

Ե. Ս. ՖԻՇԻԴՅԱՆ

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРЫСИНОГО ЛЕЙКОЗА В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ ЕГО К РОСТУ У ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ

Среди цитогенетических исследований в онкологии, получивших за последние годы большое развитие [2, 20], изучение хромосом лейкозов оказалось особенно интересным. Единственным новообразованием, при котором обнаружено специфическое изменение кариотипа, является хронический миелоидный лейкоз человека (10, 23). У людей, страдающих этим заболеванием, в лейкозных клетках крови и костного мозга была обнаружена необычная маленькая хромосома, названная филадельфийской. Эта хромосома возникла путем утраты (делеции) части длинного плеча одной из хромосом 21 или 22 пары кариотипа человека (5, 24). Для других лейкозов человека специфических хромосомных нарушений пока не установлено, хотя многие из них характеризуются изменением числа, а иногда и структуры отдельных хромосом, т. е. являются, в противоположность эуплоидным нормальным соматическим тканям, анеуплоидными.

Для животных больше всего данных имеется о хромосомах при лейкозах мышей. Оказалось, что эти лейкозы в цитогенетическом отношении разделяются на две группы. Лейкозы вирусного происхождения чаще всего имеют диплоидный кариотип, состоящий из 40 телоцентрических (палочковидных) хромосом [6, 9, 28]. Лейкозы индуцированные химическими канцерогенными веществами [15, 22, 26] и лучистой энергией (13), как правило, имеют измененный кариотип. Большинство клеток таких лейкозов, составляющих в популяции клеток модальный класс, содержат супердиплоидное число хромосом (41—44), а иногда и структурно измененные хромосомы—т. н. маркеры. Наличие маркеров позволяет легко отличать кариотип таких клеток от нормальных и от клеток других лейкозов. Таким образом, супердиплоидное модальное число, малая вариация числа хромосом вокруг этой моды и индивидуальность цитогенетической характеристики присущи большинству индуцированных лейкозов мышей.

Что касается лейкозов крыс, то к началу нашей работы в литературе не имелось о них подробных цитогенетических данных. Между тем, кариотип крысы, являющийся более дифференцированным, чем кариотип мыши [27], состоящий из трех морфологически различающихся групп хромосом, является более удобным для обнаружения небольших отличий в числе или структуре хромосом. Цитогенетическое изучение лейкозов

еще одного вида животного ввиду важности фактов, обнаруженных при изучении хромосом в лейкозах мыши и человека, представляло несомненный интерес.

В наших предыдущих работах [7, 8] были изучены хромосомы в нескольких штаммах перевиваемых лейкозов крыс, а также в новых первичных лейкозах, индуцированных как химическим канцерогенным веществом (ДМБА), так и вирусом (вирус Мазуренко [1]). В этих работах было показано, что лейкозы крыс сходны в цитогенетическом отношении с лейкозами мышей: среди вирусных лейкозов преобладают диплоидные, а индуцированные химическим канцерогеном лейкозы характеризуются супердиплоидными числами хромосом и наличием в некоторых случаях маркерных хромосом. Эти лейкозы также показывают индивидуальные цитогенетические отличия от нормы и друг от друга.

Настоящее сообщение посвящено результатам опытов по адаптации некоторых штаммов перевиваемых лейкозов к росту на взрослых крысах и сравнению цитогенетических характеристик исходных лейкозов и их некоторых штаммов перевиваемых лейкозов к росту на взрослых крысах представляет как теоретический, так и практический интерес. В теоретическом отношении важно было узнать сопровождается ли изменение физиологических свойств лейкоза также и генетическим изменением клеток, в частности, изменением их хромосомных наборов. Известно, что т. н. прогрессия опухолей, т. е. изменение различных морфологических и физиологических характеристик, идущее в направлении от большей к меньшей зависимости опухоли от регулирующих влияний организма [12], нередко связана с изменением цитогенетической характеристики опухоли [14]. Однако вопрос о генетических основах явления прогрессии опухолей экспериментально изучался ещё сравнительно мало и накопление новых фактов по этому вопросу представляется желательным. В практическом отношении штамм лейкоза, растущий на взрослых крысах, интересен тем, что он может быть повседневно использован в экспериментально-онкологических исследованиях, тогда как возможность работы со штаммом, растущим лишь на крысятах-сосунках, обычно весьма ограничена.

