

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ АКАДЕМИИ НАУК СССР

На правах рукописи

**ВАХТИН**  
Юрий Борисович

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ОТБОР  
В ПОПУЛЯЦИЯХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

Цитология 03.00.17

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Ленинград  
1972



Работа выполнена в Институте цитологии АН СССР.

Официальные оппоненты:

Член-корр. АМН СССР

доктор медицинских наук

Е.Ф. ДАВИДЕНКОВА

Доктор медицинских наук

А.Г. БОБКОВ

Доктор биологических наук проф. В.П. МИХАЙЛОВ

Ведущее научное учреждение -

НИИ онкологии имени проф. Н.Н. Петрова МЗ СССР

Автореферат разослан " 17 " ноября 1972 г.

Защита диссертации состоится " 22 " декабря 1972 г.

в 15 часов на заседании Ученого совета Института цитологии АН СССР

Адрес : 190121 Ленинград, пр. Маклина 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии АН СССР.

Ученый секретарь

ВАХТИН  
ЮРИЙ БОРИСОВИЧ

ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ОТБОР  
В ПОПУЛЯЦИЯХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

03.00.17 - Цитология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук.

Ленинград

1972

Работа выполнена в Институте цитологии АН СССР.

Официальные оппоненты:

Член-корр. АМН СССР

доктор медицинских наук Е.Ф. ДАВИДЕНКОВА

Доктор медицинских наук А.Г. БОБКОВ

Доктор биологических наук проф. В.П. МИХАЙЛОВ

Ведущее научное учреждение -

НИИ онкологии имени проф. Н.Н. Петрова МЗ СССР

Автореферат разослан " 17 " ноября 1972 г.

Защита диссертации состоится " 22 " декабря 1972 г.

в 15 часов на заседании Ученого совета Института цитологии АН СССР

Адрес : 190121 Ленинград, пр. Маклина 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии АН СССР

Ученый секретарь

## В в е д е н и е

За последние 10-15 лет достигнут существенный прогресс в изучении явлений наследственности и изменчивости у соматических клеток. Разработаны методы клонального анализа соматических клеток (Puck, 1956) и доказано наследование тканеспецифических особенностей на клеточном уровне (Konigsberg, 1963), ставившееся ранее под сомнение (Grobstein, 1959). Доказаны генетическое тождество ядер специализированных клеток ядру зиготы (Gurdon, 1962) и важная роль эпигенетических изменений в процессах детерминации и дивергентной дифференцировки (Nanney, 1958; Ehrhussi, 1958; Оленов, 1962). Изучены важнейшие типы мутаций (Н.И. Шапиро, Е.Е. Погосянц) и эпигенетических изменений (А.А. Прокофьева-Бельговская, М. Lyon, Ю.М. Оленов, А.Ф. Сахаров), проанализированы вопросы эволюции клеточных популяций (S. Makino, A. Levan, C. Ford, Ю.М. Оленов, А.Ф. Сахаров), открыто и интенсивно исследуется явление гибридизации соматических клеток. Исторически многие разделы генетики соматических клеток являются продолжением начатых в нашей стране школой Н.Г. Хлопина работ по изучению генетической системы тканей на основе тщательного анализа морфогенетических потенций в нормальных и патологических условиях (В.П. Михайлов, 1967). В результате развито представление о ткани как о клеточной популяции или системе клеточных популяций.

Важнейшим направлением в изучении клеточных популяций является исследование популяций опухолевых клеток, имеющее огромное теоретическое и прикладное значение. Та или иная степень автономности от регулирующих воздействий организма, способность неограниченно долго размножаться в условиях *in vivo* и адаптироваться к широкому спектру изменений среды позволяют ставить на опухолевых клетках эксперименты, во многих случаях невозможные при использовании нормальных, немалигнизировавшихся клеток. Не случайно, именно на опухолевых или трансформированных клетках сделаны многие важные открытия в области клеточной биологии.

Экспериментальные исследования, представленные в диссертации, проводились начиная с 1960 г., т.е. в период, когда не были известны многие в настоящее время выясненные особенности изменчивости и наследственности опухолевых клеток. Уже в начале 60-х годов стало заметно, что внимание исследователей обращено главным образом на качественные особенности изменчивости и отбора в популяциях опухолевых клеток, в то время как количественное соотношение между этими процессами, важное для понимания закономерностей изменения наследственной структуры популяций, их адаптации и эволюции, в силу методических трудностей остается неясным. Исходя из этого нашей целью являлось количественное исследование обеих форм изменчивости (генотипической и эпигенетической), наследственной структуры и отбора в популяциях опухолевых клеток. Естественно, что в ходе работы нам пришлось решать более частные задачи, связанные с разработкой методов определения частот генотипической и эпигенетической изменчивости, количественной характеристики интенсивности отбора, изучением наследования на клеточном уровне и взаимодействия мутаций и эпигенетических изменений.

Наряду с изложением собственного экспериментального материала в соответствующих разделах сделана попытка суммировать и обобщить литературные данные по изменчивости и отбору в клеточных популяциях и по другим, затрагиваемым в диссертации вопросам.

## Глава I

### Материал, методы и обработка результатов

Основным материалом в опытах *in vitro* служили клетки линии HeLa (аденокарцинома шейки матки человека), миобласты скелетных мышц новорожденных крысят и клетки перевивных рабдомиосарком крысы, полученных нами от малигнизовавшихся в однослойных культурах миобластов. В опытах *in vivo* использовали первичные и перевивные рабдомиосаркомы крыс породы

Вистар, белых беспородных крыс и мышей низкоракковой линии СС57 W. Клетки HeLa взяты как объект, хорошо исследованный цитологически, адаптированный к росту на искусственных питательных средах, позволяющий проводить клональный анализ и, что было существенным для нас, дающий компактные клоны. Миобласты скелетных мышц и клетки опухолей скелетных мышц обладают способностью проявлять четкие признаки тканевой специфичности, обусловленной эпигенетически, и было известно, что формируемые ими популяции отличаются во многих случаях резко выраженным полиморфизмом (А.И.Абрикосов, И.Г.Хлопин, А.И.Раков, А.Д.Тимофеевский). Это делало их перспективными для изучения вопросов эпигенетической изменчивости, наследования эпигенетически обусловленных признаков на клеточном уровне, эпигенетической гетерогенности популяций опухолевых клеток и влияния генотипической изменчивости на эпигенетически обусловленные признаки.

Однослойные культуры поддерживали по общепринятой методике. Клонировали без кормилок при 5% CO<sub>2</sub>. Изменение условий в неблагоприятную сторону достигали повышением концентрации NaCl в питательной среде в 2 и 3 раза.

Рабдомиосаркомы получены от малигнизированных в однослойных культурах миобластов крысы (14 перевивных линий) и индуцированы у крыс и мышей внутримышечным введением 20-метилхолантрена, CoO и Ni<sub>2</sub>S<sub>3</sub>.

В опытах *in vivo* опухоли пассировали по обычной методике. Для клонального анализа рабдомиосарком, реклонирования и получения перевивных клональных линий мы применили внутривенное введение суспензий из одиночных опухолевых клеток в дозах до 5 млн. клеток на крысу или мышь. Так как клональное происхождение опухолевых узлов, формирующихся в легких после такого внутривенного введения клеток, вызывало сомнение, был проведен специальный анализ процесса клонообразования с помощью эпигенетических маркеров (см. главу III).

Для гистологического изучения опухолей и клонов *in vivo*, материал фиксировали 10%-м формалином, а также по Карнуа,

Буэну или Ценкеру; заливали в парафин; срезы толщиной 6 мк красили гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону, по Маллори, железным гематоксилином по Гейденгайну, муцикармином Шейера, азокармином по Гейденгайну; в ряде случаев проводили импрегнацию аргирофильных волокон по Футу. Культуры на покровных стеклах окрашивали гематоксилином Шейгера, гематоксилин-эозином; часть из них докрашивали пикрофуксином по Ван-Гизону и импрегнировали серебром по Футу.

Число хромосом подсчитывали на метафазных пластинках; применяли колхицин и гипотонический раствор. Анализ структуры карิโอטיפа не проводили.

Облучение клеток проводили при помощи аппарата РУМ-11. Миозин выделяли биохимически; субъединицы миозина идентифицировали с помощью электрофореза в крахмальном геле (Матвеев и др., 1972). В опытах по изучению антигенных особенностей рабдомиосарком иммунологическая часть работы выполнена В.Я.Фелем, В.И.Ивановым и Т.Н.Цикаришвили (см. Фель и др., 1966). В опытах с РНК, выделенными из нормальной мышечной ткани, биохимическая часть работы выполнена Н.Н.Аксеновой, В.И.Воробьевым и Л.А.Слепцовой (см. Аксенова и др., 1964, 1965).

Для изучения соотношений между частотой карiotипических изменений, карiotипической гетерогенностью и интенсивностью отбора применено сочетание клонирования и фотометрического определения содержания ДНК в интерфазных ядрах клеток клонов и исходных популяций. Фотометрию проводили в видимом свете по двухволновому методу на установке, смонтированной Г.В.Селивановой и Ю.М.Розановым (1968). Для перехода от относительных единиц к единицам пloidности использовали контрольные препараты клеток лимфатического узла легкой крысы, лейкоциты периферической крови человека и ядра сперматид мышей СС57 w.

Карiotипическую гетерогенность оценивали по дисперсии клонов и клеток по содержанию ДНК, коэффициенту вариации по этому показателю и размаху изменчивости клеток и клонов по содержанию ДНК.



Расчет частоты геномных мутаций по данным фотометрии был основан на том соображении, что в потомстве клетки с любым числом хромосом (диплоидным, анауплоидным или полиплоидным), если не происходят хромосомные или геномные мутации, содержание ДНК может изменяться лишь в 2 раза (за счет редупликации хромосом). Отношение  $C_{\max} : C_{\min} > 2$  может наблюдаться только в клонах, в которых в ходе клеточного размножения произошли кратные или некратные изменения в числе хромосом, т.е. геномные мутации. Так как точность единичного измерения составляла  $\pm 5\%$ , немутантными клонами считали клоны, в пределах которых  $0.95 C_{\max} : 1.05 C_{\min} \leq 2$ , а мутантными - клоны, в пределах которых  $0.95 C_{\max} : 1.05 C_{\min} > 2$ . В ранних работах число мутантных клонов относили к числу клеточных делений, что приводило к существенному снижению расчетных частот геномных мутаций в случаях высокой мутабельности. В дальнейшем частоты геномных мутаций определяли по формуле:

$$P_0 = - \ln \frac{N_0 - N_m}{N_0} \cdot \frac{N_0}{n - N_0}$$

где  $N_0$  - общее число исследованных клонов,  $N_m$  - число исследованных клонов с мутациями,  $n$  - число исследованных ядер (см. Захаров и Квитко, 1967, стр. 101). В диссертации приводятся частоты геномных мутаций, вычисленные по указанной формуле.

