

MAŁGORZATA MARSZAŁEK

*Zakład Biofizyki Błon,
Katedra Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź*

MODEL SOLTA — FARBERA JAKO PRZYKŁAD WIELOETAPOWEJ HEPATOKARCYNogenezy EKSPERYMENTALNEJ.

WSTĘP

Rak wątrobowokomórkowy (HCC, ang. hepatocellular carcinoma) stanowi 68% pierwotnych nowotworów wątroby. Jest jednym z dziesięciu najczęściej występujących nowotworów złośliwych narządów mięsnych u człowieka. Około 4,5% wszystkich guzów złośliwych to HCC. Rocznie na tę śmiertelną chorobę umiera milion osób (CARRIAGA i HENSON 1995, Caselman i ALT 1996, HILDT i współaut. 1996). Ze względu na rosnący z roku na rok zarówno zasięg, jak i częstotliwość zachorowań na HCC stanowi on ważny problem medyczny i naukowy. Początki badań hepatokarcynogenezy eksperymentalnej sięgają lat pięćdziesiątych XX wieku. Od tej pory rozwinięto wiele modeli badawczych z zastosowaniem różnych czynników inicjujących i promujących rozwój HCC. W toku licznych badań wykazano, że hepatokarcynogeneza, podobnie jak procesy nowotworzenia przebiegające w innych narządach, jest wieloetapowa. Dlatego też warunkiem prześledzenia rozwoju zmian preneoplastycznych i neoplastycznych, pojawiających się w procesie hepatokarcynogenezy, jest wprowadzenie do badań modeli eksperymentalnych, w których odpowiedź komórek wątroby na stosowane czynniki karcynogenne i mitogenne jest w miarę zsynchronizowana. Zminimalizowany powinien być także wpływ niespecyficznych efektów, interferujących z procesem nowotworzenia, a wywołanych na przykład podanymi czynnikami chemicznymi. Rozwój guza powinien przebiegać w miarę szybko, a kolejno pojawiające się pato-

logiczne zmiany komórkowe, zwłaszcza na wczesnych etapach hepatokarcynogenezy, winny być łatwo uchwytne. Znaczenie możliwości detekcji zmian preneoplastycznych jest oczywiste.

Przykładem procedury spełniającej, przynajmniej w części, powyższe wymogi jest model Solta-Farbera, określany w literaturze nazwiskami jego twórców. W poznaniu sekwencji i charakteru zmian komórkowych podczas hepatokarcynogenezy model ten odegrał podwójną rolę. Z jednej strony, umożliwia badania komórek proliferujących w miarę synchronicznie i dlatego jest stosowany obecnie mimo rozwoju innych modeli doświadczalnych. Z drugiej strony — pomimo precyzyjnie rozpisanych ról dla zastosowanych w modelu czynników inicjacji i promocji — uzyskano zupełnie nieoczekiwane wyniki cytologiczne. Pozwoliły one na sformułowanie następujących pytań: 1) Czy w wątrobie dorosłych zwierząt obecne są komórki macierzyste? Jeśli tak, to 2) Które komórki stanowią populację komórek macierzystych? i 3) Czy mogą one odgrywać rolę w procesie rozwoju pierwotnych nowotworów wątroby, a zwłaszcza HCC? Nieuniknione stało się kolejne pytanie 4) Jaka jest histogeneza nowotworów wątroby człowieka? Spory i kontrowersje trwają do dziś. W artykule przedstawiono podstawy i założenia teoretyczne modelu oraz omówiono liczne zmiany identyfikowane w wątrobie, zwłaszcza na początkowych etapach hepatokarcynogenezy.

SCHEMAT I ZAŁOŻENIA TEORETYCZNE MODELU

Proces hepatokarcynogenezy u szczurów rasy Fischer-344 inicjowany jest według modelu Solta-Farbera przez jednokrotne podanie *N,N*-dietylo-*N*-nitrozoaminy (DENA) w dawce 200 mg/kg masy ciała drogą iniekcji dootrzewnowej. Kolejny etap eksperymentu to podanie w diecie, po 14 dniach po DENA, 0.02% *N*-acetylo-2-aminofluorenu (2-AAF) przez kolejne dwa tygodnie. Po siedmiu dniach podawania 2-AAF, to znaczy w 21 dniu eksperymentu, wykonuje się zabieg częściowej hepatektomii (PH, ang. partial hepatectomy) (SOLT i FARBER 1976).

W założeniach teoretycznych autorzy modelu odwołali się do wcześniejszych rozważań Haddowa (SOLT i FARBER 1976, SOLT i współaut. 1977), który już w 1938 roku zwrócił uwagę na zjawisko „selektywnej cytotoksyczności” (ang. selective cytotoxicity). Zaobserwował on, że komórki nowotworowe rosną i namnażają się w takich warunkach środowiska, w których komórki prawidłowe nie przechodzą podziałów komórkowych. Powiązał zatem fakt oporności komórek nowotworowych na efekt cytotoksyczny, wywierany przez różne związki chemiczne, z rozwojem guza. W modelu Solta-Farbera, DENA oprócz funkcji inicjatorowej równocześnie indukuje oporność na hepatotoksyny w populacji zainicjowanych komórek, w których uruchomione zostają szlaki metaboliczne związane ze wzmoczoną detoksykacją ksenobiotyków. Komórki zainicjowane stają się w ten sposób mniej wrażliwe na związki cytotoksyczne niż komórki niezainicjowane. Sugerowano, że cechą oporności nabywają hepatocyty dosyć wcześnie, bo na pierwszych etapach hepatokarcynogenezy, i jest ona wyrazem genetycznie uwarunkowanej, fizjologicznej adaptacji komórek do zmienionych warunków środowiskowych (FARBER i współaut. 1976, FARBER 1987, SOLT i FARBER 1976).

Autorzy modelu założyli, że 2-AAF podany w niskiej, nieinicjującej dawce, z jednej strony powinien powodować zablokowanie aktywności mitotycznej prawidłowych komórek wątroby, z drugiej zaś winien pełnić funkcję czynnika selekcyjnego wobec komórek zainicjowanych. Przyjęto także, że populacja takich „opornych” hepatocytów może być zastymulowana do proliferacji czynnikiem promocyjnym o charakterze mitogennym, jakim jest w tym modelu zabieg PH. Sugerowano więc, że jedynie komórki zainicjowane, które nabyły cechę oporności, powinny proliferować i w efekcie rozwoju klonalnego tworzyć kolejno: ogniska preneoplastyczne,

guzki neoplastyczne, a następnie zmiany identyfikowane jako rak wątrobowokomórkowy. Ogniska preneoplastyczne to niewielkie skupiska fenotypowo odmiennych komórek dobrze zintegrowane z otaczającą je parenchymą, natomiast guzki neoplastyczne to duże, sferyczne skupienia zmienionych hepatocytów, wyraźnie oddzielone od otaczającej je parenchymy, której komórki mogą ulec ściśnieniu na skutek ucisku i rozpierania przez rozrastającą się masę guzka (SOLT i FARBER 1976).

