

Ю. Б. ВАХТИН, Т. В. БОРХСЕНИУС

**ЧАСТОТА ГЕНОМНЫХ МУТАЦИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
ПРИ КЛОНИРОВАНИИ IN VIVO**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 10 VIII 1971)

Клетки с измененным кариотипом не всегда сохраняют способность к делению, а сохранившие способность к делению обладают разными скоростями пролиферации; поэтому изучение изменчивости хромосомных чисел в метафазах не позволяет сколько-нибудь точно определить частоту геномных мутаций в соматических, в том числе опухолевых клетках. Ранее (¹⁻³) нами был описан метод определения частоты геномных мутаций по изменению содержания ДНК в интерфазных ядрах клеток клонов и определены частоты геномных мутаций в клетках HeLa in vitro. Недавно было показано, что опухолевые узлы, формирующиеся в легких после внутривенного введения суспензий одичичных опухолевых клеток, представляют собой клоны, т. е. потомства отдельных клеток (⁴). Это дает возможность применить указанный метод для определения частоты геномных мутаций у опухолевых клеток in vivo. Настоящее сообщение посвящено изменчивости клеток перевивной опухоли скелетных мышц (рабдомиосаркомы) мышей линии СС57W.

Первичную опухоль индуцировали 20-метилхолантеном (⁵). Число хромосом в клетках опухоли XIX генерации колебалось от 38 до 104, преобладали клетки с 41—51 хромосомами, модальный класс не выражен. Клонировали полиморфноклеточную рабдомиосаркому XX и XXI генера-

Таблица 1

Частота геномных мутаций в клоновых популяциях рабдомиосаркомы мыши in vivo ($\times 10^{-2}$ на клетку на 1 поколение)

| № опыта | Число индуцированных клонов | Число внутрививных клонов | Частота мутаций по повторностям | | | | | | Средняя частота мутаций |
|---------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------------------|
| | | | I | II | III | IV | V | VI | |
| 386 | 13 | 300 | 25,6 ± 6,1 | 20,1 ± 5,6 | 37,3 ± 6,6 | 21,3 ± 5,3 | 18,7 ± 5,2 | 18,3 ± 8,1 | 23,1 ± 2,4 |
| 387 | 9 | 217 | 12,6 ± 5,6 | 3,5 ± 3,0 | 6,4 ± 3,7 | 11,0 ± 4,9 | 11,7 ± 5,1 | 15,4 ± 10,1 | 7,6 ± 1,8 |
| 392 | 15 | 365 | 8,5 ± 3,4 | 15,0 ± 4,4 | 14,2 ± 4,2 | 11,0 ± 3,8 | 14,4 ± 4,3 | 9,5 ± 6,4 | 12,0 ± 1,7 |
| 398 | 33 | 813 | 8,9 ± 2,3 | 9,3 ± 2,4 | 4,8 ± 1,8 | 6,4 ± 2,0 | 7,6 ± 2,1 | 10,6 ± 4,0 | 7,2 ± 0,9 |
| Всего | 70 | 1705 | 11,5 ± 1,8 | 11,3 ± 1,8 | 10,8 ± 1,7 | 10,3 ± 1,7 | 11,3 ± 1,8 | 12,2 ± 3,0 | 10,9 ± 0,8 |

ций, внутривенно мышам той же линии вводили по 150—300 тыс. клеток (⁶). Легкие с опухолевыми узлами (клонами) извлекали на 20—22 сутки, готовили гистологические препараты клонов и постоянные давленные препараты, окрашенные по Фельгену для фотометрии. Относительное содержание ДНК в интерфазных ядрах определяли на цитоспектрофотометре, смонтированном в Институте цитологии АН СССР (⁷), по двухволновой

методике (560 и 515 мμ); ошибка единичного измерения 5%. Расчеты проводились по методу (8).

Содержание ДНК на гаплоидный набор определяли путем фотометрирования ядер сперматид мышей линии СС57W. Для фотометрирования препараты клонов, сперматид и клонируемых опухолей готовили одновременно; от каждого клона брали по 5 клеток (I—V повторности) и 2 клетки (VI повторность). Всего исследовали 70 клонов от четырех опухолей.

Мутантными считали клоны, у которых $0,95C_{\max} / 1,05C_{\min} > 2$, где C_{\max} и C_{\min} — крайние показатели содержания ДНК в исследованных интерфазных ядрах клеток клона, остальные клоны считали немутантными (9). Частоты геномных мутаций определяли по формуле

$$p = -\ln \frac{N_0 - N_M}{N_0} \cdot \frac{N_0}{n - N_0},$$

где N_0 — общее число исследованных клонов, N_M — число мутантных клонов, n — число исследованных ядер.