В результате геномных мутаций в клоне могут возникать как клетки с увеличенным, так и клетки с уменьшенным числом хромосом по сравнению с числом хромосом клетки-родоначальницы клона. При  $C_m - C_{\min} > C_{\max} - C_m$ , где  $C_m$  - среднее содержание ДНК в клетках клона, мутантные клоны относили к категории "гипоплоидных", а при  $C_m - C_{\min} < C_{\max} - C_m$  - к категории "гиперплоидных".

Селективную ценность клеток-родоначальниц оценивали по константам экспоненциального роста клонов. При этом исходили из доказанного наследственного характера различий опухолевых клеток по темпам размножения в условиях *in vitro* и *in vivo*,

из имевшихся в литературе данных, показывающих, что межклональные различия сохраняются и при выращивании клонов в виде массовых культур, а скорость пролиферации клеток в логарифмической фазе роста культур и клонов остается относительно неизменной (Ford, 1964; Nias, 1968, и др.).

Для оценки интенсивности отбора в популяциях использовали формулу Холдейна для интенсивности отбора в популяциях (Haldane, 1954); дисперсии и коэффициенты вариации по константам экспоненциального роста; размах изменчивости по константам экспоненциального роста. Скорость вытеснения одних клеточных вариантов другими вычисляли по: Raup, 1963.

Количественную характеристику частот эпигенетической изменчивости клеточных элементов рабдомиосарком проводили на основе статистического анализа результатов гистологического исследования опухолей при пассировании, клонировании *in vivo*, пассировании клональных линий и реклонировании.

Частоты эпигенетической изменчивости при пассировании и клонировании опухолей определяли: 1) по результатам опытов с морфологически однородными опухолями; 2) по результатам опытов со всеми опухолями, содержащими исследуемый клеточный элемент (т.е. и однородными и смешанными); 3) по частоте встречаемости однородных и смешанных опухолей (однородных и смешанных клонов) вне зависимости от типа опухолей предшествующей генерации или опухолей, использованных для клонирования.

Из перечисленных в главе I методов методы определения частот геномных мутаций соматических клеток по результатам фотометрии клеток клонов, оценки интенсивности отбора в популяциях опухолевых клеток и количественной характеристики частоты эпигенетических изменений являются оригинальными. Сказанное в известной мере относится и к предложенному нами методу клонирования опухолевых клеток, существенно отличающемуся от ранее описанных. Использование этих методов в работе являлось одновременно и их апробацией. Поэтому особенности перечисленных методов, существенные для интерпретации получаемых с их помощью результатов, подробно рассматриваются также и в экспе-

риментальных главах диссертации.

Всего для анализа вопросов, связанных с эпигенетической изменчивостью в клеточных популяциях рабдомиосарком было исследовано свыше 1000 подкожно растущих опухолей, 50 линий первичных рабдомиосарком мышей и крыс, около 2000 клонов и 15 перевивных клональных линий. Для анализа кариотипической изменчивости и кариотипической гетерогенности популяций опухолевых клеток и связи этих показателей с интенсивностью отбора в популяциях фотометрически исследованы 85 клонов рабдомиосарком мышей и крыс, 40 клонов линии L и около 400 клонов HeLa.

## Глава II

Изменчивость, наследование и отбор в популяциях нормальных (немалигнизированных) соматических клеток

Разными методами убедительно доказана генотипическая тождественность ядер соматических клеток ядру зиготы и отсутствие связи процессов детерминации и дивергентной дифференцировки со всеми типами мутационной изменчивости. Опытами по трансплантации ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки у амфибий показано также, что указанные процессы не основаны на каких-либо принципиально необратимых изменениях генетического материала (Gurdon, 1962). Они основаны на дифференциальной репрессии генетического материала, приводящей к тому, что 80-95% всех генов реплицируется, но не участвует в процессах гетеросинтеза.

Этим обусловлено существенное отличие соматических клеток от других генетических объектов - соматические клетки являются единственной формой "живых существ" с избыточной наследственной информацией, не реализующейся в фенотипе и не имеющей прямого отношения к их приспособленности к самостоятельному существованию (Вахтин, 1964).

Хотя известна гибридизация соматических клеток и на них можно воспроизвести феномены трансформации и трансдукции, обмен генетической информацией в норме не типичен для клеточных популяций. Поскольку соматические клетки лишены полового про-

цесса и у них отсутствуют какие-либо парасексуальные механизмы, клеточные популяции следует относить к менделевским популяциям (Вахтин, 1964). Они представляют собой совокупности потомств отдельных клеток (клонов), причем частота встречаемости наследственно различных вариантов зависит не только от частоты наследственных изменений в клетках, но и от интенсивности и характера отбора.

Стабильное и избирательное блокирование генетического материала приводит к тому, что для соматических клеток существенны две формы наследственной изменчивости - генотипическая, включающая все типы мутаций, и эпигенетическая (Ephrussi, 1958; Nanney, 1958; Оленов, 1962), включающая наследуемые в ряду клеточных поколений изменения генной активности.

Эпигенетические изменения отличаются значительным разнообразием в отношении числа генов, претерпевающих блокирование-деблокирование, причин, механизмов возникновения и сохранения. Эпигенетические изменения при детерминации и дивергентной дифференцировке носят, в отличие от мутаций, определенный характер, что обусловлено либо специфической организацией самого генетического материала, либо специфическими индуктивными воздействиями, а изменения активности претерпевают сложные комплексы генов. Существенно, что изменения затрагивают не отдельные клетки, а группы по соседству расположенных и не связанных происхождением клеток (Weumann a. Gilman, 1970). Вопрос об определенном или неопределенном характере эпигенетической изменчивости в системе мягкой соединительной ткани не решен. Изменения при превращении пигментных клеток сетчатки в клетки хрусталика носят определенный характер (Yamada, 1967). Трансдетерминация клеток имагинальных дисков дрозофилы описана как вероятностный процесс, но изменения претерпевают не отдельные клетки, а группы клеток (Gehring, 1967). Инактивация хроматина и переход соматических клеток в функционально гемизиготное состояние описывается как процесс, равно вероятный для каждого гомолога (Lyon, 1966). Неизвестен характер эпигенетической изменчивости, приводящий к

пробуждению в клетках синтеза эмбриональных антигенов и гетеро-  
органных антигенов, а также в случаях аллельной исключительнос-  
ти. Следует подчеркнуть, что хотя эпигенетическая изменчивость  
играет большую роль у многих организмов, например у простейших,  
по-видимому, только у соматических клеток весь генотип в це-  
лом приспособлен к осуществлению многообразных и резко различ-  
ных реакций, идущих на основе эпигенетических изменений.

Избыток наследственной информации, отсутствие рекомбинации  
и неясность механизмов, обуславливающих стабильное блокирова-  
ние генетического материала, создает существенные трудности для  
вычленения различных форм наследственной изменчивости у сома-  
тических клеток. Например, генные мутации трудно отдифференциро-  
вать от цитологически необнаружимых хромосомных аберраций, с  
одной стороны, и от эпигенетических изменений, затрагивающих  
активность немногих генов, с другой. Эпигенетические изменения,  
в целом, трудно отличить от ненаследственных изменений генной  
активности, которыми сопровождаются многие реакции клеток, в том  
числе цитодифференцировка. В связи с этим важным критерием яв-  
ляется наследование признаков на клеточном уровне, изучение ко-  
торого затрудняется сложным фенотипическим проявлением наслед-  
ственных изменений у соматических клеток и взаимодействием ге-  
нотипической и эпигенетической форм изменчивости. Существенно,  
что многие признаки тканевой специфичности являются полигенные  
и обладают пороговым проявлением (Waddington, 1957; Grüneberg,  
1969). Важную роль играют гомо- и гетеротопические взаимодей-  
ствия (Лопашов и Сологуб, 1970), некоторые признаки реализуются  
только в клеточных комплексах, описаны "локальные" и "нелокаль-  
ные" гены (McLaren a. Bownau, 1969). Во многих случаях усло-  
вия, необходимые для реализации признака, известны лишь прибли-  
зительно.

В настоящее время показано, что в ряду клеточных поколе-  
ний воспроизводятся как специфические особенности плюрипотен-  
тных клеток (имагинальные диски дрозофилы - Hadorn, 1965), так  
и тканеспецифические особенности полностью детерминирован-  
ных (монопотентных) соматических клеток (скелетные миобласте-

-Konigsberg,1963; хрящевые клетки - Coon,1964; пигментные клетки - Sahn a.Sahn,1966).

Одной из первых работ по наследованию на клеточном уровне являлась наша работа по изучению признаков миобластов скелетных мышц крысы в однослойной культуре (Вахтин и Швембергер, 1966). Способность формировать миофибриллы и сливаться в мiosимпласты наследовалась в течение года культивирования, вплоть до малигнизации, в условиях, исключавших фенотипическое проявление признака, на фоне высокой частоты спонтанных и индуцированных облучением мутационных изменений и отбора на недифференцированный фенотип. Кариологическое изучение миобластов и специальные опыты с массивными дозами облучения показали, что мутационная изменчивость оказывает слабое влияние на фенотипическую реализацию эпигенетически обусловленных признаков миобластов. Было показано также, что такие признаки миобластов, как способность формировать миофибриллы и способность сливаться в мiosимпласты, могут проявляться независимо. Наши выводы полностью совпадают с выводами других авторов, позднее изучавших наследование эпигенетически обусловленных признаков миобластов с помощью более совершенных методов (Richler a.Yaffe, 1970). Перечисленные выше работы позволили охарактеризовать наследование тканеспецифических особенностей как стабильное и протекающее на клеточном уровне, а также выделить критерии, позволяющие отличить наследование признаков на клеточном уровне от их воспроизведения на тканевом уровне (Вахтин, 1966, 1968; Вахтин и Швембергер, 1968). Выявленные особенности наследования и фенотипического проявления тканеспецифических признаков миобластов явились одной из причин, обусловивших в дальнейшем выбор опухолей скелетных мышц (рабдомиосарком) как перспективного объекта для изучения эпигенетической изменчивости в популяциях опухолевых клеток.

Для популяций соматических клеток, входящих в состав целостного организма, характерна низкая частота наследственных изменений. Влияние генотипических и эпигенетических изменений на жизнеспособность клеток и их способность к размножению в

популяциях выступает как влияние этих изменений на селективную ценность клеток. Хотя точных данных, характеризующих интенсивность отбора в клеточных популяциях организма нет, быстрое вытеснение наследственно измененных вариантов свидетельствует о том, что в них протекает эффективный стабилизирующий отбор (Ford, 1961; Оленов, 1962) и что стабилизирующий отбор является, по-видимому, единственной формой отбора, действующего в популяциях нормальных клеток, интегрированных в систему многоклеточного организма. Стабилизирующий отбор (менее эффективный) действует и в популяциях нормальных клеток, культивируемых вне организма (А.Ф. Сахаров), для которых характерно значительное повышение частоты наследственной изменчивости и резкое усиление наследственной гетерогенности. Предполагают, что приспособление популяций соматических клеток к автономному росту сопровождается постепенным ослаблением стабилизирующего отбора и усилением прогрессивного отбора. Когда период адаптации заканчивается, ведущим вновь становится стабилизирующий отбор, идущий в пользу клеток стволовой линии, что и обуславливает поддержание относительно постоянной наследственной структуры популяций.