Wyniki analizy histologicznej potwierdziły słuszność założeń teoretycznych, gdyż w trzecim tygodniu eksperymentu wyraźnie widoczny był hamujący wpływ 2-AAF na aktywność mitotyczną hepatocytów prawidłowych. Były one jednak również zaskakujące, ponieważ ujawniły, że w tych warunkach eksperymentalnych jedynymi komórkami, które proliferują, są tak zwane komórki owalne (ang. oval cells) (SOLT i współaut. 1977).

Wzmoczoną proliferację komórek owalnych podczas hepatokarcynogenezy indukowanej w innych modelach doświadczalnych zaobserwował i opisał już wcześniej twórca omawianego modelu profesor FARBER (1956). Nieliczni badacze sugerowali wówczas, że komórki te mogą wywodzić się z populacji komórek macierzystych wątroby, bądź same mogą stanowić tę populację. Przypuszczano jedynie, że ich proliferacja w warunkach poważnego uszkodzenia narządu może być nowym typem regeneracji, angażującym nieznany rodzaj pierwotnych komórek obecnych w dojrzałym narządzie. Komórki te stanowiły i stanowią nadal przedmiot licznych badań. Należy zaznaczyć, że pierwsze obserwacje poczynione podczas analizy zmian histologicznych w modelu Solta-Farbera mają niezwykle ważne znaczenie w badaniach biologii komórek macierzystych nie tylko wątroby, ale i trzustki, a także w poznaniu histogenezy pierwotnych nowotworów wątroby, to jest raka wątrobowokomórkowego, raka przewodów żółciowych wewnątrzwątrobowych (CC, ang. cholangiocarcinoma), guza o typie mieszanym łączącego cechy dwóch pierwszych wymienionych nowotworów (HCC-CC, ang. combined hepatocellular and cholangiocarcinoma lub MHC, ang. mixed hepatocellular and cholangiocarcinoma) i wątrobiaka płodowego. Ze względu na obszerność pracy, zainteresowanego Czytelnika odsyłam do najnowszych prac przeglądowych poświęconych tej problematyce (MARSZAŁEK 1998, MARSZAŁEK 1999 a, b, c, d).

ZMIANY CYTOLOGICZNE I ROZWÓJ CECHY OPORNOŚCI HEPATOCYTÓW

Pomimo intensywnych badań i poszukiwań jednoznacznych markerów procesu inicjacji trudno jest ustalić i zidentyfikować populację komórek zainicjowanych. Dlatego też o skuteczności i efektywności procesu inicjacji początkowo świadczy liczba powstających ognisk utworzonych przez zmienione pod względem morfologicznym komórki, wywodzące się z komórki zainicjowanej, a na dalszych etapach liczba guzków neoplastycznych. Zmiany patologiczne komórek identyfikowane są na podstawie ekspresji białek, najczęściej enzymatycznych, uznanych za markery procesu nowotworzenia (przykład: glukozo-6-fosfataza, gamma glutamyl transpeptydaza, forma łożyskowa transferazy glutationowej). Dlatego też określa się je jako ogniska komórek enzymatycznie zmienionych — EAF (ang. enzyme altered foci) bądź skrótem AHF (ang. altered hepatic foci). Aktywność enzymów markerowych, na przykład glukozo-6-fosfatazy, adenotrójfosfatazy (ATPaza), β -glukuronidazy, może być obniżona w komórkach, natomiast γ -glutamylotransferazy (GGT) i formy łożyskowej transferazy glutationowej (PGST) może ulegać podwyższeniu. Wydaje się, że PGST jest najbardziej czułym markerem etapu preneoplazji dla większości, choć, jak wykazano, nie dla wszystkich modeli hepatokarcynogenezy eksperymentalnej (OGAWA i współaut. 1980, TATEMATSU i współaut. 1988, KATO i współaut. 1993, MAKPOL i współaut. 1996, CAMERON 1989).

W modelu Solta-Farbera proces proliferacji hepatocytów rozpoczyna się już po kilku dniach od momentu inicjacji. Między 7 a 14 dniem eksperymentu ujawniono pierwsze komórki o zwiększonej ekspresji PGST (PGST⁺). Początkowo tworzą one małe i nieliczne ogniska. Ich liczba znacząco wzrasta do 21 dnia eksperymentu, a w 3 dniu po PH aktywna proliferacja hepatocytów dotyczy przede wszystkim komórek PGST⁺ (test z radioaktywną urydyną) (SOLT i FARBER 1976, SOLT i współaut. 1977, OGAWA i współaut. 1980, FARBER 1980, TANNO i OGAWA 1994, CAMERON 1989). Efektywność procesu inicjacji określił FARBER (FARBER 1980) jako jeden hepatocyt zainicjowany na 10⁶ hepatocytów, to jest około 10³ zmienionych komórek na 5 g wątroby.

W 21 dniu eksperymentu, w 30 godzinie po PH, proliferacja przebiega wyłącznie w komórkach ognisk i komórkach owalnych przy zanikającej proliferacji hepatocytów zewnątrzogniskowych. W 22 dniu sferyczne ognisko liczy około

4 000 komórek, zaś jego średnica około 20 komórek, natomiast guzki w 6 tygodniu eksperymentu osiągają średnicę 3–5 mm (SOLT i FARBER 1976, SOLT i współaut. 1977, MATSUMOTO i współaut. 1988).

W eksperymentach przeprowadzonych w modelu Solta-Farbera zbadano całkowity czas trwania pełnego cyklu komórkowego oraz poszczególne jego stadiów. Analizę przeprowadzono po jednym i dwóch miesiącach od momentu inicjacji, a otrzymane wyniki porównano z odpowiednimi wartościami dla regenerującej wątroby szczura (ROTSTEIN i współaut. 1984). Stwierdzono, że czas pełnego cyklu komórkowego, który w regenerującej wątrobie szczura wynosi 33,6 godziny, wydłużony jest do 38,6 godzin jedynie w komórkach wczesnych, bo jednomiciesicznych guzków. Wydłużenie, dotyczące fazy S cyklu komórkowego, wydaje się być efektem działania 2-AAF, którego aktywne metabolity wchodzi w interakcję z DNA. Czas trwania fazy S w komórkach guzków w 2 miesiącu eksperymentu odpowiada czasowi fazy S w hepatocytach regenerującej wątroby szczura. Można to wytłumaczyć „ucieczką” komórek od hamującego mitozę działania pochodnych 2-AAF. Stwierdzono również, że komórki formujące guzki w 2 miesiącu, podobnie jak hepatocyty prawidłowej wątroby szczura, podlegają normalnemu rytmowi dobowemu, który wyraża się między innymi dzienną odpowiedzią proliferacyjną. Maksimum podziałów komórek prawidłowej wątroby szczura przypada na godzinę 10 rano. Sugeruje to istnienie podobnych mechanizmów regulujących podziały komórkowe na początkowym etapie procesu hepatokarcynogenezy, a zainicjowane komórki proliferują w sposób synchroniczny, przynajmniej w początkowym okresie, to znaczy do 21–28 dnia eksperymentu (ROTSTEIN i współaut. 1984, SOLT i współaut. 1977, OGAWA i współaut. 1980, TATEMATSU i współaut. 1988).