Материал и методика. Опыты проводились с перевиваемыми лейкозами крыс—штаммы Л-37 и ИЛК [4], обычно растущими на одно-двухнедельных крысятах. Перевивки производились внутрибрюшинно на 6—9-й день смесью ткани печени, селезёнки, а иногда лимфоузлов. Морфологически это мало дифференцированные лейкозы, прошедшие свыше 40—50 поколений перевивок. При прививке крысятам прививаемость составляет 100%, продолжительность жизни животных 18 дней. Лейкозные клетки инфильтрируют печень, селезёнку, тимус и иногда паратрахеальные лимфоузлы. При прививке большим крысам (60—80) процент прививаемости может в отдельных опытах колебаться от 0 до 80, однако поддерживать штамм на взрослых крысах не удается, так как прививаемость и вирулентность штамма при пассировании на взрослых крысах быстро снижаются и че-

рез несколько генераций лейкоз перестает расти. Цитогенетически Л-37 характеризуется 44, а ИЛК—45 хромосомами [7].

Цитогенетическая методика, подробное описание которой дано в других сообщениях [3, 7], состояла в изготовлении из ткани печени и селезенки пораженных лейкозом, давленных ацетокарминовых препаратов. Препараты изучали и фотографировали на микроскопе МБИ-6 с фазовоконтрастным устройством.

Для преодоления резистентности взрослых животных к лейкозам, успешно растущим лишь у маленьких крысят, мы пытались применить некоторые воздействия, обычно используемые для облегчения прививки специфических опухолей генетически отличающимся реципиентам. Сюда относится предварительное воздействие на реципиентов лиофилизированной нормальной тканью доноров [17, 18], а также некоторые неблагоприятные воздействия на прививаемую клеточную взвесь, применявшиеся с целью подавления роста диплоидных клеток и создания селективных преимуществ полиплоидным клеткам [19]. Для опытов первого рода готовили по методике Калисса [17] лиофилизированную ткань нормальной печени и вводили её внутривентриально в дозе по 5—10 мг по два раза в неделю, на протяжении двух недель. Воздействие лиофилизированной тканью заканчивалось за неделю до прививки лейкоза.

Опыты второго рода состояли в воздействии на клеточную взвесь пониженной (4°C в течение 6 дней) и повышенной (45—48°C в течение 20 мин.) температурой, а также в прививках сильно разведенной взвесью (разведения от 1 : 160 до 1 : 660 вместо обычного 1 : 20). Эти разведения соответствуют приблизительно от 120 до 30 тыс. клеток.

Результаты и обсуждение. Полученные данные показывают, что ни воздействие на реципиентов лиофилизированной тканью (табл. 1), ни воздействие на перевиваемые клетки пониженной и повышенной температу-

Таблица 1

Результаты прививки лейкоза Л-37 взрослым крысам после обработки их лиофилизированной тканью нормальной печени крыс

Возраст животного в днях	Доза введенной лиофилизированной ткани в мг		Прививаемость I генерации после обраб.	Прививаемость II генерац. без обраб.
	однократная	всего на прот. опыта		
25	5	20	3/4	0/10
40	10	40	3/5	0/8
Контроль 40	—	—	0/5	—

рой (табл. 2, 3) не повлияли на особенности онкологической и цитогенетической характеристик лейкозов: они не стали прививаться у взрослых крыс, а хромосомные наборы их клеток не изменились. И если в опытах с лиофилизированной тканью лейкоз привился в I генерации у 6 из 9 крыс (при отсутствии прививаемости в контроле), то в следующей гене-

рации на необработанных животных прививка не удалась ни у одного из 18 животных. Аналогичная картина была в первом опыте с прививкой лейкоза ИЛК прогретой клеточной взвесью. Во второй генерации (уже без воздействия) лейкоз развился у 7 из 10 реципиентов. Однако в третьей генерации лейкоз появился всего у одного из 19 животных.