Быстрая элиминация наследственно измененных форм из состава клеточных популяций организма, свидетельствующая о высокой интенсивности в них стабилизирующего отбора, одновременно свидетельствует об очень высокой степени приспособленности популяций всех нормальных тканей на всех этапах онтогенеза (Вахтин, 1964; Вахтин и Швембергер, 1968). Очевидно, избирательное блокирование генетического материала обеспечивает не только выполнение клетками разнообразных специализированных функций, но и полностью предотвращает избыточность наследственной информации, находящейся в активном состоянии. В свою очередь, сложные механизмы поддержания постоянства внутренней среды организма, межтканевых и межклеточных взаимодействий обеспечивают достаточное усложнение среды, позволяющее всем эпигенетически различным популяциям организма находиться в состоянии практически 100%-й приспособленности, что сближает их с природными популяциями орга-

низмов (см. Crow 1952). По нашему мнению, высокая степень приспособленности популяций соматических клеток, интегрированных в систему целостного организма, является их важной особенностью, существенной в том числе и для понимания специфики популяций опухолевых клеток.

### Глава III

#### Наследственные изменения клеток в процессе малигнизации

Каковы бы ни были причины злокачественной трансформации, различия между опухолевыми и нормальными клетками носят наследственный характер, что доказано экспериментально (возможность перевить опухоль любого гистогенеза одной клеткой) и подтверждено всей клинической практикой (Оленов, 1967). Наследственный характер злокачественности может быть, в принципе, обусловлен тремя типами изменений: 1) мутационными, 2) вызванными включением генетической информации опухолеродного вируса в геном клетки и 3) эпигенетическими.

К началу 60-х годов теоретически наиболее разработанным являлся вариант мутационной концепции канцерогенеза, приписывающий главную роль генным мутациям, накопление которых в одной клетке достигается благодаря отбору (Эфраимсон, 1960-1964).

Проверку этой концепции мы осуществили в 1961-1962 гг. в опытах по влиянию облучения на процесс малигнизации клеток в однослойных культурах скелетных мышц крысы. При этом исходили из того, что раз процесс возникновения и накопления мутаций носит вероятностный характер, повышение частоты мутирования в благоприятных для действия отбора условиях должно приводить к ускорению превращения нормальных клеток в злокачественные. В опытах были применены дозы облучения, индуцирующие в среднем 10-70 мутаций на клетку, что не оказало заметного влияния на каротиотипическую структуру популяций.

В опытах 1-4, продолжавшихся 3-9 мес., клетки не малигнизировались. Малигнизация произошла в опыте 5, в котором клетки культивировали в течение 13-15 мес. (табл. 1).



Таблица 1. Число привитых крыс и число крыс с развившимися опухолями (в скобках) в опыте с облученными и необлученной субкультурами мюллеровских клеток крысы.

Вариант	Длительность культивирования (в мес.)					Всего
	1-10	11	12	13	14-15	
Контроль	170	99	46(2)	55(11)	16	386(13)
10 р x 10	97	25	10	5	5	142
100 р	126	28	19(16)	14(7)	-	187(23)
100 р x 5	119	59	28	13(7)	5(1)	224(8)
500 р	129	38	18	14	5	204
Всего	641	249	121(18)	101(25)	31(1)	1148(44)

В этом опыте число животных, привитых клетками каждой субкультуры, являлось достаточным, чтобы с вероятностью большей 0.999 считать субкультуры, облучавшиеся дозами 10 р x 10 и 500 р не малигнизировавшимися за 12-15 месяцев культивирования, а необлучавшуюся (контрольную) субкультуру и субкультуры, облучавшиеся дозами 100 р и 100 р x 5, малигнизировавшимися в одно и то же время. Таким образом использованные дозы облучения не привели к ускорению процесса спонтанной малигнизации мюллеровских клеток крысы в однослойных культурах. Степень прививаемости клеток малигнизировавшихся субкультур, которые подвергались облучению, достоверно ( $p > 0.999$ ) выше, чем степень прививаемости клеток необлучавшейся субкультуры, однако, это различие трудно приписать действию радиации, так как в двух других облучавшихся субкультурах малигнизация вообще не произошла и, в целом, полученные результаты противоречили мутационной концепции превращения нормальных клеток в злокачественные. Вместе с тем стало очевидным, что интерпретация как наших данных, так и аналогичных литературных данных существенно затрудняется тем, что о количественном соотношении наследственной изменчивости и отбора в исследуемых клеточных популяциях приходится судить

лишь на основании косвенных соображений.

В настоящее время накоплено много данных, свидетельствующих о том, что мутации всех типов, в том числе хромосомные и геномные (Шогосянц, 1972) не могут рассматриваться как единственная причина малигнизации, а опыты по пересадке ядер опухолевых клеток в энуклеированные яйцеклетки амфибий (McKinnell et al., 1969) делают вероятным, что мутационные различия нормальных и опухолевых клеток не носят принципиального характера, даже если они имеют место.

В упомянутых выше опытах впервые была получена малигнизация миобластов скелетных мышц *in vitro*, причем рабдомиосаркомы, развившиеся после прививки клеток облучавшихся субкультур, отличались сильным полиморфизмом - в них, наряду с участками, образованными типичными злокачественными миобластами, встречались участки типа миогенной мезенхимной опухоли и миогенной саркомы, что указывало на возможное воздействие генотипических изменений на эпигенетическую изменчивость или реализацию эпигенетически обусловленных признаков. Результаты изучения полиморфизма клеточных популяций рабдомиосарком приводятся в главах VII и VIII. Здесь лишь отметим, что как наши данные, так и данные других исследователей, свидетельствуют, что в процессе малигнизации тканеспецифические особенности клеток сохраняются; не происходит ни дедетерминации клеток, ни явлений межтканевой метаплазии, и изменчивость опухолевых клеток не выходит за рамки потенциалов исходной ткани.

Анализ имеющихся в литературе данных показывает, что малигнизация сопровождается количественно незначительными изменениями материальных основ наследственности соматических клеток, вне зависимости от того, обусловлена ли она мутациями, эпигенетическими изменениями или вирусами (Альштейн и Голубев, 1972). Опухолевые клетки не приобретают способности к обмену генетической информацией; у них не происходит существенных изменений в соотношении активного и заблокированного генетического материала, т.е. они не утрачивают избытка наследственной информации; они не претерпевают дедетерминации и сохраняют

свойственную нормальным клеткам способность к эпигенетическим изменениям различного типа. Другими словами, популяции опухолевых клеток сохраняют специфические особенности популяций нормальных клеток, описанные в предыдущей главе. Важными, но не принципиальными, представляются изменения, обуславливающие повышенную мутабельность опухолевых клеток (Дубинин и др., 1962), которые являются, очевидно, прямым результатом нарушения регуляторных механизмов клетки (Саломон, 1972), изменения, приводящие к автономизации опухолевых клеток, и изменения, связанные со специфической средообразующей ролью опухолевых клеток (Засильев, 1966; Красковский, 1970).

В целом, приведенные в настоящей главе данные приводят к заключению, что многообразные изменения клеток в процессе малигнизации, каковы бы ни были ее механизмы, не носят принципиального, с точки зрения изменчивости и наследственности соматических клеток, характера. Существенная их часть затрагивает установившиеся в ходе эволюции связи клеточная популяция - организм и лишь опосредованно может влиять на внутрипопуляционные процессы. Количественные и качественные изменения наследственной информации, обусловленные канцерогенезом или сопутствующие ему, в целом, не выходят за рамки изменений, наблюдаемых у незлокачественных соматических клеток в нормальных или патологических условиях, а потому опухолевые клетки следует рассматривать как частный случай соматических клеток вообще и подходить к явлениям наследственности, изменчивости и отбора в популяциях опухолевых клеток с тех же позиций, что и к аналогичным явлениям в популяциях нормальных (незлокачественных) клеток. В силу рассмотренных в главе II особенностей разных форм наследственной изменчивости соматических клеток и их фенотипического проявления, а также характера наследования на клеточном уровне, для изучения количественных связей между изменчивостью, отбором и наследственной структурой популяций опухолевых клеток могли быть использованы не все типы изменений. Наиболее доступными по методическим причинам в период проведения нашей работы являлись геномные мутации (из

генотипических изменений) и изменения, затрагивающие тканеспецифические особенности клеток (из числа эпигенетических).

## Глава 1У

### Кариотипическая изменчивость (геномные мутации)

Изучение частоты и характера геномных мутаций, их связи с селективной ценностью клеток и зависимости от условий, в которых пролиферируют опухолевые клетки, проводилось в 1963-1970 гг. на линии HeLa *in vitro* и перевивной рабдомиосаркоме мышей *in vivo*.

В опытах 1963-1964 гг. была показана сама возможность с помощью фотометрического изучения клеток клонов вычислить частоты геномных мутаций и количественно охарактеризовать кариотипическую гетерогенность популяций (глава У1), а также использовать полученные данные для выяснения связи перечисленных показателей между собой и с интенсивностью отбора в популяциях (глава У). Из 46 исследованных клонов HeLa 14 оказались мутантными, что дало очень высокую частоту геномных мутаций - порядка  $10^{-1}$  на клетку на поколение. Клоновые популяции отличались резко повышенной кариотипической гетерогенностью по сравнению с исходными массовыми популяциями, в том числе из-за полиплоидизации клеток; это давало основания предполагать, что высокая частота геномных мутаций обусловлена резко неблагоприятными для опухолевых клеток условиями пролиферации. Однако опыты, в которых варьировалось число высевавшихся клеток, показали, что и при меньших изменениях кариотипической структуры наблюдается высокая частота геномных мутаций - в среднем около  $10^{-1}$  на клетку на поколение. Эти опыты показали также, что для выяснения зависимости частоты мутаций от темпа роста, плоидности и других признаков требуется в несколько раз больший материал.

Последующие опыты (таблица 2), подтвердили, что клетки HeLa отличаются высокой частотой геномных мутаций и показали, что частота геномных мутаций может варьировать в популяциях в широких пределах. Частоты геномных мутаций примерно

Таблица 2. Частота геномных мутаций в клонах HeLa на 6-е и 12-е сутки

Число высейанных клеток и культуральная среда	Сутки после посева	Эффективность клонирования (%)	Число клонов	Число клеток (n)	Число мутантных клеток (m)	Частота мутаций $\times 10^3$ на клетку на поколение
10 000						
Обычная . . . . .	6	68.7	31	193	5	$3.2 \pm 1.4$
То же . . . . .	12	50.0	30	293	16	$8.6 \pm 1.7$
С удвоенным к-вом NaCl . . . . .	6	34.4	29	132	4	$4.2 \pm 2.0$
То же . . . . .	12	17.1	30	259	18	$13.0 \pm 2.2$
С утроенным к-вом NaCl . . . . .	12	13.3	30	227	16	$11.5 \pm 2.3$
5 000						
Обычная . . . . .	6	74.0	28	171	8	$6.4 \pm 2.0$
То же . . . . .	12	52.0	30	277	16	$9.1 \pm 1.8$
С удвоенным к-вом NaCl . . . . .	6	56.4	29	156	11	$12.3 \pm 3.2$
То же . . . . .	12	18.5	30	297	23	$16.5 \pm 2.3$
С утроенным к-вом NaCl . . . . .	6	1.5	19	118	11	$16.7 \pm 3.7$
Всего			286	2103	128	$9.4 \pm 0.69$

такого же порядка наблюдались и в клонных популяциях перививной полиморфноклеточной рабдомиосаркомы (таблица 3). Таким образом, высокая частота геномных мутаций (порядка  $10^{-2}$  -  $10^{-1}$  на клетку на поколение) характерна как для популяций опухолевых клеток *in vitro* так и для популяций опухолевых клеток *in vivo*.