W 14 dniu trwania eksperymentu zidentyfikowano liczne ogniska ze wzmożoną aktywnością GGT (GGT⁺). Ich charakter był jednak niejednorodny, gdyż zarówno ogniska, jak i wczesne guzki mogą podlegać procesowi progresji lub regresji. Progresja prowadzi w kierunku rozwoju zmian nowotworowych, natomiast w wyniku regresji zanikają cechy świadczące o stanie patologicznym komórki, co oznacza jej powrót — pod względem fenotypowym — do stanu wyjściowego (SOLT i współaut. 1977, FARBER 1980, FARBER i CAMERON 1980, TATEMATSU i

współaut. 1983, FARBER 1973). Około 40% ognisk wykazywało obniżoną aktywność ATPazy, około 30% obniżoną aktywność glukozy-6-fosfatazy, około 19% — spadek aktywności obu tych enzymów jednocześnie. W 26 dniu eksperymentu 98% ognisk i wczesnych guzków jest GGT⁺, a aktywności ATPazy i glukozy-6-fosfatazy są obniżone w znaczącym odsetku zmian neoplastycznych (OGAWA i współaut. 1980).

Poziom aktywności PGST oraz GGT zbadano także na dalszych etapach hepatokarcynogenezy, to jest w 4, 8, 20, 35 i 50 tygodniu (TATEMATSU i współaut. 1988). Od 4 tygodnia zmniejszenie aktywności GGT zaobserwowano w niewielkiej części ognisk, w których wysoki poziom PGST wydawał się być stabilny. W 8 tygodniu eksperymentu komórki wyłonionych guzków neoplastycznych charakteryzowała znaczna aktywność PGST i wyraźny spadek aktywności GGT, postępujący aż do całkowitego zaniku w miarę rozwoju guza. Zanalizowane w tym eksperymencie komórki wszystkich HCC także cechował brak aktywności GGT oraz wzmożona aktywność PGST. Od 20 tygodnia aktywność enzymów w guzkach neoplastycznych sugerowała następowanie procesu formowania „guzków w guzkach” (ang. nodules within nodules), a zanik aktywności GGT autorzy wiążą raczej z procesem progresji zmian w kierunku HCC, niż z procesem regresji guzków. Utrzymujący się w dłuższym czasie i nie podlegający fluktuacjom, a więc stabilny wzrost aktywności PGST pozwala sądzić, że w omawianym modelu właśnie ten enzym jest najlepszym markerem zarówno procesu inicjacji, jak i rozwoju guza (TATEMATSU i współaut. 1988).

Także MAKPOL i współaut. (1996) zanalizowali aktywności GGT, PGST i alkalicznej fosfatazy zarówno w komórkach wątroby, jak i w surowicy krwi szczurów w 4, 6, 8, 12 i 16 tygodniu trwania eksperymentu. Spadek aktywności GGT zarówno w surowicy krwi, jak i w komórkach wątroby pomiędzy 6 a 12 tygodniem w porównaniu z wysoką aktywnością w 4 tygodniu, można tłumaczyć, zdaniem autorów, regresją części zmian o charakterze preneoplastycznym. Ponowny wzrost aktywności GGT w 16 tygodniu eksperymentu autorzy wiążą z procesem progresji guza (MAKPOL i współaut. 1996).

Od momentu wyłonienia się guzków neoplastycznych rozpoczyna się zatem etap ich zróżnicowania fenotypowego, a rozwój niewielkiej tylko części, to jest 5%–15% guzków, postępuje w kierunku HCC. Rak wątrobowokomórkowy *in statu nascendi*, identyfikowany jako guz typu trabekularnego (beleczkowatego), dobrze, średnio lub słabo

zróżnicowany, rozpoznawany jest histologicznie w 7–8 miesiącu trwania eksperymentu (SOLT i FARBER 1976, SOLT i współaut. 1977).

Wzrost aktywności enzymów fazy II, między innymi PGST, GGT, UDP-glukuronylo-transferazy i DT-diaforazy, ujawniony w zainicjowanych komórkach, w guzkach neoplastycznych oraz w komórkach HCC, wiąże się ze zjawiskiem oporności komórek na cytotoksyczne działanie wielu związków chemicznych, w tym i karcynogenów (FARBER 1987, ROOMI i współaut. 1985, CAMERON 1989). Również spadek aktywności enzymów fazy I metabolizmu ksenobiotyków, na przykład cytochromów typu P-450, jest związany z cechą oporności, której wyrazem jest między innymi obniżenie zdolności komórek zainicjowanych do aktywacji prokarcynogenów, zmniejszenie ilości aktywnych metabolitów karcynogenów kowalencyjnie związanych z DNA, RNA i białkami, czy też brak efektu nekrotycznego po zastosowaniu dawek toksycznych dla komórek prawidłowych (FARBER 1987, ROOMI i współaut. 1985, FARBER i współaut. 1976). Wykazano, że w omawianym modelu komórki guzków neoplastycznych są prawie całkowicie odporne na dawkę czterochloru węgla, letalną dla 100% szczurów prawidłowych grupy kontrolnej. Autorzy sugerują wręcz ochronny charakter zmian, jakie zaszły w komórkach wątroby szczura podczas hepatokarcynogenezy, co wyraża się zmniejszeniem śmiertelności szczurów grupy badanej do 7% (HARRIS i współaut. 1989).