Таблица 2

Результаты прививки лейкоза Л-37 взрослым крысам после воздействия на клеточную взвесь пониженной температурой

№ опыта	Генерация	Средний вес реципиента	Число клеток	Температ. и прод. возд. в днях	Перевиваемость
1	1	110,0	100.000	4°C 6	0/5
2	1	50,0	100.000	4°C 6	0/5
3	1	60,0	200.000	4°C 4	1/5
3	2	60,0	развед. 1:20	комнат.	0/5
Контроль		50,0	100.000	комнат.	2/5

Таблица 3

Результаты прививки лейкозов взрослым крысам после воздействия на клеточную взвесь повышенной температурой

№ опыта	Генерация	Штаммы	Сред. вес рецип.	Развед. дозы в мл и сп. введ.	Температ. и время возд. дейст.	Перевиваемость
1	1	ИЛК	60,0	1:20 0,3 в/б	45°C 20 мин.	1/5
1	2	ИЛК	60,0 40,0	1:20 0,3 в/б	комнат. темпер.	7/10
1	3	ИЛК	60,0 40,0	1:20 0,3 в/б	комнат. темпер.	1/19
2	1	Л-37	60,0	1:20 0,3 в/б	48°C 20 мин.	1/6
3	1	Л-37	80,0	1:160 0,3 в/б	45°C 20 мин.	0/6
4	1	Л-37	80,0	1:20 0,3 в/б	45°C 20 мин.	1/5
4	2	Л-37	70,0	1:20 0,3 в/б	комнат. темпер.	1/5
Контроль		Л-37	60,0	1:160 0,3 в/б	комнат. темпер.	2/5

Положительный результат—повышение перевиваемости лейкоза у взрослых крыс—получен лишь в опытах с прививкой малых доз клеток лейкоза 37. Второй штамм в этих трудоемких и длительных опытах не участвовал. На схеме 1 представлены суммарные данные опытов по адап-

тации лейкоза 37 к росту на взрослых крысах. Первые 7 генераций прививка производилась клеточной взвесью, приготовленной в разведении 1 : 160 (сублиния 1). Прививаемость лейкоза была довольно высокой и в среднем равнялась 79,4%. С 8 и 9 генераций перевивки стали вести в нескольких параллельных сублиниях (2, 3, 4), отличающихся по степени разведения. В сублинии 2 (разведение 1 : 20, 8—12 генерации) прививаемость снизилась, в среднем она стала равна 62,5% и к 12-й генерации перевивки пришлось прекратить. В сублинии 3 (разведение 1 : 640, 9—12 генерации) прививаемость тоже уменьшилась (48%) и сублиния была прекращена на 12-й генерации. Сублиния 4 велась при разведении 1 : 320. Здесь сначала лейкоз рос хорошо, а затем прививаемость снизилась так, что в среднем для 8—12-й генераций процент ее оказался равным 57,5. В последующих 13—16 генерациях он снизился до 37,7 и поддержание этой сублинии было также прекращено. С 13 генерации из сублинии 4 была начата новая разводка с разведением 1 : 20. Эта разводка (сублиния 5) продолжалась до 16-й генерации, со средним процентом прививаемости лейкоза, равным 60. Затем прививаемость явно повысилась: в 17—18-й генерациях до 80%, в 19—23 генерациях до 92,7% и в 24—30 генерациях она была равна 84,4%. В этой сублинии, следовательно, произошло стойкое повышение прививаемости лейкоза у взрослых крыс, сохранившееся на протяжении многих генераций.

Кроме 5 сублинии лейкоза были получены ещё две. В одной (сублиния 6) с 19-й по 23-й генерации прививаемость была низкой (41,7%), а начиная с 24-й генерации она резко повысилась и стала для 24—30-й генерации, в среднем, равной 85,2%. Лейкоз другой сублинии (7) сначала рос на взрослых крысах плохо. Прививаемость в генерациях 17—24 равнялась 56,8%, а затем в 25-й генерации опять произошло увеличение прививаемости: лейкоз развился у 100% животных. Таким образом, в опытах с прививкой уменьшенных доз клеток нами получено 5 разводки или сублинии, характеризующиеся высоким процентом прививаемости лейкоза 37 у взрослых крыс.

Весьма интересным оказался результат цитогенетического анализа полученной нами сублинии лейкоза 37. Стволовое число исходного штамма этого лейкоза равно 44 хромосомам. К стволочному классу относятся более 80% клеток. Маркерных хромосом в лейкозе 37 нет. Из двух добавочных хромосом одна является метацентрической, а другая — телоцентрической. Таковую характеристику лейкоз 37 сохраняет на протяжении многих генераций. При анализе хромосом в сублиниях, давших хороший рост лейкоза у взрослых крыс, во всех трех было обнаружено одинаковое изменение хромосомного набора клеток. Число хромосом оказалось равным не 44, а 45: добавилась одна метацентрическая хромосома (табл. 4, рис. 1).

