статистически достоверны, $P \geq 0.01$. ^в Различия статистически достоверны, $P \geq 0.05$.

холеассоциированным гетероорганным антигенам, которые в условиях нашего опыта находились с ними в эквимолярных соотношениях. Таким образом, результаты, полученные с использованием иммуносыворотки узкой специфичности, позволяют утверждать, что процесс антигенной дивергенции в ходе неопластической трансформации гепатоцитов не ограничивается секрецией ламинина и высоким уровнем экспрессии β -актина и сопровождается синтезом поверхностных гетероорганных антигенов 110—115, 125—130 и 75—80 кДа (для клеток гепатомы Зайдела). Об экспрессии на поверхности клеток гепатомы Зайдела гетероорганных почечных антигенов свидетельствуют также результаты Нато и Буррилла (Nato, Bourrillon, 1982). Методом аффинной хроматографии авторы изолировали из клеток гепатомы Зайдела главный поверхностный сиалогликопротеин 110—160 кДа — GP112, который является интегральным белком и обладает конканавалин А-рецепторной активностью. Иммунохимический анализ, выполненный с использованием антисыворотки против очищенного гликопротеина GP112, свидетельствует об отсутствии этого антигена в составе интактных клеток печени, селезенки, легких, поджелудочной железы, кишечника и желудка, но присутствует в тканях почек и тимуса крысы. Однако мол. масса этого антигена, иммунопреципитированного из тканей почек и тимуса была ниже, чем таковая GP112 (60 кДа против 110—160 кДа для очищенного GP112).

Для решения вопроса о причастности выявленных гетероорганных антигенов к процессу клеточной пролиферации мы изучали влияние иммуносыворотки узкой специфичности на включение ^3H -тимидина в ДНК опухолевых клеток и путем анализа их клеточного цикла на проточном цитометре. Исследование проводили на монослойной культуре клеток НТС, на поверхности которых иммуносыворотка узкой специфичности взаимодействует только с гетероорганными антигенами 110—130 кДа. Как представлено в табл. 1 и 2, по сравнению с клетками, инкубированными с сывороткой неиммунизированного кролика, через 24 ч после добавления иммуносыворотки в культуральную среду происходят статистически достоверное снижение включения ^3H -тимидина в ДНК клеток гепатомы НТС и увеличение их доли в G_1 -фазе клеточного цикла; следовательно, связывание иммуносыворотки с гетероорганными антигенами тормозит пролиферацию гепатомных клеток. Судя по литературным данным, подобного рода исследования проводятся, как правило, с помощью моноклональных антител (МА). Так, Ягита с соавторами (Yagita et al., 1986) показали, что МА к поверхностному гликопротеину, состоящему из тяжелой субъединицы 90—95 кДа и легкой субъединицы 30—35 кДа, культивируемых клеток опухоли мочевого пузыря человека и крысы оказывают дозозависимый ингибиторный эффект на синтез ДНК в опухолевых клетках и их рост, вызывая небольшую аккумуляцию клеток в S-фазе. Инкубация Т-лейкемических клеток человека с МА к рецептору трансферрина тормозит клеточный рост и на 7-е сут приводит к задержке клеток в S-фазе (Trowbridge, Lopez, 1982). В свою очередь МА к рецептору эпидермального фактора роста (ЭФР) человека блокируют активацию рецепторной тирозинкиназы, что приводит к замедлению или остановке клеточного цикла с накоплением клеток в G_1 -фазе (Mendelsohn, 1997). Привлекают внимание также данные Рескана с соавторами (Rescan et al., 2001), которые продемонстрировали на культуре крысиных гепатоцитов, что митогенный сигнал от ЭФР через активацию

ERK₂/MAP-киназы увеличивает уровень экспрессии $\beta 1$ -интегринов; при этом поликлональные антитела против $\beta 1$ -интегринов вызывают задержку клеток в G_1 -фазе. Наша работа выполнена с использованием фракции IgG, выделенной из иммуносыворотки узкой специфичности после 2-й реиммунизации кроликов преципитатами, и, судя по результатам ИФА, содержание в ней антител к гетероорганным антигенам 110—130 кДа невелико. Поэтому, на наш взгляд, статистически достоверное снижение включения ^3H -тимидина в клетки гепатомы НТС и увеличение их содержания в фазе G_1 под влиянием иммуносыворотки позволяют предположить, что экспрессия гетероорганных опухолеассоциированных антигенов 110—115 и 125—130 кДа обусловлена их участием в процессе клеточной пролиферации.