Po ekspozycji hepatocytów guzków, indukowanych w modelu Solta-Farbera, na różne związki chemiczne, na przykład 2-AAF, fenobarbital, obserwuje się również zmiany w obrębie cytoszkieletu (NIZARD i współaut. 1993). Charakteryzują się one między innymi mniejszą, w porównaniu z komórkami wątroby prawidłowej, wrażliwością i podatnością włókien F-aktyny na fragmentację, a tubuliny na depolimeryzację. NIZARD i współaut. (1993) sugerują, że zmiany te mają związek ze zjawiskiem oporności wielolekowej i są wyrazem przekształconego w kierunku aktywnej detoksykacji profilu metabolicznego zainicjowanych komórek. Hepatocyty, w których stwierdza się wzmożoną aktywność PGST oraz GGT, są w mniejszym stopniu zmienione niż komórki prawidłowe, a także te, w których nie stwierdza się podwyższonego poziomu tych markerów (NIZARD i współaut. 1993). O pojawieniu się cechy oporności w komórkach guzków neoplastycznych świadczy także wzrost zarówno transkryptów genów *mdr* (ang. multidrug resistance), jak i produktów białkowych tych genów, tak zwanej glikoprotei-

ny P (P-gp) (TEETER i współaut. 1993). Wyniki wielu prac potwierdzają założenia modelu, który w piśmiennictwie określany jest również jako

model opornych hepatocytów — „Hepatocyte-resistant model”.

ROZWÓJ CECHY NIEZALEŻNEGO I EKSPANSYWNEGO WZROSTU KOMÓREK

Analizę wzrostu guzków w modelu Solta-Farbera przeprowadzono w 1, 2, 4, 6 i 8 miesiącu eksperymentu. Wyróżniono trzy fazy: pierwszą — szybkiego wzrostu, pomiędzy 1 a 2 miesiącem, drugą — wolnego wzrostu, pomiędzy 2 a 6 miesiącem oraz trzecią — ponownie szybkiego wzrostu, pomiędzy 6 a 8 miesiącem. Czas, potrzebny do wyznakowania radioaktywną tymidyną 50% populacji komórek guzków w 2 i 4 miesiącu, wynosi 12 dni, a w 6 miesiącu tylko 6 dni (ROTSTEIN i współaut. 1986). Wczesne zmiany charakteryzuje nieznaczna liczba hepatocytów apoptotycznych oraz podniesiony do 8,9–13,1% indeks znakowania radioaktywną tymidyną. W komórkach parenchymy, otaczającej guzki, indeks ten wynosi on 0,5–0,8%. Populacja proliferujących komórek w guzkach w 2, 4 i 6 miesiącu trwania eksperymentu wynosiła odpowiednio 4%, 4% i 8%, zaś w otaczającej guzki parenchymie — jedynie 0,4%.

W rozwijających się guzkach liczba apoptotycznych hepatocytów jest znacząca i w 2 i 6 miesiącu wynosi odpowiednio 3% i 7%. Wzrost liczby hepatocytów apoptotycznych podczas hepatokarcynogenezy był zaskakujący, gdyż komórki nowotworów mają obniżony indeks apoptotyczny. Autorzy sugerują, że nasilenie apoptozy w guzkach identyfikowanych na późniejszych etapach nowotworzenia jest rezultatem między innymi zmienionej dostępności szeroko rozumianych czynników odżywczych komórek. Rozwój guzków preneplastycznych prowadzi bowiem do zmiany cytoarchitektoniki w obrębie zrazika i do rearanżacji otaczającego guzki zrębu wątroby. Dlatego też guzki mają wyłącznie unaczynienie tętnicze i nie dopływa do nich krew odżywcza, która w wątrobie prawidłowej płynie w naczyniach zatokowych. Zdaniem autorów, w tym przypadku proces apoptozy może być zatem stymulatorem regeneracji i w ten sposób wpływać na progresję guzków. Wzmoczona proliferacja genetycznie zmienionych komórek guzków, rekompensująca liczbę komórek utraconych w efekcie apoptozy, może stać się źródłem kolejnych mutacji, których akumulacja prowadzi do rozwoju nowotworu (ROTSTEIN i współaut. 1986).

Proces wzmoczonej proliferacji komórek, obserwowany we wczesnych zmianach preneplastycznych, zdaniem FARBERA (1988), można tra-

ktować jako formę wzrostu, który prowadzi jedynie do kompensacji masy narządu utraconej na skutek zabiegu częściowej hepatektomii. Takie zwiększenie liczby komórek nie prowadzi zatem do uruchomienia mechanizmów kontrolnych i dlatego też na tym etapie liczba komórek apoptotycznych jest znikoma. Z kolei guzki identyfikowane na późniejszych etapach hepatokarcynogenezy charakteryzuje, podobnie jak narząd prawidłowy, obecność mechanizmów kontrolujących liczbę komórek. Posiadają one zatem zdolność do zachowania stanu równowagi pomiędzy procesem wzmoczonej proliferacji a procesem apoptozy. FARBER (1988) przypuszcza, że nasilony proces apoptozy, obserwowany w guzkach późniejszych, jest stymulowany przez wzrost liczby komórek powyżej wartości krytycznej, to znaczy takiej liczby komórek, która odpowiada stanowi równowagi procesów apoptozy i proliferacji. Jednocześnie sugeruje on, że w miarę rozwoju zmian w procesie hepatokarcynogenezy, w komórkach guzków następuje jednak utrata zdolności do utrzymania procesów proliferacji i apoptozy w stanie równowagi. Stanowi to kolejny krok w kierunku zezłośliwienia (FARBER 1988).

Wyrazem rozwoju komórek guzków jest nabycie w 6 miesiącu ich wzrostu nowej cechy, nieobecnej w 2 i 4 miesiącu, a mianowicie wzmoczonej i trwałej aktywności proliferacyjnej. W odpowiedzi na zastosowany drugi, dodatkowy czynnik mitogeny, komórki z 6-miesięcznych guzków aktywnie proliferują jeszcze w 14 i 21 dniu, podczas gdy wzmoczona aktywność proliferacyjna komórek z 2-miesięcznych guzków wygasa po 7 dniach od momentu ekspozycji na taki czynnik. Cechę niezależnego lub częściowo niezależnego wzrostu ujawniają komórki neoplastyczne stosunkowo późno, bo w około 6 miesiącu procesu hepatokarcynogenezy (OGAWA i współaut. 1980, ROTSTEIN i współaut. 1986).

Ta nowa cecha, którą jest niezależna i ciągła proliferacja prowadząca do wzrostu liczby komórek, wydaje się odzwierciedlać zmiany, jakie zaszły na poziomie genomu w mechanizmach kontrolujących cykl komórkowy. Zmiany te mają charakter nieodwracalny, a komórki, w których one nastąpiły, tracą zdolność powrotu do swego stanu podstawowego. Jest to cecha, jaką posiada populacja komórek nowotworowych.

Guzki, których komórki nabyły cechę ekspansyjnego wzrostu, mają charakter stabilny, trwały i podlegają procesowi progresji (ROTSTEIN i współaut. 1986). Wykazano, że z przetrans-

plantowanych komórek guzków rozwijają się u biorcy zmiany o charakterze nowotworowym (LAISHES i współaut. 1978).