В опытах *in vitro* частота геномных мутаций не зависела от густоты посева клеток, от близости или удаленности растущих клонов. Не оказывало влияния на расчетные частоты мутаций и

и число фотометрически исследованных клеток каждого клона, что позволило сравнить мутабельность клонов с разным числом клеток и разным средним темпом деления клеток. Лишь самые мелкие клоны отличаются достоверно повышенной мутабельностью, а клоны

Таблица 3. Частота геномных мутаций в клонных популяциях рабдомиосаркомы мыши *in vivo* ( $\times 10^{-2}$  на клетку на 1 поколение).

№ опыта	Число клонов	Число клеток	Частота мутаций по повторностям						Средняя частота мутаций
			I	II	III	IV	V	VI	
386	13	300	25.6	20.1	37.3	21.5	18.7	18.3	23.1 $\pm$ 2.4
387	9	217	12.6	3.5	6.4	11.0	11.7	15.4	7.6 $\pm$ 1.8
392	15	365	8.5	15.0	14.2	11.0	14.4	9.5	12.0 $\pm$ 1.7
398	33	813	8.9	9.3	4.8	6.4	7.6	10.6	7.2 $\pm$ 0.9
Всего	70	1705	11.5	11.5	10.8	10.3	11.3	12.2	10.9 $\pm$ 0.8

с числом клеток от 5-6 до 17-32 на 6-е сутки (рис.1) и клоны с числом клеток от 11 до 666 на 12-е сутки не отличались по мутабельности. В популяциях рабдомиосаркомы, в которых клоны по числу клеток варьировали от 0.8 до 300 млн, быстро и медленно растущие клоны также не отличались достоверно по мутабельности.

Резко отличаются клоны с "синхронными" и "асинхронными" делениями клеток (рис.1) - это указывает, что изменения в числе хромосом становятся более вероятными при задержке или ускорении нормального темпа деления опухолевых клеток. Обнаруженные различия в мутабельности клонов, отличающихся по степени упорядоченности делений, имеют существенное значение для оценки достоверности обнаруженных нами частот изменчивости. Очевидно, что ни ошибки прибора, ни погрешности методики не могут избирательно действовать на клоны с 3, 5-6, 9-12 клетками и не действовать в том же эксперименте на растущие рядом клоны с 4, 8,

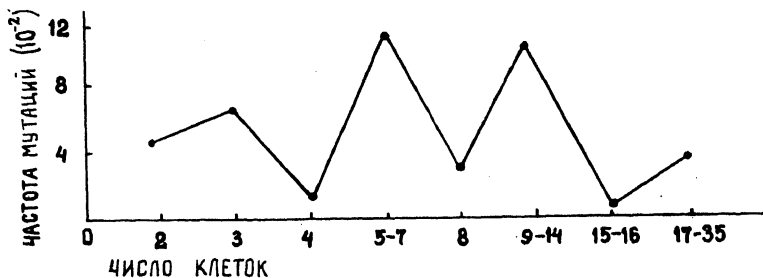


Рис.1. Частота геномных мутаций в 6-дневных клонах HeLa с разным числом клеток

16 и т.д. клетками.

Различия по мутабельности выявлены при сопоставлении абортивных и фертильных клонов HeLa. Так, на 12-е сутки в выборке из 54 клонов с числом клеток менее 65 частота мутаций составляла  $14.8 \times 10^{-2}$ , а в более крупных клонах -  $9.6 \times 10^{-2}$ . В группе из 66 клонов с 6-80 клетками частота мутаций равнялась  $13.8 \times 10^{-2}$ , а в более крупных клонах -  $9.5 \times 10^{-2}$ . Таким образом, клоны с числом клеток менее 64-80, которые принято рассматривать как абортивные, отличались несколько большей кариотипической изменчивостью по сравнению с фертильными клонами.

В опытах с HeLa изменчивость зависела от среднего содержания ДНК в клетках клонов (рис.2). Так, для клонов с 2-4 С частота геномных мутаций составляла  $5.8 - 6.5 \times 10^{-2}$  и была примерно в два раза ниже, чем для "полиплоидных" клонов ( $11.1-14.4 \times 10^{-2}$ ). Следует отметить, что абортивные клоны отличались в целом повышенной ploидностью, по сравнению с фертильными, что затрудняет анализ связи между ploидностью опухолевых клеток и их мутабельностью в опытах с HeLa. Однако, в опытах с рабдомиосаркомой, клоновые популяции которой были свободны от абортивных клонов, также была обнаружена повышенная мутабельность клонов, отличающихся повышенным средним содержанием ДНК в клетках. В 5 клоновых популяциях с умерен-

ной плоидностью частоты геномных мутаций были в 2-3 раза ниже, чем в клоновой популяции опухоли, отличавшейся повышенной плоидностью ( $p < 0.01$ ). В целом, среди 22 высокомутабильных кло-

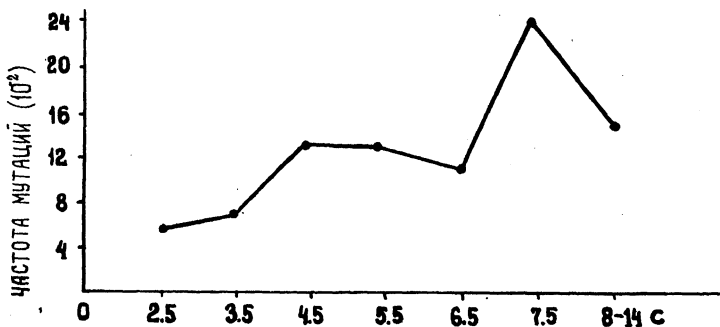


Рис.2. Частота геномных мутаций в клонах HeLa различной плоидности.

нов 14 были высокоплоидными и 8 низкоплоидными, в то время как среди 48 низкомутабильных клонов только 15 были высокоплоидными, а 33 отличались низким содержанием ДНК на ядро ( $0.05 < p < 0.01$ ). Кроме того, в опытах с рабдомиосаркомой мутабельность клонов коррелировала со средним содержанием ДНК в их клетках ( $r = +0.28$ ,  $p < 0.05$ ).

Распределение клонов по числу обнаруженных в них мутантов достоверно отличается от теоретически ожидаемого биномиального распределения ( $p < 0.01$ ). Это отличие обусловлено тем, что клоны с низкой мутабельностью и клоны с высокой мутабельностью, встречались чаще, чем следовало ожидать, если бы мутабельность клеток не зависела от их принадлежности к тому или иному клону (т.е. при клеточном возникновении геномных мутаций). Анализ популяций рабдомиосарком выявил в них резкие и достоверные межклональные различия по мутабельности, носящие наследственный характер.

Во всех опытах гиперплоидные мутанты (с увеличенным числом хромосом) возникали значительно чаще, чем гипоплоидные (с



уменьшенным числом хромосом). Для *HeLa* было характерным 5-4-кратное преобладание гиперплоидных мутантов над гипоплоидными. В опытах с рабдомиосаркомой гипоплоидные мутанты (с учетом всех повторностей) были зарегистрированы в 29 случаях, а гиперплоидные - в 58, т.е. в 2 раза чаще. Анализ показал, что этот постоянно наблюдающийся сдвиг в соотношении мутантов не обусловлен погрешностями использованного метода, или тем, что преобладающими типами регистрируемых изменений являлись кратные изменения в числе хромосом. Более вероятно, что существенным источником геномных мутаций опухолевых клеток является экстракопирование отдельных хромосом (своего рода полиплоидизация по отдельным хромосомам), вызванное нарушениями упорядоченного протекания редупликации хромосомного набора. Вне зависимости от возможных механизмов, лежащих в основе описанного явления, то обстоятельство, что опухолевые клетки с увеличенным числом хромосом возникают в 2-5 раза чаще, чем клетки с уменьшенным числом хромосом, представляется существенным для кариотипической эволюции популяций опухолевых клеток.

Для понимания закономерностей изменчивости и отбора существенным является повышение частоты кариотипической изменчивости при снижении степени приспособленности популяций опухолевых клеток. Помимо литературных данных, об этом непосредственно свидетельствуют результаты, приведенные в табл. 2 - снижение степени приспособленности клоновых популяций *HeLa* (вызванное добавлением в среду  $\text{NaCl}$ ) во всех случаях приводило к заметному повышению частоты геномных мутаций.

В целом, обнаруженные нами средние частоты геномных мутаций являются не типичными для популяций организмов и популяций соматических клеток, интегрированных в системе многоклеточного организма. При таких частотах кариотипы не могут устойчиво воспроизводиться в ряду клеточных поколений, и многие особенности кариотипа должны вести себя как признаки с плохой наследуемостью. Частоты геномных мутаций подвержены сильным изменениям под действием как наследственных факторов, так и факторов среды, и могут достигать величин порядка  $1-2 \times 10^{-1}$  на клет-

ку на поколение. Для популяций опухолевых клеток, очевидно, реальными следует считать ситуации, при которых мутационное давление не уступает (или даже превосходит) давление отбора.

## Глава V

### Интенсивность отбора в популяциях

Напряженность конкурентных взаимоотношений в популяциях, в том числе в популяциях, находящихся в состоянии равновесия, количественно может быть охарактеризована с помощью разных методов. В популяциях опухолевых клеток, как популяциям немеланомным (глава III), применима формула Холдейна для определения интенсивности отбора по разности между логарифмами приспособленности оптимального фенотипа и средней приспособленности популяции (Haldane, 1954). Приспособленность клеточных вариантов может быть оценена по константам экспоненциального роста формируемых ими клонов, так как показано, что различия по темпам деления наследственны, темп деления клеток в логарифмической фазе роста относительно постоянен, а межклональные различия сохраняются и при выращивании клонов в виде массовых культур.

