



УДК 575

© 2007

О. А. Ковалева, И. Н. Вагина, Л. М. Морозова, Т. Т. Глазко,
В. И. Глазко

Генетическая нестабильность и предрасположенность к развитию опухолей у лабораторных линий мышей

(Представлено академиком НАН Украины В. Ф. Чехуном)

The different cytogenetic traits of genetic instability before the expression of phenotype changes related to the tumor development in lines BALB/c and ICR, are investigated. Two cytogenetic anomalies (aneuploidy and the asynchronous dividing of the centromeres of sister chromatides) typical of the spontaneous mutational spectra of these two lines are revealed. Presumably, these types of cytogenetic anomalies could be convenient markers of the early stages of tumor development.

Связь опухолевого роста с генетической нестабильностью изучается со времен Т. Бовери [1] — почти сто лет, однако до сих пор не удалось выявить такие ее характеристики, которые можно было бы однозначно связать с опухолевым процессом [2]. Сложность этого вопроса, очевидно, обусловлена многостадийностью развития опухоли. Представление о том, что канцерогенез проходит ряд автономно регулируемых этапов, впервые сформулировано Беренблумом в 1941 году [3] при анализе индукции опухолей кожи у мышей ароматическими углеводородами. В дальнейшем это положение было развито Фоулдсом, создавшим учение об опухолевой прогрессии [4]. В его основу легли экспериментальные наблюдения независимого прохождения через последовательные этапы неопластического превращения разных клеточных популяций одного и того же органа, так же как и независимых изменений отдельных признаков внутри каждой такой популяции. Двустадийность канцерогенеза достаточно давно показана на клеточных культурах для разного рода канцерогенных агентов [5]. Обнаружено, что сам процесс промоции может быть многостадийным [6].

Многостадийность канцерогенеза является одной из основных причин, затрудняющих выявление его ключевых событий. Именно поэтому, по-видимому, до сих пор отсутствуют даже предположения, с какими этапами развития опухоли может быть связана нестабильность хромосомного аппарата — с инициацией, промоцией фенотипического проявления неопластических признаков клеток или собственно со стадией прогрессии. Линейные мыши,

ввиду своей генетически обусловленной предрасположенности к прохождению разных стадий канцерогенеза, являются наиболее удобной моделью для оценки их связей с характеристиками нестабильности генетического аппарата. В настоящей работе выполнен сравнительный анализ комплекса цитогенетических характеристик клеток костного мозга у трех лабораторных линий мышей: ICR, линейной характеристикой которой является высокая частота спонтанного развития опухолей разного гистогенеза; BALB/c, с повышенной чувствительностью к промоции растительными маслами развития миелом; низкоракерной линии C57BL/6 (www.jax.org).

Материалы и методы. Выполнен цитогенетический анализ клеток костного мозга у мышей линии ICR, BALB/c и C57BL/6 вивария Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Для мышей линии BALB/c характерна низкая частота спонтанных опухолей, но высокая — под влиянием обработки животных различными промотирующими агентами (растительными маслами, другими химическими соединениями, гормонами). Линия мышей ICR (Institute of Cancer Research) является потомством аутбредной популяции, полученной в Институте онкологических исследований (США), и поддерживается путем скрещивания между сибсами. Эта линия выведена для изучения генетических механизмов развития злокачественных новообразований. В качестве контроля в анализ были включены мыши лабораторной линии C57BL/6, для которой такая повышенная предрасположенность к опухолевому росту не описана ([//www.jax.org](http://www.jax.org)).

Мутационные спектры мышей линий BALB/c и C57BL/6 неоднократно рассматривались ранее, в том числе и в наших работах [7].

Препараты клеток костного мозга готовили общепринятым способом (без применения колхицина): из бедренных костей задних лапок мышей вымывали гипотоническим раствором KCl (0,54%) костный мозг, клетки суспензировали и инкубировали в этом растворе при 37 °C в течение 20 мин, затем фиксировали смесью метилового спирта и уксусной кислоты (3 : 1), далее готовили препараты и окрашивали их красителем Гимза (“Merck”, Германия). Количество двуядерных лимфоцитов и одноядерных лимфоцитов с микроядрами подсчитывали на тех же препаратах в лимфоцитах, сохранивших цитоплазму, по стандартной методике.