ZMIANY MATERIAŁU JĄDROWEGO — ZMIANY EKSPRESJI BIAŁEK

Znaczącą i postępującą w czasie reorganizację materiału jądrowego, wyrażającą się między innymi dekondensacją chromatyny, wykazano w hepatocytach na różnych etapach nowotworzenia wywołanych postępowaniem według modelu Solta-Farbera (BARBORO i współaut. 1993). Proces relaksacji chromatyny, wyraźnie widoczny w hepatocytach 16-tygodniowych guzków, prowadzi praktycznie do zaniku obszarów skondensowanej chromatyny w guzkach 46 tygodniowych. Na podstawie analizy charakteru i stopnia dekondensacji chromatyny w komórkach guzków i w proliferujących hepatocytach po PH, autorzy sugerują, że proces dekondensacji chromatyny jest elementem jej reorganizacji związanej raczej z procesem hepatokarcynogenezy a nie z aktywnością proliferacyjną hepatocytów, kiedy dekondensacja ma charakter krótkotrwały, przejściowy. Może być zatem uznany za cechę transformacji nowotworowej (BARBORO i współaut. 1993).

Niewiele wiadomo o specyficznych białkach jądrowych, pojawiających się w ogniskach preneoplastycznych na etapie poprzedzającym wyłonienie się guzków neoplastycznych, w porównaniu ze wspomnianymi, cytoplazmatycznymi białkami o charakterze znaczników (THORGEIRSON i WIRTH 1989). Szczególną rolę w procesie karcynogenezy odgrywają produkty białkowe onkogenów komórkowych. Wzrost ekspresji onkogenów: *myc*, *H-ras* czy *K-ras* zaobserwowano w indukowanych zgodnie z procedurą Solta-Farbera guzkach neoplastycznych w 11, 13 i 21 tygodniu ich rozwoju oraz w komórkach HCC (NAGY i współaut. 1988, GARCEA i współaut. 1989). PORSCH-HÄLLSTRÖM i współaut. (1989) wykazali również 2–4-krotny wzrost ekspresji onkogenów *myc* i *fos* w 11 i 15 tygodniu oraz w 7 i 12 miesiącu rozwoju guza indukowanego zgodnie z metodą Solta-Farbera, nie obserwując jednocześnie zmiany ekspresji onkogenu *H-ras*. Również PASCALE i współaut. (1996) wykazali 3–10-krotny wzrost ilości kopii genu *c-myc* w 12, 30 i 54 tygodniu trwania eksperymentu, to jest w 80% guzków określonych jako wczesne, w 65% guzków późnych oraz w 85% HCC. Autorzy sugerują związek amplifikacji tego genu z populacją komórek preneoplastycznych, które przejawiając większy potencjał proliferacyjny, mają większą możliwość progresji w kierunku

złośliwienia (PASCALE i współaut. 1996). W toku dalszych badań ujawniono zależną od płci ekspresję onkogenu *myc* i *ets* podczas hepatokarcynogenezy u szczurów. Najwcześniej, bo w 11 tygodniu, ekspresji ulega onkogen *myc* u samców, zaś obydwa onkogeny ulegają wzmożonej ekspresji u przedstawicieli obu płci w 8 i 11 miesiącu eksperymentu (BEER i współaut. 1988, FEO 1992). Stosując analizę typu „Northern blot” i hybrydyzację *in situ*, wykazano wysoki poziom ekspresji tego onkogenu nie tylko w proliferujących komórkach owalnych i zaskochłonnnych hepatocytach, ale również w populacjach komórek pojawiających się w modelu, w którym pominięto etap inicjacji. W komórkach tych jednak po 10 tygodniach, gdy obraz mikroskopowy tkanki odpowiada ponownie wątrobie prawidłowej, ekspresja onkogenu *myc* powraca do poziomu wyjściowego. Autorzy sugerują, że wczesny i stabilny wzrost ekspresji onkogenu *myc* w klasycznym modelu Solta-Farbera związany jest z procesem nie tylko proliferacji, ale także z krytycznym dla hepatokarcynogenezy zablokowaniem prawidłowego procesu różnicowania hepatocytów (NAGY i współaut. 1988). Z kolei BEER i współaut. (1986) nie stwierdzili wzrostu ekspresji onkogenu *myc* na wczesnym etapie hepatokarcynogenezy indukowanej DENA mimo amplifikacji tego genu w HCC czy wątrobiaku Morrisa.

SUZUKI i współaut. (1995) zbadali immunohistochemicznie ekspresję onkogenu *jun* i *fos* we wczesnych ogniskach neoplastycznych, indukowanych zgodnie z procedurą Solta-Farbera w 24, 42 dniu oraz 35 tygodniu trwania eksperymentu. Niezależną od stałej i wysokiej ekspresji białka PGST, wzmożoną ekspresję genu *jun* wykazano dopiero w komórkach HCC, przy minimalnej ekspresji w 24 i 42 dniu i całkowitym braku ekspresji białka Fos. Niezależna od czynnika AP1 i onkogenu *jun*, wysoka ekspresja białka PGST sugeruje, że podczas hepatokarcynogenezy w procesie transkrypcji odgrywają rolę niezidentyfikowane czynniki, inne niż w tkance prawidłowej. Gen *jun* odpowiada, jak się wydaje, za utrzymanie wysokiej ekspresji białka PGST dopiero na bardziej zaawansowanym etapie nowotworzenia (SUZUKI i współaut. 1995).

Analizie ilościowej i jakościowej poddano także białka jądrowe o wysokim powinowactwie do jonów srebra, to jest białka Ag-NOR. Białka zbadano w komórkach guzków neoplastycznych i komórkach HCC odpowiednio w 36 i 60 tygodniu hepatokarcynogenezy indukowanej zgodnie z modelem Solta-Farbera. Wyniki badań porównano z wynikami analizy białek hepatocytów prawidłowych i komórek wątroby marskiej (TREERE i współaut. 1996).

Analiza ilościowa wykazała stopniowy wzrost poziomu całkowitych białek Ag-NOR podczas hepatokarcynogenezy. Stwierdzono, że istotne ilościowe zmiany dotyczą głównie nukleoliny i, w mniejszym stopniu, białka B23. W toku analizy porównawczej białek Ag-NOR komórek wątroby prawidłowej i wątroby marskiej, komórek guzków i komórek HCC nie ujawniono różnic jakościowych. Nie wykazano również niezrównoważonej syntezy różnych białek Ag-

NOR, procentowy bowiem udział dwóch wymienionych komponentów w ogólnej ilości tych białek pozostaje we wszystkich badanych komórkach na stałym poziomie (około 80%). Wykazano natomiast, że stopniowy wzrost ilości nukleoliny i białka B23 podczas hepatokarcynogenezy, związany jest z procesem wzmożonej proliferacji komórek. Świadczy o tym wzrost indeksu znakowania radioaktywną tymidyną w komórkach guzków i komórkach HCC, który to indeks wynosi odpowiednio 1,77% i 5,1%, w porównaniu z indeksem komórek prawidłowych, który wynosi on 0,08% (TREERE i współaut. 1996). Wyniki badań białek Ag-NOR, podczas hepatokarcynogenezy eksperymentalnej, potwierdziły związek między wzrostem ilości tych białek, szybkością proliferacji komórek a stopniem zaawansowania zmian nowotworowych. Znaczenie tych badań dla diagnostyki medycznej jest oczywiste.