Это изменение кариотипа лейкоза 37 оказалось устойчивым и сохранялось на протяжении ряда генераций перевивок. Является ли наблюдавшееся хромосомное изменение независимым для каждой из сублиний или оно возникло один раз в ранних генерациях, ещё до диверген-

ции штамма на 3 разных сублиниях? Поскольку и в ранних генерациях в опытах по прививке сильно разведенной взвесью имелся небольшой процент клеток с 45 хромосомами (табл. 4), скорее всего надо думать не о независимом возникновении, а о селективном размножении этих клеток

Таблица 4

Изменение количественной хромосомной характеристики сублиний лейкоза Л-37 в процессе адаптации штамма к перевивке на взрослых крыс

№ сублинии	Исслед. генерации	Число животных	Число исслед. метафаз	Число хромосом								
				40	41	42	43	44	45	46	47	4n
1	7	2	100	2		4	3	85	1	2		3
4	11	2	100			1	1	93	3	2		
5	15	1	100			1	2	94	3			
5	20	2	100			1	1	6	91			1
5	22	2	100			1	6	3	89		1	
5	30	2	100	1				2	91	1		2
6	24	2	100			3		6	88			3
7	22	2	100			1		96	2		1	
7	25	2	100			1		7	90			2

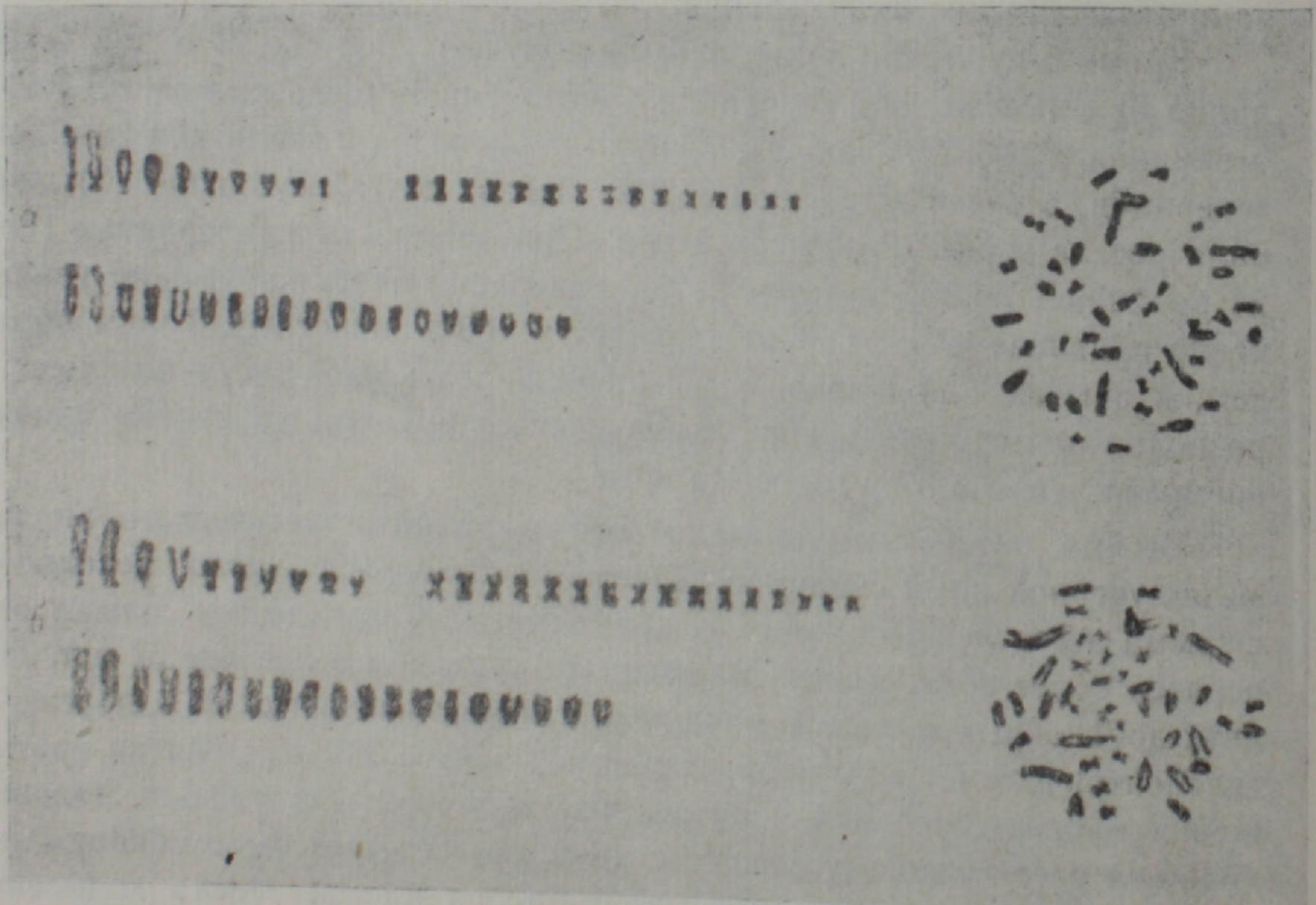


Рис. 1. а—клетка лейкоза 37 с 44 хромосомами (справа) и идиограмма той же клетки (слева); б—клетка лейкоза 37 с 45 хромосомами (справа) и идиограмма той же клетки (слева).

и вытеснении ими клеток с 44 хромосомами. Селективным моментом, благоприятствующим преимущественному размножению клеток, составивших сначала очень небольшую долю в популяции, могло служить при-

менение сильно разведенной клеточной взвеси. Данные, показывающие, что разведение клеточной взвеси может иметь такое значение, имеются в литературе [16, 19].

Интересно, что отбор клеток с 45 хромосомами шел, по-видимому, не медленно и постепенно, а довольно быстро. Так, на протяжении 1—15 генераций процент таких клеток оставался низким (1—3%). При следующем анализе через 5 пассажей, т. е. в 20-й генерации (сублинии 5), он с 3 поднялся до 91 процента и в последующем оставался примерно на том же уровне. В сублинии 7 процент клеток с 45 хромосомами оставался низким до 22-й генерации. Но уже через 3 пассажа, в 25-й генерации большинство изученных клеток (90 из 100) оказалось с 45 хромосомами.