Хотя распределение опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* по константам экспоненциального роста всегда имеет одновершинный характер (рис. 3), вычисление интенсивности отбора осложнено рядом обстоятельств. В опытах *in vitro* основной источник погрешностей — присутствие абортивных клонов. Соотношение между фракциями абортивных и фертильных клонов может меняться, в том числе под влиянием факторов среды. При ухудшении условий культивирования процент клеток, дающих начало абортивным клонам, резко возрастает. Как показали опыты *in vivo*, это обусловлено, по-видимому, тем, что признак "темпы клеточного деления" в интервале констант экспоненциального роста от 0 до 0.3-0.5 ведет себя как квази-прерывистый (пороговый). Абортивные клоны не являются потомствами леталей с задержанным фенотипическим проявлением; абортивным может стать любой клон, в котором темпы деления клеток понизятся до критических, летальных значений.

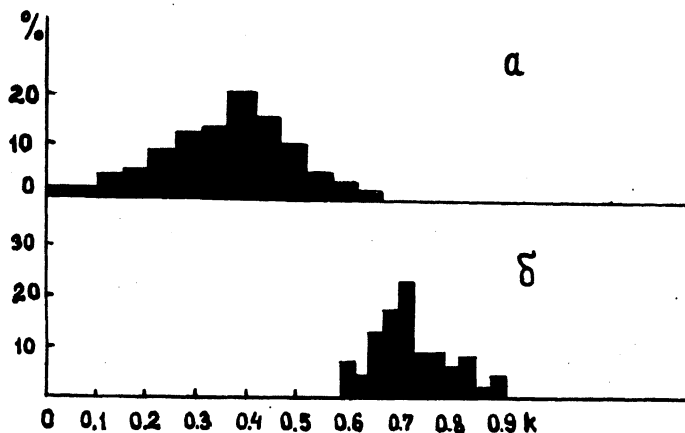


Рис.3. Распределение клоновых популяций HeLa (а - in vitro, 6 суток) и рабдомиосаркомы мыши (б - in vivo, 21-26 суток) по константам экспоненциального роста (к).

В популяциях in vivo, свободных от abortивных клонов, точному определению интенсивности отбора препятствуют выход клеток из логарифмической фазы роста и нестабильность наследования признака "темпа деления", обусловленная высокой частотой наследственной изменчивости. Поэтому в настоящее время возможна лишь приближенная оценка интенсивности отбора в популяциях опухолевых клеток; при этом в ряде случаев целесообразно использовать такие показатели, как размах изменчивости клеток по константам экспоненциального роста, дисперсию и коэффициент вариации по этому признаку.

Как показали эксперименты с клетками HeLa и перевивной рабдомиосаркомы мыши, для клоновых популяций опухолевых клеток in vitro и in vivo характерна высокая интенсивность отбора — разность максимальных и средних констант экспоненциального

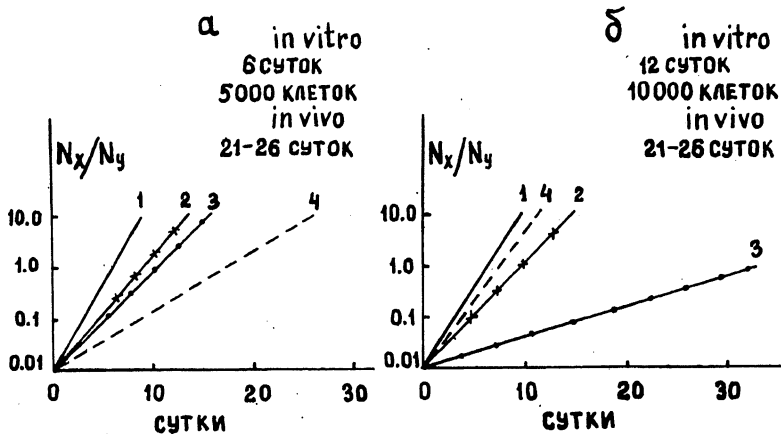


Рис.4. Интенсивность отбора (а) и скорость изменения в соотношении крайних по темпам размножения вариантов (б). С 1-3 - HeLa in vitro на нормальной (1) и ухудшенной (2,3) среде; 4 - рабдомиосаркома мыши in vivo.

роста порядка 0.1-0.2 и выше, что соответствует 10-кратному изменению в пользу варианта с максимальной приспособленностью за 10-30 суток (рис.4).

При ухудшении условий среды (снижении степени приспособленности популяций) интенсивность отбора в популяциях опухолевых клеток падает (рис.4). Ухудшение условий среды влияет на интенсивность отбора как непосредственно (замедление темпа деления клеток, сокращение фракции фертильных клонов и пропорциональное увеличение фракции абортивных клонов), так и опосредованно, через повышение частоты наследственных изменений, снижающих приспособленность опухолевых клеток. Отмеченная зависимость свидетельствует, что интенсивность отбора в массовых популяциях опухолевых клеток должна быть как правило выше, чем в клонных популяциях.

В заключение следует отметить, что клетки с высокими и мак-

симальными темпами размножения, как по нашим данным (рис. 3), так и по данным других авторов, всегда составляют лишь незначительную часть всех опухолевых клеток популяции, что находится в очевидном противоречии с общепринятой трактовкой концепции стволовой линии клеток Макино-Левана.

## Глава VI

### Отбор в кариотипически гетерогенных популяциях

Хотя кариотипические изменения являются скорее всего не причиной малигнизации, а ее следствием (глава III), кариотипическая гетерогенность свойственна практически всем популяциям опухолевых клеток. Кариотипическая изменчивость не только лучше всего исследована (В. В. Погосьянц, 1960-1972), но и является единственной формой мутационной изменчивости, изучение которой может быть использовано в настоящее время для установления связей изменчивость-отбор-наследственная структура популяций опухолевых клеток.

Опыты с  $^3\text{H-TdR}$  и  $\text{L in vitro}$  и перевивными рабдомиосаркомами крысы и мыши  $\text{in vivo}$  показали, что при клонировании кариотипическая гетерогенность популяций опухолевых клеток, как правило, повышается - усиливается размах изменчивости клеток по содержанию ДНК, повышаются дисперсии и коэффициенты вариации клеток по содержанию ДНК. В некоторых случаях повышение кариотипической гетерогенности в клонных популяциях столь велико, что размах изменчивости клонов по среднему содержанию ДНК в их клетках превосходит размах изменчивости клеток в исходной популяции. Повышение обусловлено тем, что в клонных популяциях быстро восстанавливается фракция клеток с минимальным содержанием ДНК на ядро (в том числе гипоплоидных, возможно, не способных к делению и клонообразованию) и наряду с этим появляются клетки с более высоким содержанием ДНК, чем в клетках исходной популяции.

Кариотипическая структура клонных популяций лабильна. Изменения кариотипической гетерогенности зависят от межклональных различий (обусловленных кариотипическими различиями кле-

ток-родоначальниц клонов), внутриклональной изменчивости опухолевых клеток и неодинаковой селективной ценностью клеток-родоначальниц клонов. Внутриклональная изменчивость играет большую роль - например, в опытах с рабдомиосаркомой мышцы были получены клоны, кариотипическая гетерогенность которых через 21-26 суток роста достоверно превосходила кариотипическую гетерогенность исходных опухолей. Хотя во всех случаях конечный результат обусловлен совокупным действием изменчивости и отбора, роль мутационного и селективного факторов в становлении внутриклональных и межклональных различий неодинакова.

Ухудшение условий среды (снижение эффективности клонирования, повышение процента клеток, формирующих abortивные клоны, замедление темпов деления клеток) приводит к усилению кариотипической гетерогенности клоновых популяций, и в целом, популяции опухолевых клеток с пониженной приспособленностью отличаются большей кариотипической гетерогенностью, чем популяции лучше приспособленные.

Влияние численных изменений кариотипа на селективную ценность опухолевых клеток было изучено путем 1) сопоставления гетерогенности исходных популяций с гетерогенностью полученных от них клонов по среднему содержанию ДНК, 2) изучения связи между средним содержанием ДНК в клетках клонов и темпом их роста, 3) сопоставления распределений популяций по содержанию ДНК и по константам экспоненциального роста.

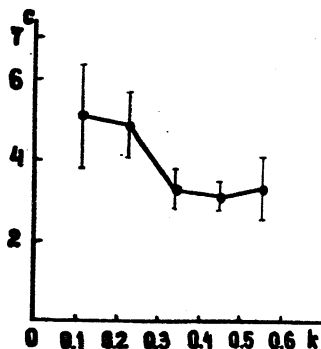


рис. 3. Среднее содержание ДНК (с) в клетках HeLa с разными константами экспоненциального роста (k).

Процент гиподиплоидных и околодиплоидных клонов был ниже, чем процент подобных клеток в исходных массовых популяциях, что свидетельствует о пониженной селективной ценности гиподиплоидных клеток. В опытах с  $HeLa$  клетки с повышенной плоидностью обладали несколько пониженной селективной ценностью (рис. 5). Коэффициент корреляции между величиной 146 клонов  $HeLa$ , исследованных на 6-е сутки, и их плоидностью равнялся  $-0.86$  ( $p < 0.01$ ), что обусловлено в значительной степени большей плоидностью абортивных клонов по сравнению с фертильными. В опытах с рабдомиосаркомой коэффициент корреляции между константами экспоненциального роста клонов и средним содержанием ДНК в их клетках равнялся  $+0.12$  и был статистически недостоверен. В целом, клетки с максимальными показателями содержания ДНК на ядро часто обладают пониженной селективной ценностью.

Полученные результаты свидетельствуют, что в широком диапазоне различия между опухолевыми клетками по содержанию ДНК, отражающие их различия по числу хромосом, слабо влияют на селективную ценность клеток. Клоны, резко отличающиеся по константам экспоненциального роста, часто обладают одинаковой средней плоидностью (рис. 5), а клетки с максимальной селективной ценностью обладают разными числами хромосом. Различной селективной ценностью обладают и клетки модальных классов.

Анализ собственных и литературных данных приводит к выводу, что в популяциях опухолевых клеток высокая общая интенсивность отбора часто сочетается со слабым отбором по кариотипу, что, учитывая высокую частоту геномных мутаций (глава 1У), должно приводить к неадаптивным изменениям наследственной структуры популяций опухолевых клеток. Существенно, что при высокой частоте геномных мутаций и слабом отборе по кариотипу из состава популяций могут элиминироваться и кариотипические варианты с максимальной селективной ценностью, а доминирующими становятся кариотипические варианты с пониженной селективной ценностью, если они отличаются одновременно и пониженной мутабельностью (варианты со стабильным кариотипом).

## Глава VII

### Эпигенетическая гетерогенность популяций опухолевых клеток

Вопрос о эпигенетической структуре опухолей приобрел актуальность в начале 60-х гг., когда была доказана важная роль эпигенетической изменчивости в процессах детерминации. Экспериментально он решался нами на материале опухолей скелетных мышц крыс и мышей (глава I); при этом преследовались следующие цели: 1) выявление внутрипопуляционных различий по признакам, предположительно обусловленным эпигенетически; 2) проверка их наследуемости; 3) изучение влияния на эти признаки генотипических изменений и изменений условий среды (как для уточнения эпигенетической природы признаков, так и для получения данных о характере их фенотипического проявления).