Для анализа цитогенетической изменчивости рассматривали следующие характеристики дестабилизации генетического аппарата клеток: анеуплоидия, рассчитанная в двух вариантах (А-1, с числом хромосом $2n \pm 6$ к диплоидному числу мыши $2n = 40$, и А-2, с числом хромосом $2n \pm 1$), полиплоидия (ПП), хромосомные aberrации (ХА) (хромосомные, хроматидные разрывы, фрагменты, кольцевые хромосомы), асинхронность расщепления центромерных районов хромосом (АРЦХ), центромерные слияния по типу Робертсоновских транслокаций (центрические слияния, РБ). Количество митозов (МИ), частоту встречаемости двуядерных лимфоцитов (ДЛ) и апоптозов (А) рассчитывали на 1000 клеток, микроядра в одноядерных лимфоцитах (ЛМЯ) — по числу лимфоцитов с микроядрами на 1000 одноядерных лимфоцитов.

Статистическую достоверность различий по частотам встречаемости цитогенетических аномалий между группами животных оценивали по критерию Стьюдента (t_S).

Результаты и обсуждение. В результате сопоставления частот встречаемости различных типов цитогенетических аномалий в клетках костного мозга у “молодых” (2–3-месячных) мышей линий ICR, BALB/c и C57BL/6 были получены следующие данные (табл. 1). Оказалось, что “молодые” мыши линии ICR по частотам встречаемости таких аномалий, как А-2 и метафаз с ХА, РБ, АРЦХ, близки к животным линии BALB/c. Причем мыши

линии ICR так же, как и мыши линии BALB/c, статистически достоверно отличались от животных линии C57BL/6 высокой частотой А-2 ($P < 0,001$), ХА ($P < 0,001$) и АРЦХ ($P < 0,01$).

Высокую частоту встречаемости метафаз с ХА среди клеток костного мозга у мышей линии BALB/c в литературе связывают с типичной для животных этой линии сниженной активностью ферментов репарации ДНК [8, 9]. Для мышей линии ICR таких особенностей по репарации ДНК не описано. Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что у животных обеих линий наблюдается повышенная нестабильность не только по ХА, частота которых может прямо зависеть от активности репарации двуцепочечных разрывов ДНК, но и по повышенной изменчивости количества хромосом (А-2, с числом хромосом $2n \pm 1$), и по асинхронности расщепления центромерных районов хромосом (АРХЦ), в механизмы формирования которых процессы репарации ДНК прямо не входят. Следует подчеркнуть, что эти обе линии мышей характеризуются уже реализованной стадией инициации опухолевого роста в возрасте 2–3 мес., поскольку одна из них отличается высокой предрасположенностью к спонтанному развитию неоплазий (линия мышей ICR), а вторая — к индукции неоплазий различными промотирующими агентами (линия мышей BALB/c). Для обеих линий, относительно низкораковой линии C57BL/6, характерна повышенная частота встречаемости комплекса цитогенетических аномалий (А-2, ХА, АРХЦ) в клетках костного мозга: у мышей линии BALB/c без индукции промоции опухолевого роста, у мышей линии ICR до появления опухолей (см. табл. 1).

Особый интерес в этой связи вызывает факт повышенной частоты встречаемости АРЦХ в метафазных пластинках у животных линий BALB/c и ICR. В литературе накоплено достаточно большое количество данных о том, что повышенная частота встречаемости этой аномалии типична, в частности, для гемобластозов у людей [10]. Кариотип человека принято рассматривать как более стабильный, чем у мелких грызунов. Тем не менее в клетках периферической крови, например при острой лейкемии у детей, отмечается высокая частота встречаемости тех же аномалий: метафаз с преждевременным расхождением центромерных участков хромосом и анеуплоидных клеток (АРЦХ — 32%, А — 15%) [11, 12].