В заключение отметим, что в отличие от монослойной клеточной линии гепатомы НТС клетки асцитной гепатоцеллюлярной карциномы Зайдела существуют как небольшие островки из двух клеток и более, причем количество клеток в этих образованиях прямо пропорционально возрасту опухоли (Gupta et al., 1985). Караванова и соавторы (Karavanova et al., 1987) описывают клетки гепатомы Зайдела как многоклеточные сферические или эллипсоидные комплексы с внутренней полостью, в которой обнаруживается ламинин. В настоящей работе на рис. 1, а представлен типичный для гепатомы Зайдела сферой средних размеров, состоящий по меньшей мере из 10 клеток. Сферические агрегаты опухолевых клеток рассматриваются в качестве трехмерной модели *in vitro* опухолевых микрозон и ранних, бессосудистых этапов опухолевого роста (Sutherland, Durand, 1984), характеристики которых значительно отличаются от двумерных монослойных культур и перспективны для изучения. Например, можно предположить, что появление на поверхности клеток гепатомы Зайдела гетероорганных антигенов 75—80 кДа объясняется его вовлеченностью в процесс формирования многоклеточных агрегатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49186).

Список литературы

- Иванов В. А. 1982. Выявление ассоциированных с опухолью мембранных антигенов почечной природы в печени крыс после однократного воздействия 4-диметиламиноазобензолом. Цитология. 24(9): 1099.
- Иванов В. А., Фель В. Я., Оленов Ю. М. 1975. О мембранных антигенах клеток асцитной гепатомы Зайдела. Цитология. 17(1): 24—29.
- Лежнева О. М. 1968. Выявление поверхностных антигенов на живых клетках методом флуоресцирующих антител. В кн.: Иммунохимический анализ. М.: Медицина. 189—200.
- Назаров И. В., Иванов В. Ф., Фель В. Я. 1989. Антигенная дивергенция в первичной культуре гепатоцитов крыс после воздействия гепатоканцерогеном N-диэтилнитрозамином. Цитология 31(3): 352—355.
- Розанов Ю. М., Барский И. Я., Папаян Г. В., Платунов С. Е., Забродин А. С. 1990. Многопараметрический цитометр-анализатор на базе микроскопа «ЛЮМАМ». В кн.: Автоматизация цитологических исследований. Киев: Наук. думка. 136—139.
- Терюкова Н. П., Дешева А. С., Блинова Г. И., Миргородская О. А., Иванов В. А. 2007. Сравнительное изучение антигенов, ассоциированных с плазматическими мембранами гепатомных и миогенных клеток крысы, с использованием антипеченочной сыворотки. Цитология. 49(11): 944—951.