Анализ собственных и литературных данных показал, что рабдомиосаркомы содержат клеточные элементы, отличающиеся по морфологии и морфогенетическим потенциям. Из них большие круглые, большие веретеновидные и средние веретеновидные относятся к дифференцирующимся клеточным элементам. Остальные — мелкие круглые, мелкие веретеновидные, плеоморфные и мезенхимоподобные не проявляют признаков миогенной дифференцировки при пассировании опухолей и клонировании, но различаются по величине, форме и гистологическому типу формируемых опухолей. Недифференцирующиеся элементы (образующие кругло-, веретено- и полиморфноклеточные миогенные саркомы, по морфологии не отличимые от сарком соединительнотканного происхождения), выделены нами в группу "саркоматоидных" (подробно клеточные элементы и типы формируемых ими опухолей описаны в книге: Вахтин и Швемберггер, 1968). Специфичность сочетания морфологических особенностей и морфогенетических потенций рассматривалась нами как признак данного клеточного элемента. Кроме того нами исследованы такие признаки, как "способность образовывать миосимпласты" (безотносительно к проявляющим эту способность клеточным элементам), активность цистронов, ответственных за синтез миозина в опухолевых клетках, "степень выраженности полианизоморфизма клеточных



элементов" и "степень выраженности способности к ориентированному росту".

Способность формировать миосимпласты клетками рабдомиосарком наследовалась стабильно. У недифференцированных опухолевых клеток миогенную дифференцировку удалось индуцировать через 2 года пассирования опухолей на животных (рис. 6).

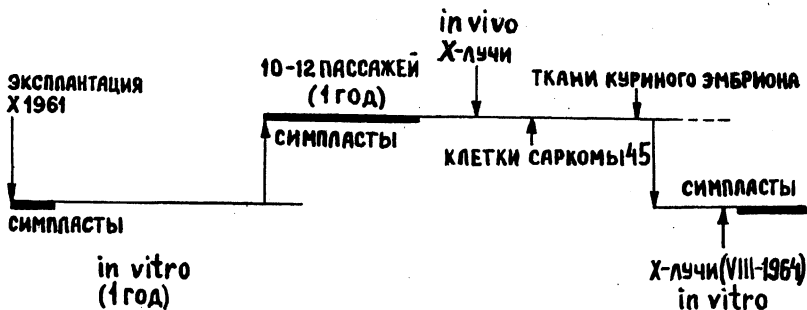


Рис. 6. Схема опытов по изучению наследования способности нормальных и злокачественных миобластов формировать миосимпласты.

Прекращение формирования миосимпластов вызвано изменением нормы реакции клеток; вероятно, что изменение нормы реакции происходит в результате отбора мутаций, а потому различия по способности проявлять признаки миогенной дифференцировки нельзя рассматривать как эпигенетически обусловленные.

Наследование активности цистронов было прослежено в клональной линии недифференцированной полиморфноклеточной рабдомиосаркомы мышей, полученной в результате 9 последовательных выделений потомств отдельных клеток. В таких плеоморфных клетках происходит синтез миозина и присутствуют все его субъединицы, обнаруживаемые в высокодифференцированных рабдомиосаркомах и нормальных скелетных мышцах. Активность всех цистронов миозина наследовалась на клеточном уровне и наследовалась стабильно. Скорее всего, клеточные популяции рабдомиосарком не яв-

ляются гетерогенными по этому эпигенетически обусловленному признаку. Признаки "степень выраженности полианизоморфизма" и "степень выраженности способности к ориентированному росту", по нашим данным, не наследуются на клеточном уровне.

Специфические особенности клеточных элементов рабдомиосарком воспроизводились при пассировании опухолей, при их клонировании, при формировании однородных по клеточному составу клонов и при пассировании клональных линий, а в случае плеоморфных клеток и при реклонировании. Они наследуются на клеточном уровне, но из-за изменчивости (особенно сильной при клонировании) наследуются нестабильно. Таким образом, эпигенетически обусловленные признаки рабдомиосарком воспроизводятся в ряду клеточных поколений по-разному. Для тканеспецифических (способность формировать миосимпласты, способность синтезировать миозин), характерно стабильное наследование - признаки воспроизводятся неограниченно долго, несмотря на высокий уровень генотипической изменчивости (глава 1У) и интенсивно протекающий в популяциях отбор (глава У), видимым образом не направленный на сохранение у клеток указанных признаков. Внутри-тканевые различия воспроизводятся при росте и перевивках опухолей, при клонировании, росте и перевивках клонов, но это воспроизведение постоянно нарушается, благодаря свойственной клеточным элементам изменчивости, что приводит к явлению нестабильного наследования.

Кариологическое изучение показало, что постоянная встречаемость опухолей определенных гистологических типов не связана с существованием сбалансированных кариотипов, способных устойчиво воспроизводиться и определять специфику клеточных элементов. Рабдомиосаркомы могут отличаться сильным полиморфизмом при небольшой кариотипической изменчивости и, наоборот, быть однородными по клеточному составу несмотря на высокую кариотипическую гетерогенность. На тип клеточных элементов не влияло и облучение в дозах от 200 до 5000 р. Очевидно, различия клеточных элементов рабдомиосарком полностью или почти полностью обусловлены изменениями эпигенетической природы.

На тип клеточных элементов рабдомиосарком не влияли изменения антигенного состава опухолевых клеток, инкубация с РНК, выделенными из мышечной ткани и печени, индуктивные агенты (клетки саркомы 45, переходный эпителий мочевого пузыря, клетки тканей куриного эмбриона, хлористый литий, трипановый синий), различия в условиях роста при метастазировании в разные органы. В целом, как наши, так и литературные данные, показывают, что клеточные элементы рабдомиосарком, определяющие гистологические типы опухолей, не обнаруживают зависимости от модифицирующих факторов среды. Напротив, проявление клеточными элементами способности к миогенной цитодифференцировке находится под сильным контролем среды, и изменения степени дифференцированности часто носят модификационный (модуляторный) характер.

Наследование тканеспецифических особенностей показано для опухолей разного гистогенеза и во всех случаях, когда исследования проводились с достаточной тщательностью. Полиморфизм клеточных элементов также свойственен опухолям разного гистогенеза. То, что такой полиморфизм является наследственно (и эпигенетически) обусловленным, в настоящее время, помимо рабдомиосарком, показано с помощью клонального анализа для карциносарком почки, опухолей тимуса, опухолей коры надпочечников и нейробластом. Таким образом, клеточные популяции опухолей разного гистогенеза могут быть эпигенетически однородными по определенным признакам, но могут быть и эпигенетически гетерогенными. В силу независимого проявления отдельных эпигенетически обусловленных признаков, эпигенетическая гетерогенность популяций опухолевых клеток должна представлять широко распространенное явление, и можно утверждать, что более детальное изучение обнаружит уже в ближайшие годы эпигенетическую гетерогенность в опухолях, описываемых как эпигенетически однородные. Эпигенетическую гетерогенность, как и кариотипическую гетерогенность, следует рассматривать не как специфическую особенность одной какой-либо опухоли, или опухолей только определенного гистогенеза, но как явление, потенциально свойственное популяциям опухолевых клеток в целом.

## Глава VIII

## Эпигенетическая изменчивость и отбор в эпигенетически гетерогенных популяциях

В главе на материале рабдомиосарком крыс и мышей рассмотрены типы и частоты эпигенетических изменений, происхождение эпигенетической гетерогенности популяций опухолевых клеток и некоторые вопросы, связанные с отбором по эпигенетически обусловленным признакам.

При клонировании *in vivo* по принятой нами методике (глава I), наряду с однородными клонами встречался небольшой процент смешанных клонов, сформированных разными клеточными элементами [рис. 6]. Это позволило путем сопоставления наблюдаемых частот однородных и смешанных клонов с частотами, ожидаемыми при условии, что клоны происходят не от одной клетки, проанализировать сам процесс клонообразования. Расчеты показали, что образующиеся после внутривенного введения клеток опухолевые узлы в легких не происходят от 2 или более клеток ( $p < 0.001$ ), и что любое предположение о неклональном их происхождении приводит к достоверному несовпадению теоретически ожидаемых и наблюдаемых результатов. Таким образом, и однородные и смешанные колонии опухолевых клеток в легких ведут происхождение от одной клетки, т.е. являются клонами, и принятая нами методика может быть использована не только для получения перевивных клональных линий и изучения состава популяций опухолевых клеток, но и для определения типов и частот эпигенетических изменений.

Изучение опухолей при пассировании и клонировании дало совпадающие результаты (табл. 4 и 5), свидетельствующие о способности клеточных элементов к взаимопревращениям. Например, дифференцирующиеся элементы (большие круглые клетки, большие и средние веретенновидные) способны превращаться не только в дифференцирующиеся же клеточные элементы, но и в недифференцирующиеся, в том числе в саркоматоидные и мезенхимоподобные. Наблюдаются и обратные изменения.

От выведенного нами штамма рабдомиосаркомы крыс РС-5, исходные опухоли которого имели выраженные признаки миогенной

Таблица 4. Частота превращения клеточных элементов рабдомиосарком крыс (К) и мышей (М), рассчитанная по встречаемости морфологически однородных и морфологически смешанных опухолей в элементы иных типов (в %).

Исследуемые клеточные элементы	Число опухолей	Б. круглые	Б. веретеновидные	С. веретеновидные	Саркоматоидные	Мезенхимоподобные	Плеоморфные	Общая частота изменений
Б. круглые, К	116	-	31.0	0	0	1.7	0	32.7
" " , М	41	-	3.7	22.0	0	0	7.3	33.0
Б. веретеновидные, К	147	12.2	-	0	6.1	11.6	0	29.9
" " М	25	6.0	-	14.0	0	0	0	20.0
С. веретеновидные, К	64	0	0	-	0	19.0	0	19.0
" " М	51	17.6	6.9	-	0	0	0	24.5
Саркоматоидные. . . . К	45	0	20.0	0	-	21.1	0	41.1
" " М	18	0	0	0	-	33.3	0	33.3
Мезенхимные, К	72	1.4	23.6	10.4	13.2	-	1.4	50.0
Плеоморфные, К	64	0	0	0	0	1.6	-	1.6

дифференцировки, были получены перевивные клональные линии недифференцированных плеоморфных клеток. При их клональном анализе обнаружены мезенхимоподобные клоны и смешанные клоны, состоящие из плеоморфных и мезенхимоподобных клеток. Как указывалось (глава УП), в плеоморфных клетках сохраняется активность всех цистронов миозина. Поэтому полученные результаты не только подтверждают способность плеоморфных клеток рабдомиосарком превращаться в мезенхимоподобные, но и доказывают мюогенную природу последних.

Разные методы расчета (глава I) дают разные частоты изменчивости. Во всех случаях, однако, обнаружена большая измен-

чивость клеток при клонировании, чем при пассировании, неодинаковая частота изменчивости разных клеточных элементов и неодинаковая частота разных типов изменений (табл. 4 и 5).

Таблица 5. Частота превращения клеточных элементов рабдомиосарком крыс (К) и мышей (М), по данным клонирования морфологически однородных и морфологически смешанных опухолей, в элементы иных типов (в %).