Случайно ли совпадение между изменением стволовой линии (сдвиг модального числа с 44 на 45 хромосом) и изменением свойств штамма (способность успешно расти у взрослых крыс)? С полной определенностью ответить на этот вопрос трудно, однако, поскольку аналогичные изменения кариотипа и прививаемости наблюдались в трех сублиниях штамма, мысль о неслучайном совпадении представляется оправданной. Можно предположить, что нарушение генного баланса, вызванное появлением дополнительной хромосомы, привело к дальнейшей прогрессии лейкозных клеток, обеспечившей им возможность преодоления возрастной резистентности крыс. Вообще случаи корреляции между физиологическими свойствами клеток и особенностями их кариотипа, в частности изменениями числа и структуры отдельных хромосом, хорошо известны из литературы. Они описаны как для перевиваемых опухолей животных, так и для клеточных линий, культивируемых *in vitro* [11, 21, 25]. Однако подобная корреляция обнаруживается далеко не во всех случаях и закономерности её возникновения изучены ещё не достаточно.

Лаборатория цитогенетики
Института экспериментальной и клини-
ческой онкологии АМН СССР

Поступило 22.XII 1963 г.

Բ. Ս. ՅԻԶԻԶՅԱՆ

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼԵՅԿՈԶԻ ՅԻՏՈԳԵՆԵՏԻԿ ԱՆԱԼԻԶԸ, ԱՃՄԱՆ ԵՎ ԱՏՄԱՄԲ
ՆՐԱ ԱԳԱՊՏԱՑԻԱՅԻ ՊՐՈՑԵՍՈՒՄ, ՄԵՄԱՀԱՍԱԿ ԿԵՆԴՐԱՆԻՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Տվյալ աշխատանքում նկարագրված են այն փորձերի արդյունքները, որոնք նվիրված են նորածին առնետների մոտ զարգացող լեյկոզը ադապտացիայի ենթարկելուն՝ մեծահասակ (60—80 օր. քաշ ունեցող) առնետների մոտ, որոնք սովորաբար ցուցաբերում են որոշակի դիմադրողականություն պատվաստման հանդեպ: Բերվում են նաև լեյկոզի ստացված նոր վարիանտների խրոմոսոմային անալիզի տվյալները: Մեր փորձերը բարձր և ցածր ջերմաստիճանների, ինչպես նաև նորմալ լյարդի լիսֆիրիզացված հյուսվածքի միջո-