Исследуемая популяция мышей линии ICR характеризуется высокой частотой опухоленосительства. Так, к 12-месячному возрасту у рожавших самок опухоли встречались

Таблица 1. Частота встречаемости различных цитогенетических характеристик у молодых животных линий ICR, BALB/c и C57BL/6

Характеристика	Линия мышей		
	ICR	BALB/c	C57BL/6
Полиплоидия, %	10,7 ± 1,6	2,3 ± 1,0	2,6 ± 1,0
Доля метафаз (%) с			
А-1	29,7 ± 3,5	39,6 ± 7,0	36,0 ± 5,0
А-2	16 ± 2,2***	12,0 ± 5,0	0,9 ± 1,0
ХА	5,7 ± 1,1***	4,1 ± 2,0	0
РБ	6,5 ± 1,8	7,2 ± 2,0	2,9 ± 2,0
АРЦХ	5,0 ± 1,3**	3,7 ± 2,0	0
Частота на 1000			
одноядерных лейкоцитов, ‰			
ЛМЯ	3,8 ± 0,6	4,2 ± 0,8	3,8 ± 1,2
ДЛ	6,7 ± 1,0	5,6 ± 0,8	6,8 ± 1,1
митозов	4,0 ± 1,3	2,6 ± 0,5	5,0 ± 2,3

** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$.

у 77,7%, а у виргинных — у 40,8% животных. Для того чтобы оценить возможные ассоциации между опухоленосительством и выраженностью дестабилизации хромосомного аппарата, выполнен сравнительный цитогенетический анализ у старых самок без опухолей и старых самок опухоленосителей.

По сравнению с молодыми животными (табл. 2) у 11-месячных мышей линии ICR без опухолей в клетках костного мозга увеличивается частота встречаемости всех цитогенетических характеристик (кроме А-1), включая достоверное повышение количества лейкоцитов с микроядрами (ЛМЯ) и апоптозных клеток ($P < 0,01$ для обеих характеристик). У старых мышей-опухоленосителей по сравнению с молодыми и старыми животными без опухолей по разным цитогенетическим характеристикам наблюдаются сложные изменения. Так, клеточная пролиферация и частоты встречаемости ХА и АРЦХ увеличиваются по сравнению с молодыми животными и со старыми животными без опухолей. Такие аномалии как РБ, ЛМЯ, ДЛ и апоптозные клетки встречаются реже по сравнению со старыми животными без опухолей, а анеуплоидные клетки (как А-1, так и А-2) встречаются реже и по сравнению с молодыми животными.

Возрастание пролиферативной активности имеет чрезвычайно важное значение в онкогенезе: непролиферирующие клетки неспособны к неопластической трансформации. Увеличение пролиферативной активности рассматривается как основополагающий критерий опухолевой прогрессии [13]. Это подтверждается и результатами наших исследований, поскольку наиболее высокая частота клеточных делений отмечена у старых животных с опухолями ($7,4 \pm 0,8$).

Таким образом, согласно полученным данным, цитогенетическая нестабильность в клетках костного мозга мышей линий BALB/с и ICR проявляется задолго до реализации неопластических потенциалов животных этих линий. Выделяются две характеристики — анеуплоидия и асинхронное расхождение центромер хромосом (анеугенные аномалии), которые, по-видимому, могут быть ассоциированы с инициацией опухолевого процесса в большей

Таблица 2. Частота встречаемости различных цитогенетических характеристик у мышей линии ICR разного возраста ($n = 5$)