Частоты геномных мутаций в клоновых популяциях трех опухолей были примерно одинаковыми и в 2—3 раза более низкими, чем в клонах опухоли 386 (табл. 1). Последняя опухоль отличалась более высокой пролиферативностью клеток, что, возможно, и обусловило их большую мутабельность (9). Резкие колебания частот изменчивости по отдельным повторностям каждого опыта скорее всего обусловлены малым числом исследованных клонов, а не малым числом исследованных клеток в каждой повторности, так как во всей совокупности из 70 клонов в повторностях были получены примерно одинаковые частоты геномных мутаций ($10,3 - 12,2 \cdot 10^{-2}$), не отличающиеся достоверно от средней их частоты, вычисленной для всех опытов и повторностей ($10,9 \cdot 10^{-2}$). Судя по содержанию ДНК в клетках клонов и клетках исходных опухолей (рис. 1), клонирование в наших опытах не сопровождалось отбором определенных кариотипических вариантов, как это нередко наблюдается при образовании спонтанных и экспериментальных метастазов (10-12).

По данным опытов с клонами HeLa *in vitro*, частоты геномных мутаций при резком снижении эффективности клонирования повышаются в 2—3 раза и понижаются при увеличении средней скорости деления клеток (9). Клонирование *in vivo* характеризуется очень низкой эффективностью, так как более 99% клеток, попавших в легкие, гибнет уже через сутки (4), однако многие выжившие клетки формулируют быстро растущие клоны. Быстрым ростом отличались и исследованные нами клоны: на 20—22 день после клонирования они содержали по 0,8—300 млн. клеток, т. е. их клетки делились каждые 16—30 час. (13). Можно полагать поэтому, что полученные частоты геномных мутаций отражают примерно среднюю мутабельность клеток исследованных опухолей.

Использованная методика клонирования широко применяется для моделирования процессов метастазирования опухолей. Высокая частота возникновения клеток с измененным числом хромосом должна способствовать превращению потомств отдельных опухолевых клеток в кариотипически гетерогенные клеточные популяции (2). Судя по полученным нами

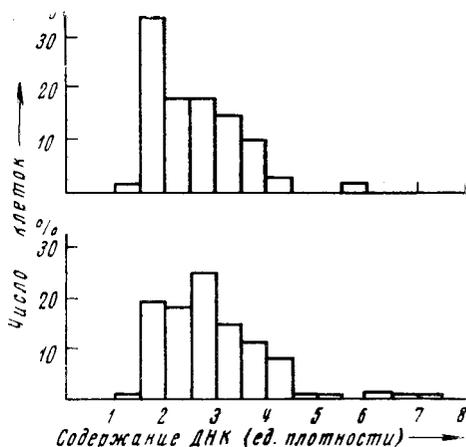


Рис. 1. Распределение клеток опухоли и ее клоновой популяции (опыт 387) по содержанию ДНК

данным (рис. 1), при метастазировании превращение кариотипически однородных популяций опухолевых клеток в кариотипически гетерогенные наступает очень быстро, и это обстоятельство следует учитывать при химиотерапии опухолей.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
12 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. Б. Вахтин, Т. Н. Игнатова и др., Цитология, **7**, 2, 258 (1965). ² Ю. Б. Вахтин, Т. Н. Игнатова и др., Цитология, **7**, 3, 393 (1965). ³ Ю. Б. Вахтин, Т. В. Борхсениус, Цитология, **9**, 8, 991 (1967). ⁴ I. J. Filder, J. Nat. Cancer Inst., **45**, 4, 773 (1970). ⁵ Л. Г. Ивашкевич, И. Н. Швембергер, Ю. Б. Вахтин, Цитология, **8**, 5, 658 (1971). ⁶ Л. Г. Ивашкевич, Ю. Б. Вахтин, Вопр. онкол., **16**, 3, 78 (1970). ⁷ Ю. М. Розанов, Г. В. Селиванова, Цитология, **10**, 4, 521 (1968). ⁸ Л. С. Агроскин, В. Я. Бродский и др., Цитология, **2**, 3, 337 (1960). ⁹ Ю. Б. Вахтин, Т. В. Борхсениус, Цитология, **13**, 8, 920 (1971). ¹⁰ T. H. Yosida, Jap. J. Genet., **38**, 342 (1964). ¹¹ G. Rabotti, Nature, **183**, 4670, 1276 (1959). ¹² E. Chu, R. Malmgren, J. Nat. Cancer Inst., **27**, 4, 217 (1961). ¹³ Н. М. Эмануэль, Л. С. Евсеевко, Д. Б. Корман, Сборн. Актуальные вопросы современной онкологии, в. 2, 1970, стр. 245.