ցով ազդել լեյկոզային բջիջների վրա, դրական արդյունք շտվեցին: 37 լեյկոզը մեծահասակ առնետների մոտ աճելու հատկություն ձեռք բերեց, երբ լեյկոզը պատվաստվում էր մի շարք գեներացիաների ընթացքում, փոքր դոզաներով (30—60 հազար բջիջ): Մեր կողմից ստացված լեյկոզի 3 ենթատեսակները բնութագրվում են պատվաստման կայուն բարձր տոկոսով (80—85 %):

Ցիտոգենետիկ ուսումնասիրությունների վերլուծությունը ցույց տվեց Կարիոտիպի փոփոխության միատեսակությունը բոլոր 3 ենթատեսակներում: Այսպիսով խրոմոսոմների թիվը 44-ից դառնում է 45, մեկ մետացենտրիկ խրոմոսոմի ավելացմամբ:

Կարիոտիպի բջիջների նմանօրինակ փոփոխությունը տարբեր ենթատեսակներում, որը առաջանում է նորածին առնետների լեյկոզը մեծահասակների մոտ պատվաստման ընթացքում, վկայում է նրա ոչ պատահական բնույթ ունենալու մասին, ինչպես նաև բջիջների ֆիզիոլոգիական վիճակի և գենոտիպի կապի մասին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мазуренко Н. П. Сб.: Сокращенные доклады конфер. по вопр. эксперим. и клинич. онкологии, Киев, 1957, 8.
2. Погосянц Е. Е. Журнал Всесоюзн. хим. общ. им. Менделеева, 1963, 8, 4, 449—458.
3. Погосянц Е. Е., Пригожина Е. Л., Еголина Н. А. Вопросы онкологии, 1962, 8, 11, 29—36.
4. Пригожина Е. Л. Вопросы онкологии, 1962, 8, 1, 64—71.
5. Прокофьева-Бельговская А. А. Цитология, 1963, 5 : 5—23.
6. Ставровская А. А. БЭБ и М., в печати.
7. Фичиджян Б. С., Погосянц Е. Е. Вопросы онкологии, в печати.
8. Фичиджян Б. С., Погосянц Е. Е., Пригожина Е. Л. Вопросы онкологии, в печати.
9. Bayreuther K. Nature, 186: 6—9, 1960.
10. Baikie A. G. et al. Nature, 188: 1165—1166, 1960.
11. Biesele et al Genetics and Cancer Univ. Texas, Austin 295—307, 1959.
12. Foulds L. Acta UICC 17: 148—156, 1961.
13. Ford C. E. and Mole R. H. Progr. in Nuclear Energy Ser. 6, 2: 11, 1959.
14. Hauschka T. S. Cancer Res., 21: 957, 1961.
15. Hellstrom K. E. J. N. C. I. 23: 1019—1034, 1959.
16. Humphreys S. R. and al. J. N. C. I. 28: 1053—1063, 1962.
17. Kaliss N. Cancer Res., 12: 379—382, 1952.
18. Kaliss N. and Snell G. D. Cancer Res., 11: 122—126, 1951.
19. Kaziwara K. Cancer Res., 14: 795—801, 1954.
20. Koller P. C. Cell Physiology of Neoplasia, Univ. Texas Publ. Austin. 9, 1960.
21. Konigsberg U. R., Nitowsky H. M. J. N. C. I. 29: 699—709, 1962.
22. Kurita Y., Yosida T. H. Gann., 52: 257—264, 1961.
23. Nowell P. C., Hungerford D. A. J. N. C. I. 25: 85—109, 1960.
24. A proposed standart system of nomenclature Lancet 1733, 1960. of human mitotic chromosomes.
25. Rhynas P. O. W. and Newcombe H. B. Exp. Cell Res., 21: 326—331, 1960.
26. Stich H. F. J. N. C. I., 25: 649—661, 1960.
27. Tjio G. H., Levan A. Hereditas 42: 1, 1956.
28. Wakonig-Vaartaja R. Br. J. Cancer, 15: 120, 1961.