ZMIANY PLOIDII HEPATOCYTÓW

Podczas hepatokarcynogenezy indukowanej zgodnie z procedurą Solta-Farbera następuje zahamowanie poliploidyzacji hepatocytów, mającej miejsce podczas rozwoju i wzrostu wątroby prawidłowej. Komórki wątroby charakteryzuje wysoki stopień poliploidalności, będący wyrazem postępującego procesu ich różnicowania się. Zmiany w procesie poliploidyzacji hepatocytów wyrażają się 4–5-krotnym wzrostem liczby hepatocytów diploidalnych w porównaniu z tkanką prawidłową, w której stanowią one zaledwie około 10–15% komórek (CANUTO i współaut. 1993, DELEENER i współaut. 1987, STYLES i współaut. 1985, SAETER i współaut.

1989). Diploidalne hepatocyty reprezentują 40–60% populacji komórek guzków w 6 tygodniu eksperymentu, a ich liczba wzrasta do 70–90% w guzkach preneoplastycznych i HCC. Odwrócenie stosunku liczby jąder tetraploidalnych do diploidalnych na rzecz tych ostatnich potwierdzono na różnych etapach rozwoju guza, to jest w 5, 7, 9 i 12 miesiącu (CANUTO i współaut. 1993). Komórki pierwotnych nowotworów wątroby są głównie aneuploidalne i diploidalne. Te ostatnie dominują w guzie, podobnie jak na pierwszych etapach rozwoju wątroby (MELCHIORRI i współaut. 1994).

ZMIANY W METABOLIZMIE BIAŁEK

Obniżony poziom katabolizmu białek w komórkach nowotworowych, w porównaniu z prawidłowymi, jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za akumulację i zachowanie ich dla fazy wzrostu guza (KISEN i współaut. 1993, SEGLEN i współaut. 1990, TAYEK i współaut. 1988). Obniżony poziom katabolizmu białek stwierdzono w hepatocytach w czasie karcynogenezy, indukowanej zgodnie ze zmodyfikowaną wersją modelu Solta-Farbera, na etapie: preneoplazji, w komórkach guzków neoplastycznych w 5, 7, 9 i 12 miesiącu oraz w komórkach HCC. Sądzi się, że za proces zmniejszonego tempa degradacji białek wewnątrzkomórkowych odpowiedzialna jest modulacja lizosomalnego trawienia, która polega na obniżeniu aktywności hydrolitycznej i zdolności do auto-

fagii. Jednym z mechanizmów warunkujących obniżenie aktywności hydrolaz i redukcję tempa wewnątrzkomórkowej proteolizy w lizosomach komórek guzków indukowanych 2-AAF jest spadek stężenia jonów wodorowych w wakuolach przedlizosomowych (CANUTO i współaut. 1993, KISEN i współaut. 1993, ANDERSON i współaut. 1989). Zjawisko redukcji proteolizy, a więc i degradacji białek, dotyczy również komórek nienowotworowych, ale aktywnie proliferujących, na przykład w czasie wzrostu wątroby w ontogenezie, w okresie niedożywienia organizmu oraz po zabiegu PH w trakcie kompensacyjnego przyrostu masy narządu (CANUTO i współaut. 1993, CAJONE i BERNELLI-ZAZZERA 1980, CUERVO i współaut. 1995).

MODEL SOLTA-FARBERA A CZYNNIKI BIOLOGICZNE

Analiza wpływu czynników biologicznych: płci i wieku zwierząt na efektywność oryginalnej procedury Solta-Farbera wykazała, że zarówno ogniska preneoplastyczne, jak i pierwsze zmiany nowotworowe pojawiają się szybciej u samców niż u samic, co — być może — zależy od, uwarunkowanej dymorfizmem płciowym, różnej sekrecji czynników wzrostu komórek (PORSCH-HÄLLSTRÖM i współaut. 1989). Z kolei, najwięcej ognisk hepatocytów PGST⁺ w 8 tygodniu eksperymentu stwierdzono w przypadku indukcji hepatokarcynogenezy u 6-tygodniowych szczurów, choć obecność licznych zmian wykazano również u zwierząt starszych, to jest 26 i 46 tygodniowych (HASEGAWA i współaut. 1991). Porównując efekt promocyjny innych czynników mitogennych, takich jak: czterochlorek węgla (CCl₄) i D-galaktozamina (DGA), powodujących nekrozę odpowiednio w środkowej części zrazika (*centrilobular*) i obszarze wokół żyły wrotnej (*periportal*), stwierdzono, że bardziej efektywna od CCl₄ jest DGA, choć zabieg

częściowej hepatektomii wydaje się być najskuteczniejszym czynnikiem promocyjnym w omawianym modelu (TSUDA i współaut. 1987).

W literaturze przedmiotu funkcjonują różne modyfikacje oryginalnej metodyki Solta-Farbera, które prowadzą do redukcji okresu utajenia guza i przyspieszają rozwój HCC (DELEENER i współaut. 1987, Van GOETHEM i współaut. 1993). Rozszerzeniem tego modelu jest procedura zakładająca oprócz klasycznych etapów inicjacji i promocji, dodatkowy, drugi etap promocji. Etapy inicjacji i promocji są w zasadzie podobne jak w modelu Solta-Farbera, choć 2-AAF stosowany jest w wyższym stężeniu (0.03%), zaś zabieg częściowej hepatektomii zastąpiony jednokrotną dawką czterochloru węgla (2 ml/kg). Dodatkowym czynnikiem promocyjnym jest 0,05% fenobarbital, podawany w wodzie pitnej począwszy od 8 dnia po zakończeniu pierwszego etapu promocji aż do końca eksperymentu.

UWAGI KOŃCOWE

Pomimo intensywnych badań procesu hepatokarcynogenezy, prowadzonych od momentu skonstruowania w 1976 roku modelu „Opornych hepatocytów”, mechanizm zarówno powstawania, jak i rozwoju zmian nowotworowych nie został w pełni poznany i nadal stanowi przedmiot badań, o czym świadczą liczne pub-

likacje na ten temat. Jedną z wielu kwestii, jakie pozostają nadal do wyjaśnienia w tym tak wszechstronnie badanym modelu, jest poznanie wszystkich mechanizmów działania zarówno DENA, zabiegu częściowej hepatektomii, jak i 2-AAF, a zwłaszcza zrozumienie pełnej roli tego ostatniego związku (PASCALE i współaut. 1996).