- Терюкова Н. П., Тюреева И. И., Грандильевская А. Б., Иванов В. А. 1996. Мембранные гетероорганные антигены опухолей гепатоцеллюлярного и миогенного происхождения. Цитология. 38 (10) : 1092—1097.
- Тюреева И. И., Миргородская О. А., Черепанова О. А., Подольская Е. П., Новиков А. В., Ходорковский М. А., Иванов В. А. 2005. Выявление и идентификация ламинина в составе плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела крыс. Цитология. 47 1 : 150—161.
- Фель В. Я. 1990. Антигенная дивергенция опухолевых клеток, обусловленная экспрессией гетероорганных антигенов, как проявление дисдифференцировки при канцерогенезе. Цитология. 32 (5) : 407—421.
- Carloni V., Mazzocca A., Pantaleo P., Cordella C., Laffi G., Gentilini P. 2001. The integrin, alpha6beta1, is necessary for the matrix-dependent activation of FAK and MAP kinase and the migration of human hepatocarcinoma cells. Hepatology. 34 : 42—49.
- Carloni V., Romanelli R. G., Mercurio A. M., Pinzani M., Laffi G., Cotozzi G., Gentilini P. 1998. Knockout of alpha6beta1-integrin expression reverses the transformed phenotype of hepatocarcinoma cells. Gastroenterology. 115 : 433—442.
- Gupta P. D., Kumar G. K., Khar A. 1985. Cell to cell association in Zajdela ascitic hepatoma. An ultrastructural study. J. Submicrosc. Cytol. 17 : 421—427.
- Haeffner E. W., Kolbe K., Schroeter D., Paweletz N. 1980. Isolation of a light and a heavy membrane-fraction of the glycogen-free Ehrlich—Lettré substrain. Biochem. biophys. acta. 603 : 36—51.
- Hendrich S., Pitot H. C. 1987. Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis. Cancer Metastasis Rev. 6 : 155—178.
- Herlyn M., Koprowski H. 1988. Melanoma antigens: immunological and biological characterization and clinical significance. Annu. Rev. Immunol. 6 : 283—308.
- Jaskiewicz K., Chasen M. R. 1995. Differential expression of transforming growth factor alpha, adhesions molecules and integrins in primary, metastatic liver tumors and in liver cirrhosis. Anticancer Res. 15 : 559—562.
- Jaskiewicz K., Chasen M. R., Robson S. C. 1993. Differential expression of matrix proteins in hepatocellular carcinoma and chronic liver. Anticancer Res. 13 : 2229—2230.
- Karavanova I. D., Troianovskii S. M., Bannikov G. A. 1987. Expression of vimentin and prekeratins in solid and ascites variants of Zajdela hepatoma. Bull. Exp. Biol. Med. 103 : 462—426.
- Kawaguchi T., Ono T., Wakabayashi H., Igarashi S. 1994. Cell surface laminin-like substances and laminin-related carbohydrates of rat ascites hepatoma and its variants with different lung-colonizing potential. Clin. Exp. Metastasis. 12 : 203—212.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Lietard J., Loreal O., Theret N., Campion J. P., L'Helgoualch A., Turlin B., Ramee M. P., Yamada Y., Clement B. 1998. Laminin isoforms in non-tumoral and tumoral human livers. Expression of alpha1, alpha2, beta2 and gamma1 chain mRNA and an alpha chain homologous to the alpha2 chain. J. Hepatol. 28 : 691—699.
- Markwell M. A. K., Haas S. V., Bieber L. L., Tolbert N. E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87 : 206—210.
- Masumoto A., Arao S., Otsuki M. 1999. Role of beta1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. Hepatology. 29 : 68—74.
- Mendelsohn J. 1997. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. Clin. Cancer Res. 3 : 2703—2707.
- Nato F., Bourrillon R. 1982. Purification and characterization of a major cell surface glycoprotein in Zajdela ascites hepatoma cells which displays a potent concanavalin A receptor activity. J. Cell. Biochem. 18 : 245—260.
- Rescan C., Coutant A., Talarmin H., Theret N., Glaise D., Guguen-Guillouzo C., Baffet G. 2001. Mechanism in the sequential control of cell morphology and S phase entry by epidermal growth factor involves distinct MEK/ERK activations. Mol. Biol. Cell. 12 : 725—738.
- Rescan P.-V., Clément B., Yamada Y., Glaise D., Segui-Real B., Baffet G., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A. 1991. Expression of laminin and its receptor LBP-32 in human and rat hepatoma cells. Hepatology. 13 : 289—296.
- Rescan P.-Y., Clément B., Yamada Y., Segui-Real B., Baffet G., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A. 1990. Differential expression of laminin chains and receptor (LBP-32) in fetal and neoplastic hepatocytes compared to normal adult hepatocytes *in vivo* and in culture. Amer. J. Pathol. 137 : 701—709.
- Sutherland R. M., Durand R. E. 1984. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. Recent Results Cancer Res. 95 : 24—49.
- Trowbridge I. S., Lopez F. 1982. Monoclonal antibody to transferrin receptor-blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79 : 1175—1179.
- Volpes R., van der Oord J. J., Desmet V. J. 1991. Distribution of the VLA family of integrins in normal and pathological human liver tissue. Gastroenterology. 101 : 200—206.
- Volpes R., van den Oord J. J., Desmet V. J. 1993. Integrins as differential cell lineage markers of primary liver tumors. Amer. J. Pathol. 142 : 1483—1492.
- Williams G. M. 1980. The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. Biochem. biophys. acta. 605 : 167—189.
- Yagita H., Masuko T., Hashimoto Y. 1986. Inhibition of tumor cell growth *in vitro* by murine monoclonal antibodies that recognize a proliferation-associated cell surface antigen system in rats and humans. Cancer Res. 46 : 1478—1484.

Поступила 5 VI 2007

INVESTIGATION OF THE SURFACE HETEROORGANIC ANTIGENS OF RAT HEPATOMA CELLS INVOLVED IN PROCESS OF CELL PROLIFERATION

N. P. Teryukova, G. I. Blinova, Yu. M. Rosanov, V. A. Ivanov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: iva@mail.cytspb.rssi.ru

The investigation of antigenic diversion of hepatoma cells resulting from the expression of heteroorganic kidney antigens has been continued. Tumor-associated heteroorganic antigens 110—115 and 125—130 kDa were detected by immunoserum of narrow specificity in fractions of plasmatic membranes of cells of rat ascitic hepatoma Zajdela and cultured hepatoma HTC; the antigen 75—80 kDa was revealed only for hepatoma Zajdela cells. It has been shown by methods of radioisotope analysis and flow DNA-cytometry that heteroorganic antigens 110—130 kDa can be involved in process of cell proliferation.

Key words: antigenic diversion, hepatoma, cancerogenesis, tumor-associated antigens.