Исследуемые клеточные элементы	Число клонов	Б. круглые	Б. веретеновидные	С. веретеновидные	Саркоматоидные	Мезенхимоподобные	Плеоморфные	Общая частота изменений
Б. круглые, М	589	-	57.3	2.5	9.5	3.4	15.8	88.5
Б. веретеновидные, М	522	5.1	-	16.0	14.7	4.7	29.3	69.8
С. веретеновидные, М	140	0.3	39.9	-	8.7	10.7	4.0	63.6
Саркоматоидные, М	405	0	4.9	1.2	-	58.8	0	64.9
Мезенхимоподобные, К	45	0	0	0	0	-	87.8	87.8
" , М	405	0	4.9	1.2	35.1	-	0	41.2
Плеоморфные, К	411	0	0	0	0	4.9	-	4.9

В условиях клонирования (табл. 5) вариабельность клеточных элементов последовательно снижается в ряду большие круглые → большие веретеновидные → средние веретеновидные → (саркоматоидные и мезенхимоподобные) → плеоморфные клетки с 80-90 до 4-5%. Приведенный ряд отражает изменения клеточного состава рабдомиосарком при длительном пассировании. Поэтому данные табл. 4 и 5 показывают также, что изменения, совпадающие с направлением эпигенетической эволюции клеточных популяций рабдомиосарком, происходят чаще, чем обратные изменения (недифференцирующихся элементов в дифференцирующиеся), а взаимопревращения близких (с точки зрения эволюции популяций) элементов чаще, чем

отдаленных.

Способность клеточных элементов к взаимопревращениям свидетельствует, что эпигенетическая гетерогенность популяций опухолевых клеток может быть не только первичной (обусловленной малигнизацией разных по морфогенетическим потенциам клеток — Шапот, 1971), но и возникать в первоначально однородных популяциях опухолевых клеток, а все описанное разнообразие гистологических типов рабдомиосарком, в принципе, может быть получено в потомстве одной клетки.

По своему характеру исследованные эпигенетические изменения следует отнести к внутритканевым трансдетерминациям.

Они не приводят к выходу опухолевых клеток за пределы потенциалов, свойственных нормальной мышечной ткани, и возможно, что типы подобных внутритканевых трансдетерминаций обусловлены филогенетически, в ходе эволюции тканей многоклеточного организма.

Эволюция популяций рабдомиосарком по описанным признакам приводит к формированию эпигенетически однородных полиморфноклеточных рабдомиосарком, плеоморфные клетки которых наиболее стабильны.

На изменение эпигенетической структуры оказывает влияние как отбор, так и изменчивость, совпадающая, как указывалось, с направлением эволюции. Частоты изменений могут быть очень высокими, а не все сдвиги в эпигенетической структуре популяций можно трактовать как заведомо адаптивные. Количественная интерпретация наблюдающихся сдвигов в эпигенетической структуре осложняется также тем, что не ясно, являются ли единицами изменчивости клетки или клеточные комплексы. Количественная характеристика эпигенетической эволюции, очевидно, должна основываться на полигенной природе внутритканевых трансдетерминаций и их пороговом проявлении. Расчеты показали, что таким путем можно определить различия между популяционными средними. Экстраполяция полученных данных приводит к недифференцирующимся популяциям, что хорошо согласуется с закономерностями прогрессии рабдомиосарком.

## Глава 1X

### Некоторые вопросы изменения и сохранения наследственной структуры клеточных популяций

В настоящей главе на основании собственных и литературных данных рассмотрены некоторые общие и частные вопросы, связанные с сохранением и изменением структуры популяций опухолевых и нормальных клеток.

Наследственная структура клеточных популяций определяется соотношением изменчивости и отбора, которые обнаружили зависимость от степени приспособленности популяций (главы 1У, У, ЛШ). В целом, популяции опухолевых клеток отличаются более низкой приспособленностью, чем популяции нормальных клеток, однако разные популяции опухолевых клеток могут обладать разной степенью приспособленности. Их можно подразделить на популяции с повышенной, средней и низкой приспособленностью. Первые по соотношению изменчивости и отбора близки к популяциям нормальных клеток, находящимся в атипичных условиях, в том числе к популяциям соматических клеток *in vitro*; возможно, что для них также характерен стабилизирующий отбор (см. Захаров, 1970). В популяциях с низкой приспособленностью из-за высокой частоты изменчивости и сниженной интенсивности отбора не создается предпосылок ни для доминирования вариантов с максимальной селективной ценностью, ни для стабилизирующего отбора, и наследственная структура их крайне гетерогенна. Относительное постоянство наследственной структуры таких популяций (постоянство популяционных средних и дисперсий распределения вариантов) также поддерживается благодаря равновесию между давлением изменчивости и давлением отбора, но клетки с максимальной приспособленностью составляют незначительную по величине, гетерогенную и постоянно обновляющуюся фракцию. Поэтому их лишь условно можно назвать "клетками стволовой линии". Эти клетки не есть "норма" для популяции, и отбор в популяциях с низкой степенью приспособленности не является стабилизирующим. Неэффективность прогрессивного отбо-



ра обусловлена, главным образом, чрезмерно высокой наследственной изменчивостью, а также тем, что в ходе эволюции многоклеточных организмов выработаны механизмы, "запрещающие" изменения, накопление которых приводит к редукции избытка наследственной информации, дедетерминации, межклеточной метаплазии и пр. Эволюционный запрет на утрату клетками тканевой специфичности может быть основан на системе репрессированных клеточных леталей (Вахтин, 1966).

Из-за недостаточной эффективности отбора эволюция в популяциях опухолевых клеток по многим признакам носит ограниченный характер (Varski, 1961). Ограничена исследованная нами эпигенетическая эволюция опухолей скелетных мышц, основанная на изменениях типа внутритканевых трансдетерминаций, которая приводит к эпигенетически однородным полиморфноклеточным рабдомиосаркомам.

Высокая частота изменчивости в популяциях опухолевых клеток в сочетании с пониженной интенсивностью отбора создает предпосылки для неадаптивных изменений их наследственной структуры. Например, благодаря высокой кариотипической изменчивости и более частому возникновению клеток с увеличенным числом хромосом (по сравнению с гипоплоидными) гетероплоидия в популяциях опухолевых клеток может наступать и при селективных преимуществах нормального диплоидного карiotипа, т.е. в условиях стабилизирующего, а не прогрессивного отбора, причем клетки с диплоидным кариотипом могут быть полностью элиминированы из состава популяций несмотря на благоприятствующий им отбор. Естественно, что в этом случае изменение наследственной структуры не будет носить приспособительный характер. Неадаптивные сдвиги в наследственной структуре популяций следует ожидать и при резких изменениях среды, ведущих, как указывалось, к повышению частоты изменчивости и снижению интенсивности отбора.

При определенном сочетании изменчивости и отбора неадаптивные сдвиги в наследственной структуре популяции должны

приводить к ее вымиранию. Сказанное справедливо как для популяций опухолевых клеток, так и для популяций нормальных клеток. Очевидно, высокая частота изменчивости и относительно слабая интенсивность отбора, а не гипотетическая ограниченная способность к делению (Хайфлик, 1962-1972), являются причиной частой гибели популяций нормальных соматических клеток при попытках их длительного культивирования.

Проблема сохранения и изменения наследственной структуры популяций опухолевых клеток тесно связана с вопросом о рациональных подходах к химиотерапии злокачественных опухолей. В этом плане заслуживают внимания обнаруженные в последние годы эпигенетическая гетерогенность популяций опухолевых клеток и специфика их гетерогенности по темпам пролиферации клеток. Теоретически оправданными представляются поиски агентов, избирательно действующих на эпигенетически различные компоненты опухолей, и агентов, оказывающих преимущественное действие на фракцию клеток с максимальной селективной ценностью.

Наследственная гетерогенность и повышенная изменчивость обеспечивает популяциям опухолевых клеток лучшие возможности для приспособления к химиотерапевтическим агентам по сравнению с популяциями нормальных клеток, в том числе костномозговых. Отбор на резистентность эффективен, однако, и в популяциях нормальных клеток. Более того, особенности фенотипического проявления признаков дифференцировки позволяют утверждать, что путем отбора могут быть созданы клональные линии костномозговых клеток, совмещающие высокую резистентность к определенному канцеростатическому агенту (или нескольким агентам) и нормальную или почти нормальную способность к дифференцировке. Использование таких линий позволит применять более высокие дозы противоопухолевых препаратов и должно быть более эффективным, чем применяющееся введение аутологического или донорского костного мозга.

Благодаря изменчивости и отбору сложная наследственная структура популяций опухолевых клеток (и генотипическая, и эпигенетическая) может воспроизводиться в потомстве любой

отдельной клетки. Этой особенностью обладают не только опухолевые клетки, но и соматические клетки, не претерпевшие злокачественной трансформации — каждая клетка ткани, не утратившая способности к размножению обладает потенциями всей ткани в целом и путем деления может воспроизвести эту ткань. Поэтому ткань можно определить как эпигенетически однородную клеточную популяцию или систему эпигенетически различающихся клеточных популяций, способных к взаимопревращению. Отдельная клетка в случае эпигенетически гетерогенных тканей воспроизводит ткань не только непосредственно, путем размножения, но и опосредованно, благодаря способности к трансдетерминациям. Не исключено, что способность к внутритканевым трансдетерминациям является важным адаптивным свойством соматических клеток, сформировавшимся в ходе эволюции многоклеточного организма.

## В в о д н

1. Популяции соматических клеток должны быть отнесены к типу менделевских популяций, структура которых непосредственно определяется соотношением наследственной изменчивости и отбора. Они отличаются огромным избытком наследственной информации (информации, не реализуемой в фенотипе), способностью переносить многообразные эпигенетические изменения (наследуемые на клеточном уровне изменения генной активности) и высокой приспособленностью к существованию в системе многоклеточного организма. Эти отличительные особенности популяций соматических клеток есть результат эволюции многоклеточных организмов.

2. Полученные в результате малигнизации миобластов скелетных мышц крысы в однослойных культурах перевивные рабдомиосаркомы отличаются широким полиморфизмом клеточного состава. Наряду с рабдомиосаркомами, индуцированными у крыс и мышей химическими канцерогенами, они пригодны для проведения разнообразных исследований в области генетики опухолевых клеток, особенно для изучения эпигенетической изменчивости, наследования признаков на клеточном уровне и эпигенетической гетерогенности популяций опухолевых клеток.

3. Облучение миобластов крысы на начальных этапах культивирования не ускоряет процесс спонтанной малигнизации, что находится в противоречии с мутационной концепцией превращения нормальных клеток в злокачественные. Анализ собственных и литературных данных показывает, что каковы бы ни были причины малигнизации (мутации, эпигенетические изменения, опухолеродные вирусы), в результате ее не изменяются ни материальные основы наследственности у соматических клеток, ни свойственные им формы наследственной изменчивости. Таким образом, опухолевые и нормальные клетки формируют популяции одного и того же типа, различия между которыми следует искать в количественных проявлениях изменчивости и отбора.