Характеристика	Возраст мышей		
	2–3 мес.	11 мес.	16 мес. (с опухолями)
Количество метафаз	414	460	176
Метафаз $2n = 40$, %	$58,5 \pm 1,7$	$60,2 \pm 2,0$	$62,4 \pm 2,5$
Полипloidия, %	$10,7 \pm 1,6$	$16 \pm 0,8^*$	$15,2 \pm 1,7^*$
Доля метафаз (%)с			
А-1	$29,7 \pm 3,5$	$23,2 \pm 2,1$	$21,8 \pm 1,7$
А-2	$16 \pm 2,2$	$17,5 \pm 2,0$	$14,7 \pm 0,9$
ХА	$5,7 \pm 1,1$	$6,6 \pm 1,8$	$8,6 \pm 2,4$
РБ	$6,5 \pm 1,8$	$9,8 \pm 1,7$	$7,8 \pm 1,7$
АРЦХ	$5,0 \pm 1,3$	$5,6 \pm 1,3$	$5,9 \pm 1,0$
Частота на 1000			
однойдерных лейкоцитов, ‰			
ЛМЯ	$3,8 \pm 0,6$	$6,8 \pm 0,7^{**}$	$5,3 \pm 0,6$
ДЛ	$6,7 \pm 1,0$	$9,9 \pm 1,1$	$7,3 \pm 0,9$
апоптозов	$0,7 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,4^{**}$	$1,7 \pm 0,1^{***}$
митозов	$4,0 \pm 1,3$	$6,8 \pm 0,5$	$7,4 \pm 0,8$

* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$.

степени, чем различные типы хромосомных aberrаций. Увеличенное количество делящихся клеток в костном мозге оказывается характерным для опухоленосителей. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что уменьшение стабильности аппарата клеточного деления, которое проявляется в увеличении доли анеуплоидных клеток и нарушении синхронности разделения хроматид, типично уже для инициации опухолевого процесса, а увеличение доли делящихся клеток ассоциировано с опухоленосительством.

1. *Marshall W. F., Fung J. C., Sedat J. W.* Deconstructing the nucleus: global architecture from local interactions // *Curr. Opin. Gen. & Devel.* – 1997. – **7**. – P. 259–263.
2. *Cahill D. P., Kinzler K. W., Vogelstein B., Lengauer C.* Genetic instability and darwinian selection in tumors // *Trends in Biology Science, Millenium Issue.* – 2000. – P. M57-M60.
3. *Berenblum I.* The mechanism of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena // *Cancer Res.* – 1941. – **1**. – P. 807–814.
4. *Foulds L.* Multiple etiologic factors in neoplastic development // *Ibid.* – 1965. – **25**. – P. 1339–1347.
5. *Mondal S., Brancow D. W., Heidelberger C.* Two-stage chemical oncogenesis in cultures of $10T^{1/2}$ cells // *Ibid.* – 1976. – **36**. – P. 2254–2260.
6. *Ogawa K., Solt D. B., Farber E.* Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis // *Ibid.* – 1980. – **40**. – P. 725–733.
7. *Ковалева О. А., Якименко Л. П., Вагина И. Н., Глазко Т. Т.* Цитогенетическая характеристика лабораторных линий мышей BALB/c и C57Bl/6 из разных источников разведения // *Агроекол. журн.* – 2005. – № 1. – С. 68–72.
8. *Okayasu R. et al.* A Deficiency in DNA Repair and DNA-PKcs Expression in the Radiosensitive BALB/c Mouse // *Cancer Res.* – 2000. – **60**. – P. 4342–4345.
9. *Sato S., Takizawa H., Inui N.* Mouse strain differences in induction of micronuclei by base analogues and nucleosides // *Mutat. Res.* – 1993. – **301**. – P. 45–49.
10. *Акопян Г. Р.* Центромерна нестабільність та поліморфізм хромосом в нормі і при патології людини: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Інститут гігієни та медичної екології ім. О. М. Марзеева АМН України. – Київ, 2006. – 39 с.
11. *Акопян Г. Р.* Аномальне розходження хромосом при гемобластозах у дітей // *Матеріали III наук.-практ. конф. “Проблеми онкогенетики: наукові та прикладні аспекти”.* – 2002. – № 4. – С. 4.
12. *Сіренко А. Г., Акопян Г. Р.* Передчасне розділення центромер як цитогенетичний маркер гострої лейкемії у дітей // *Проблеми екології та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. наук. праць.* – Київ; Луганськ, 1999. – Вип. 4(24). – С. 122–133.
13. *Шевченко И. Н.* Модели для изучения ранних показателей предопухолевого состояния организма // *Матеріали III наук.-практ. конф. “Проблеми онкогенетики: наукові та прикладні аспекти”.* – 2002. – № 4. – С. 50–51.

*Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 13.07.2006