THE SOLT — FARBER MODEL AS AN EXAMPLE OF MULTISTAGE EXPERIMENTAL HEPATO-CARCINOGENESIS

Summary

There are many models for studying hepatocarcinogenesis as a multistep process but not all provide synchronism in the development of altered cells population. One of the most useful models for studying multistep experimental hepatocarcinogenesis and step-by-step analysis of the sequence of liver cell carcinoma development is the "Hepatocyte resistant models", so called the Solt-Farber

regimen. The article presents the theoretical basis of this model and changes occurring during hepatocarcinogenesis: histological and biochemical alterations, cell growth dynamic alterations, alterations in nuclear material, ploidy and protein influence of biological factors on hepatocarcinogenesis and modifications of this model are also discussed.

PIŚMIENICTWO

- ANDERSON G. N., TORNDAL U. B., ERIKSSON L. C., 1989. Decreased vacuolar acidification capacity in drug-resistant rat liver preneoplastic nodules. *Cancer Res.* 49, 3765–3569.
- BARBORO P., PASINI A., PARODI S., BALBI C., CAVAZZA B., ALLERA C., LANZZARINI G., 1993. Chromatin changes in cell transformation; progressive unfolding of the high-order structure during the evolution of rat hepatocyte nodules.

- A differential scanning calorimetry study. *Biophys. J.* 65, 1690–1699.
- BEER D. G., NEVEU M. J., PAUL D. L., RAPP U. R., PITOT H. C., 1988. Expression of *c-ras* protooncogene, γ -glutamyl transpeptidase, and gap junction protein in rat liver neoplasms. *Cancer Res.* 48, 1610–1617.
- BEER D. G., SCHWARZ M., SAWADA N., PITOT H. C., 1986. Expression of *H-ras* and *c-myc* protooncogenes in isolated γ -glutamyl transpeptidase-positive rat hepato-

- cytes and in hepatocellular carcinomas induced by diethylnitrosamine. *Cancer Res.* 46, 2435–2441.
- CAJONE F., BERNELLI-ZAZZERA A., 1980. Protein synthesis in regenerating liver. *Int. J. Biochem.* 12, 537–544.
- CAMERON R. G., 1989. Identification of the putative first cellular step of chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 47, 163–167.
- CANUTO R. A., TESSITORE L., MUZIO G., AVTELLI R., BECCINO F. M., 1993. Tissue protein turnover during liver carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14, 2581–2587.
- CARRIAGA M. T., HENSON D. F., 1995. Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. *Cancer Suppl.* 75, 171–190.
- CASELAMANN W. H., ALT M., 1996. Hepatitis C virus infection as a major risk factor for hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology* 24, 61–66.
- CUERVO A. M., PALMER A., RIVETT A. J., KNECHT E., 1995. Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 227, 792–800.
- DELEENER A., CASTELAIN P. H., PREAT Y., de GERLACHE J., ALEXANDRE H., KIRSCH-VOLDERS M., 1987. Changes in nucleolar transcriptional activity and nuclear DNA content during the first steps of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 8, 195–201.
- FARBER E., 1956. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine 2AAF and DMAB. *Cancer Res.* 16, 142–148.
- FARBER E., 1973. Hyperplastic liver nodules. *Meth. Cancer Res.* 1, 345–375.
- FARBER E., 1980. The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochim. Biophys. Acta* 605, 149–166.
- FARBER E., 1987. Resistance phenotype in the initiation and promotion of chemical hepatocarcinogenesis. *Chemica Scripta* 27A, 131–133.
- FARBER E., 1988. Cell proliferation and cell loss in progression in liver carcinogenesis: a new hypothesis. 4th Sardinian International Meeting on: Models and mechanisms in chemical carcinogenesis, str. 167–172.
- FARBER E., CAMERON R., 1980. The sequential analysis of cancer development. *Adv. Cancer Res.* 31, 125–226.
- FARBER E., PARKER S., GRUENSTEIN M., 1976. The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some carcinogens. *Cancer Res.* 36, 3879–3887.
- FEU F., 1992. Genetic and epigenetic determinants of premalignant and malignant phenotype. *Cancer Res.* 10, 163–166.
- GARCEA R., DAINO L., PASCALE R., SIMILE M. M., PUDDU M., RUGGIU M. E., SEDDAIU M. A., SATTA G., SEGUEMA M. J., FEU F., 1989. Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic nodules induced in the rat by DENA. *Carcinogenesis* 10, 1183–1192.
- HARRIS L., MORRIS L. E., FARBER E., 1989. Protective value of a liver initiation-promotion regimen against the lethal effect of carbon tetrachloride in rats. *Lab. Invest.* 61, 467–470.
- HASEGAWA R., TAKAHASHI S., IMAIDA K., YAMAGUCHI S., SHIRAI T., ITO N., 1991. Age-dependent induction of preneoplastic liver cell foci by 2-Acetylaminofluorene, phenobarbital and acetaminophen in F344 rats initially treated with diethylnitrosamine. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 293–297.
- HILDT E., HOFSCHEIDER URBAN S., 1996. The role of hepatitis B virus HBV in the development of hepatocellular carcinoma. *Virology* 7, 333–347.
- KATO T., IMAIDA K., OGAWA K., HASEGAWA R., SHIRAI T., TATEMATSU M., 1993. Three-dimensional analysis of glutathione S-transferase placental form-positive lesions development in early stages of rat hepatocarcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 84, 1252–1257.
- KISEN G., TESSITORE L., COSTELLI P., GORDON P. B., SCHWARZE P. E., BACCINO F. M., SEGLEN P. O., 1993. Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis* 14, 2501–2505.
- LAISHES B. A., ROBERTS E., FARBER E., 1978. In vitro measurement of carcinogen-resistant liver cells during hepatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer* 21, 186–193.
- MAKPOL S., WAN NGAI W. Z., SHAMAAN N. A., JARIEN Z., MARZUKI A., KHALID B. A. K., 1996. γ -Glutamyl transpeptidase, glutathione S-transferase, alkaline phosphatase, and glutathione levels during different stages of chemically induced hepatocarcinogenesis in the rat. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 20, 121–129.
- MARSZALEK M., 1998. Komórki owalne a komórki macierzyste w trzustce. *Hepatologia Polska* 4, 261–268.
- MARSZALEK M., 1999a. Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka. Część I. Postępy Biologii Komórki 26, 135–157.
- MARSZALEK M., 1999b. Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka. Część II. Postępy Biologii Komórki 26, 159–179.
- MARSZALEK M., 1999c. Komórki owalne w procesie nowotworzenia wątrobowokomórkowego – wielki spór o małe komórki. Część I. *Hepatologia Polska. Praca przyjęta do druku.*
- MARSZALEK M., 1999d. Komórki owalne w procesie nowotworzenia wątrobowokomórkowego – wielki spór o małe komórki. Część II. *Hepatologia Polska. Praca przyjęta do druku.*
- MATSUMOTO M., TAMAKOSHI K., KANAI K., KAKO M., FUKUMOTO T., 1988. Expression of a hepatocyte membrane antigen during hepatocarcinogenesis and in the developing liver of the rat. *Int. J. Cancer* 41, 583–588.
- MELCHIORRI C., BOLONDI L., CHIECO P., PAGNONI M., GRAMANTIERI L., BARBARA L., 1994. Diagnostic and prognostic value of DNA ploidy and cell nuclearity in ultrasound guided liver biopsies. *Cancer* 74, 1713–1719.
- NAGY P., EVARTS R. P., MARSDEN E., ROACH J., THORGEIRSSON S. S., 1988. Cellular distribution of c-myc transcripts during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 48, 5522–5527.
- NIZARD C., MARTIN M., DECLOITRE F., 1993. Cytoskeleton modifications induced by phenobarbital, 2-acetylaminofluorene and 4-acetylaminofluorene in normal and initiated/selected hepatocytes: relation with the „resistant” phenotype. *Cell Biol. Toxicol.* 9, 61–76.
- OGAWA K., SOLT D. B., FARBER E., 1980. Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis. *Cancer Res.* 40, 725–733.
- PASCALE R. M., DE MIGLIO M. R., MURONI M. R., SIMILE M. M., DAINO L., SEDDAIU M. A., NUFRIAS A., GASPÀ L., DEIANA L., FEU F., 1996. c-myc amplification in pre-malignant and malignant lesions induced in rat liver by the resistant hepatocyte model. *Int. J. Cancer* 68, 136–142.
- PORSCH-HÄLLSTRÖM I., BLANCK A., ERIKSSON L. C., GUSTAFSSON J. A., 1989. Expression of the c-myc, c-fos and cHa-ras protooncogene during sex-differentiated rat liver carcinogenesis in the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis* 10, 1793–1800.
- ROOMI M. W., HO R. K., SARMA D. S. R., FARBER E., 1985. A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different models in the rat. *Cancer Res.* 45, 564–571.
- ROTSTEIN J., MACDONALD P. D. M., RABES H. M., 1984. Cell cycle kinetics of rat hepatocytes in early putative preneoplastic lesions in hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 44, 2913–2917.
- ROTSTEIN J., SARMA D. S. R., FARBER E., 1986. Sequential alterations in growth control and cell dynamics of rat hepatocytes in early precancerous steps in hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 46, 2377–2385.

