

МЕМБРАННЫЕ АНТИГЕНЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК: МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ

В процессе опухолевой трансформации наблюдаются изменения морфологических, биохимических и иммунологических характеристик клетки. Клетка утрачивает характерную для дифференцированной клетки определенной гистологии форму и приобретает черты низкодифференцированных клеток. Весьма распространенным явлением в опухолях представляется снижение синтеза тканеспецифических белков, так что в ряде случаев можно выявить корреляцию между уровнями активности определенных тканеспецифических ферментов и уровнями гистологической дифференцированности опухоли. Во многих опухолях происходит выраженная в разной степени замена ряда изоферментов, соответствующих нормальной дефинитивной ткани, на эмбриональные изоформы. Примеры наличия в опухолях ферментов, не свойственных гомологичным нормальным тканям и не являющихся эмбриональными изоферментами этих тканей, немногочисленны. Аналогичная картина выявлена при исследовании опухолевых клеток иммунологическими методами. Уже на первом этапе изучения опухолевых клеток с использованием поликлональных иммуносывороток выявлены основные тенденции в изменении их антигенного спектра: антигенное “упрощение”, то есть частичная потеря или значительное снижение синтеза тканеспецифических антигенов; антигенная реверсия, обусловленная экспрессией эмбриоспецифических антигенов; антигенная дивергенция, обозначившая появление в опухолях антигенов, свойственных негомологичным дефинитивным тканям. Новый этап в развитии онкоиммунологии связан с развитием гибридной технологии, что позволило получать моноклональные антитела (МКА) к отдельным белковым и полисахаридным детерминантам клетки. Исследования мембранных антигенов клеток меланомы человека на разных стадиях опухолевой прогрессии *in situ* и культивируемых меланоцитов *in vitro* с использованием МКА позволили сформировать достаточно полное представление о становлении фенотипа трансформированных клеток.

Исследования сотрудников лаборатории цитологии опухолевого роста (ЛЦОР) института цитологии РАН, полученные при изучении индуцируемых и перевиваемых опухолей крыс с использованием поликлональных иммуносывороток методами иммунофлуоресценции, двойной диффузии в агаре по Уохтерлони, специфической задержки преципитации в агаре по Бьерклунду позволили сделать заключение о появлении в различных клеточных структурах белков-антигенов, свойственных негомологичным дефинитивным тканям, которые были обозначены как гетероорганные антигены. Термин гетероорганные антигены, впервые предложенный в ЛЦОР, не получил широкого распространения вследствие того, что большинство онкоиммунологов рассматривают появляющиеся в опухолях антигены негомологичных нормальных тканей как неспецифические. Однако, по мнению авторов, исследование поверхностных антигенов представляет особый интерес, поскольку именно изменения клеточной поверхности во многом определяют биологические особенности опухолевых клеток: их способность к инвазии, адгезии, формированию клеточного и гуморального ответа со стороны организма. В качестве модели для изучения феномена антигенной дивергенции авторы выбирают перевиваемую асцитную гепатому Зайдела крыс. Исследование гетероорганных антигенов клеток гепатоцеллюлярных опухолей осуществляли с помощью органоспецифической иммуносыворотки против клеточных мембран почек взрослых крыс. Иммуносыворотку получали путем иммунизации кроликов препаратами клеточных мембран почек крыс с последующим ее истощением гомогенатом гетерологичных органов и водно-солевым экстрактом почек. Полноту истощения сыворотки в отношении гетерологичных антигенов и растворимых почечных антигенов строго контролировали. Тестирование мембранных антигенов гепатомы Зайдела проводили на живых клетках с помощью непрямой реакции иммунофлуоресценции

(РИФ). Обработка противомембранной органоспецифической антипочечной иммуносывороткой срезов почки в РИФ вызвала яркое свечение щеточной каемки извитых канальцев и базальных мембран канальцев. При замене иммуносыворотки нормальной кроличьей сывороткой или обрабатывая срезы лишь флуоресцирующей сывороткой свечения клеточных структур не наблюдалось. Отрицательный результат был получен и при обработке антипочечной иммуносывороткой срезов печени интактных крыс. Следовательно, приведенные выше результаты свечения срезов почки, вызванного аппликацией антипочечной иммуносыворотки, служит основанием органоспецифичности последней. При тестировании той же иммуносывороткой живых клеток гепатомы Зайдела специфическое свечение было обнаружено у 90% опухолевых клеток. Таким образом, на поверхности клеток гепатомы Зайдела удалось выявить характерные для дефинитивных клеток почек органоспецифические антигены, которые могут быть отнесены к числу гетероорганных опухолевых антигенов. Используя в РИФ указанную иммуносыворотку смогли локализовать мембранные гетероорганные антигены на поверхности клеток гепатомы Зайдела.

Методом иммунопреципитации с использованием органоспецифической антипочечной сыворотки был идентифицирован мембранный гетероорганный антиген обозначенный как МА-50 в составе клеток асцитной гепатомы Зайдела крыс. Задача данной работы заключалась в исследовании мембранного гетероорганного антигена клеток асцитной гепатомы Зайдела: его выделение, выяснение физико-химической характеристики и функционального значения. В данном исследовании использовалась поликлональная моноспецифическая антисыворотка. Моноспецифическую антисыворотку получали иммунизацией кроликов полосой преципитации, полученной в агаре между лизатом плазматических мембран клеток гепатомы Zaidela и органоспецифической антипочечной сывороткой кролика по методу Ухтерлони. Было получено 4 иммуносыворотки на 8-ой и 14-ый дни после 1-ой и 2-ой реиммунизаций кролика. Фракцию IgG выделяли из иммуносыворотки на белке А методом аффинной хроматографии. Специфичность, по отношению к клеточным мембранам печени, почек и гепатомы Зайдела, и активность полученных иммуносывороток определяли методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве вторых антител использовали ослиные антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. Субстратом для появления цветной реакции служил ортофенилендиамин. Интенсивность развития окраски оценивали при помощи фотометра с вертикальным лучом при длине волны 492нм. Полученные результаты тестирования специфичности сывороток в отношении клеточных мембран печени, почек и гепатомы Зайдела методом ИФА показали, что наиболее высокая специфичность иммуносыворотки наблюдается при использовании в качестве антигена клеточных мембран гепатомы Зайдела. Также видно, что МА-50 представлен на мембране клеток гепатомы Зайдела в большем количестве, чем на мембране клеток нормальной почки. Взаимодействие антисыворотки с мембранами клеток печени имеет место при низких значениях титров сыворотки. Далее IgG использовали в качестве лиганда для изготовления иммуносорбента и выделения на нем гетероорганного антигена из солюбилизата клеточных мембран гепатомы Зайдела методом аффинной хроматографии. Объединенные фракции элюата диализовали, сгущали и преципитировали белок ацетоном. Осадок растворяли в буфере для образцов и использовали для анализа методом электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия. В результате электрофоретического разделения эллиуированных с иммуносорбента белков было получено две полосы с мол. массой около 50 и 68кДа. Обе полосы были вырезаны и отправлены на масс-спектрометрический анализ. Его результаты обсуждаются в докладе.