- SAETER G., SCHWARZE P. E., NESLAND J. M., SEGLEN P. O., 1989. *Diploid nature of hepatocellular tumours developing from transplanted preneoplastic liver cells*. Br. J. Cancer 59, 198-205.
- SEGLEN P. O., SAETER G., SCHWARZE P. E., 1990. *Liver tumor promoters stimulate growth of transplanted hepatocellular carcinomas*. Hepatology 12, 295-300.
- SOLT D., FARBER E., 1976. *New principle for the analysis of chemical carcinogenesis*. Nature 263, 702-703.
- SOLT D. B., MEDLINE A., FARBER E., 1977. *Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis*. Am. J. Pathol. 88, 595-610.
- STYLES J., ELLIOT B. M., LEFEVRE P. A., ROBINSON M., PRITCHARD N., HART D., ASHBY J., 1985. *Irreversible depression in the ratio of tetraploid: diploid liver nuclei in rats treated with 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene*. Carcinogenesis 6, 21-28.
- SUZUKI S., SATOH K., NAKANO H., HATAYAMA I., SATO K., TSUCHIDA S., 1995. *Lack of correlated expression between the glutathione S-transferase P form and the oncogene products c-jun and c-fos in rat tissues and preneoplastic hepatic foci*. Carcinogenesis 16, 567-571.
- TANNO S., OGAWA K., 1994. *Abundant TGF α precursor and EGF receptor expression as a possible mechanism for the preferential growth of carcinogen-induced preneoplastic and neoplastic hepatocytes in rats*. Carcinogenesis 15, 1689-1694.
- TATEMATSU M., NAGAMINE Y., FARBER E., 1983. *Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver*. Cancer Res. 43, 5049-5058.
- TATEMATSU M., AOKI T., KAGAWA M., MERA Y., ITO N., 1988. *Reciprocal relationship between development of glutathione S-transferase positive liver foci and proliferation of surrounding hepatocytes in rats*. Carcinogenesis 9, 221-225.
- TAYEK J. A., BLACKBURN G. L., BISTRIAN B. R., 1988. *Alterations in whole body, muscle, liver, and tumor tissue protein synthesis and degradation in Novikoff hepatoma and Yoshida sarcoma tumor growth studied in vivo*. Cancer Res. 48, 1554-1558.
- TEETER L. D., ESTERS M., CHAN J. Y., ATASSI H., SELL S., BECKER F. F., KUO M. T., 1993. *Activation of distinct multidrug-resistance (P-glycoprotein) genes during rat liver regeneration and hepatocarcinogenesis*. Mol. Carcinogenesis 8, 67-73.
- THORGEIRSSON S. S., WIRTH P. J., 1989. *Biochemical marker alterations in hepatic preneoplasia and neoplasia*. [W:] *The Pathobiology of Neoplasia*. SIRICA A. E. (red.) Plenum Publishing, str. 385-397.
- TREERE D., DERENZINI M., SIRRI V., MONTANARO L., GRIGIONI W., FAA G., LEDDA COLUMBANO G.M., COLUMBANO A., 1996. *Qualitative and quantitative analysis of AgNOR Proteins in chemically induced rat liver carcinogenesis*. Hepatology 24, 1269-1273.
- TSUDA H., MASUI T., IKAWA E., IMAIDA K., I N., 1987. *Compared promoting potential of D-galactosamine, carbon tetrachloride and partial hepatectomy in rapid induction of preneoplastic liver lesions in the rat*. Cancer Lett. 37, 163-171.
- VAN GOETHEM F., ARBABI GHARROUDI M., CASTELAIN Ph., KIRSCH-VOLDERS M., 1993. *Frequency and DNA content of micronuclei in rat parenchymal liver cells during experimental hepatocarcinogenesis*. Carcinogenesis 14, 2397-2406.