4. Предложен и апробирован метод определения частоты геномных мутаций у соматических клеток, основанный на фотометри-

ческом определении ДНК в потомствах отдельных клеток. Частоты геномных мутаций в клонных популяциях HeLa *in vitro* и рабдомиосаркомы мышей *in vivo* характеризуются величинами порядка  $5-10 \cdot 10^{-2}$  на клетку на поколение. В клонных популяциях HeLa частота геномных мутаций повышается в 2-3 раза при ухудшении условий культивирования, и снижается в потомствах синхронно делящихся клеток. Повышенной частотой геномных мутаций отличаются абортивные клоны по сравнению с фертильными и высокоплоидные клетки. Популяции опухолевых клеток резко и наследственно гетерогенны по мутабельности, благодаря чему в них должен протекать отбор на изменение мутабельности. В целом, для популяций опухолевых клеток характерна высокая частота геномных мутаций, что препятствует стабильному воспроизведению кариотипа опухолевых клеток.

5. В популяциях HeLa *in vitro* и рабдомиосаркомы мыши *in vivo* клетки с увеличенным содержанием ДНК возникают в 2-3 раза чаще, чем клетки с уменьшенным содержанием ДНК. Высказывается предположение, что существенным источником геномных мутаций у опухолевых клеток является экстакопирование хромосом (полиплоидизация по отдельным хромосомам), обусловленное нарушениями их упорядоченной редупликации.

6. Предложен метод оценки интенсивности отбора в популяциях опухолевых клеток по константам экспоненциального роста образуемых ими клонов. Для популяций HeLa *in vitro* и рабдомиосаркомы мыши *in vivo* характерна высокая интенсивность отбора. При ухудшении условий (снижении степени приспособленности популяций) интенсивность отбора в популяциях опухолевых клеток уменьшается.

7. Одинаковой селективной ценностью часто обладают опухолевые клетки, резко отличающиеся кариотипически. Интенсивность отбора по числу хромосом значительно меньше общей интенсивности отбора. При ухудшении условий кариотипическая гетерогенность популяций опухолевых клеток повышается, что является прямым результатом изменившегося соотношения между мутационным давлением и давлением отбора.

8. Усовершенствован метод клонирования опухолевых клеток *in vivo*. Проведен клональный анализ перевивных рабдомиосарком крыс и мышей и изучено наследование ряда эпигенетически обусловленных признаков рабдомиосарком на клеточном уровне при клонировании и пассировании опухолей. Способность к миогенной дифференцировке и активность цистронов миозина наследуются в ряду клеточных поколений стабильно, и эпигенетической гетерогенности популяций по этим признакам не выявлено. Тип клеточных элементов воспроизводится не стабильно, и рабдомиосаркомы часто являются эпигенетически гетерогенными по этому признаку. Анализ имеющихся в литературе данных приводит к заключению, что эпигенетическая гетерогенность свойственна опухолям разного гистогенеза и наряду с генотипической гетерогенностью должна рассматриваться как важный компонент наследственной гетерогенности популяций опухолевых клеток в целом.

9. С помощью клонирования и реклонирования доказана способность клеточных элементов рабдомиосарком к взаимопревращениям, в том числе способность миогенных плеоморфных клеток превращаться в миогенные мезенхимоподобные клетки. Тем самым может считаться доказанным, что эпигенетически обусловленный полиморфизм клеточных популяций рабдомиосарком и опухолей иного гистогенеза не обязательно является следствием одновременной малигнизации эпигенетически различающихся клеток; он может возникать и в исходно гомогенных популяциях за счет эпигенетической изменчивости опухолевых клеток.

10. Определены частоты эпигенетических изменений клеточных элементов рабдомиосарком при клонировании и пассировании. Общая частота изменений закономерно убывает при переходе от дифференцирующихся клеточных элементов к недифференцирующимся. Плеоморфные клетки, являющиеся конечным этапом эпигенетической эволюции клеточных популяций рабдомиосарком, обладают наименьшей изменчивостью как при пассировании опухолей, так и в условиях клонирования.

11. Исследованиями эпигенетические изменения следует рассматривать как внутритканевые трансдетерминации. Они не приводят к выходу клеток рабдомиосарком за пределы потенциалов, свойственных нормальной мышечной ткани. Очевидно, типы внутритканевых трансдетерминаций обусловлены филогенетически, в ходе эволюции тканей многоклеточного организма. Методические подходы к количественному изучению отбора по эпигенетически обусловленным признакам в настоящее время неясны. По-видимому, их следует рассматривать как полигенные признаки с пороговым проявлением.

12. Изменчивость, наследственная структура и отбор в популяциях соматических клеток зависят от степени приспособленности популяций. Приспособленность популяций опухолевых клеток может варьировать в широких пределах, однако, в целом, им свойственна более низкая приспособленность по сравнению с клеточными популяциями, интегрированными в системе организма. Снижение приспособленности популяций опухолевых клеток приводит к повышению частоты наследственной изменчивости и снижению интенсивности отбора, что в свою очередь, ведет к усилению наследственной гетерогенности популяций. Благодаря этому для значительного процента опухолей концепция стволовой линии клеток Макинно-Левана не может быть справедливой. Сочетание сильного мутационного давления и относительно слабого отбора, открывающее дорогу неадаптивным изменениям наследственной структуры, должно рассматриваться как характерное для популяций опухолевых клеток.

Основные материалы диссертации изложены в следующих работах:

1. Action of x-ray on transformation of normal cells into malignant *in vitro*. Proc. XI Int. Congress of Genetics, Hague, 1, 390, 1963.

2. Облучение однослойных культур крысиных фибробластов. I. Повторное воздействие малыми дозами ионизирующей радиации (совместно с Т.Н.Агнатовой, А.М.Суриковым, Т.Н.Цикаришвили). Сб. "Цитология злокачественного роста", М.-Л., 92-100, 1963.

3. Облучение однослойных культур крысиных фибробластов. II. Однократное воздействие большими дозами ионизирующей радиации (совместно с Т.Н.Агнатовой, А.М.Суриковым, Т.Н.Цикаришвили). Сб. "Цитология злокачественного роста", М.-Л., 101-108, 1963.

4. Генетика соматических клеток. Цитология, 6, 4, 537-552, 1964.

5. Действие РНК из нормальных тканей на рост перивисцеральных опухолей (совместно с Н.Н.Аксеновой, В.А.Воробьевым, Н.Ф.Григорьевой, Л.А.Слепцовой, В.Я.Фелем, Т.Н.Цикаришвили, Ю.М.Оленовым). Цитология, 6, 4, 499-501, 1964.

6. Полиморфизм опухолей, полученных от малигнизированных *in vitro* клеток крысы (совместно с А.Н.Швембергер). Цитология, 6, 5, 596-597, 1964.

7. Интенсивность отбора и частота резких кариотипических изменений в популяциях соматических клеток при клонировании (совместно с Т.Н.Агнатовой, А.А.Фридлянской, А.Н.Швембергер). Цитология, 7, 2, 258-259, 1965.

8. Изменение состава популяций опухолевых клеток при клонировании (совместно с Т.Н.Агнатовой, А.А.Фридлянской, А.Н.Швембергер). Цитология, 7, 3, 393-400, 1965.

9. Гистологический анализ рабдомиосарком крыс, полученных при имплантации малигнизированных *in vitro* клеток (совместно с А.Н.Швембергер). Архив патологии, 27,



8, 49-55, 1965.

10. Effect of ribonuclease on anti-tumor activity of ribonucleic acid from normal tissue (совместно с Н.Н.Аксеновой, В.И.Воробьевым, Ю.М.Оленовым). Nature, 207, 4992, 40-42, 1965.

11. О действии рибонуклеазы на противоопухолевую активность препаратов РНК из нормальных тканей (совместно с Н.Н.Аксеновой, Л.А.Слепцовой, В.И.Воробьевым, Ю.М.Оленовым). Цитология, 7, 1, 94-96, 1965.

12. Permanent inheritance of the epigenetic character in a sequence of cell generations and its hypothetic mechanism. In: Genetic variation in somatic cells, Prague, 189-194, 1966.

13. Сохранение способности к дифференцировке при малигнизации клеток крысы *in vitro* (совместно с А.Н.Швембергер). Сб. "Клеточная наследственность и злокачественный рост", М.-Л., 80-93, 1966.

14. Каринологическое исследование рабдомиосарком крыс разной степени дифференцированности (совместно с Т.Н.Игнатовой, Т.В.Борхсениус, И.Н.Швембергер). Сб. "Клеточная наследственность и злокачественный рост", М.-Л., 94-105, 1966.

15. Цитологическая изменчивость перививных рабдомиосарком крыс под действием рентгеновских лучей (совместно с А.Н.Швембергер). Сб. "Клеточная наследственность и злокачественный рост", М.-Л., 106-112, 1966.

16. О гетероантигенах миогенных опухолей крыс (совместно с В.Я.Фелем, В.А.Ивановым, Ю.М.Оленовым). Докл. АН СССР, 168, 2, 451-453, 1966.

17. К иммунологической характеристике миогенных опухолей крыс (совместно с В.Я.Фелем, В.А.Ивановым, И.Н.Швембергер). Сб. "Клеточная наследственность и злокачественный рост", М.-Л., 113-122, 1966.

18. Характеристика гетероантигенов экспериментальных опухолей крыс (совместно с В.Я.Фелем, В.А.Ивановым, Т.Н.Цикаришвили, И.Н.Швембергер, Ю.М.Оленовым). Сб. "Клеточная наследственность и злокачественный рост", М.-Л., 146-153, 1966.

19. Фотометрическое изучение клонов HeLa полученных при высокой эффективности клонирования (совместно с Т.В.Борхсениус). Цитология, 8, с, 291-298, 1967.
20. Метаплазия как проблема генетики соматических клеток. Архив анат., гистол. и эмбриол., 10, 105-111, 1968.
21. Karyotypic variations and temps of selection in populations of HeLa cells at cloning (совместно с Т.В.Борхсениус). Proc. XII Int. Congress of Genetics, Tokyo 1, 158, 1968.
22. Эволюция клеточных популяций рабдомиосарком крысы. 1. Клеточные элементы (совместно с И.Н.Швембергер). Цитология, 10, 5, 604-616, 1968.
23. Эволюция клеточных популяций рабдомиосарком крысы. II. Изменчивость при длительном пассировании (совместно с И.Н.Швембергер). Цитология, 10, 5, 617-635, 1968.
24. Цитология и генетика рабдомиосарком (совместно с И.Н.Швембергер). Изд. "Наука", 20 печ. лист., М.-М., 1968.
25. Штамм полиморфноклеточной рабдомиосаркомы крысы РС-5 (совместно с И.Н.Швембергер). Вопр. онкол., 15, 6, 106-107, 1969.
26. Изменчивость и отбор в клоновых популяциях HeLa. 1. Интенсивность отбора (совместно с Т.В.Борхсениус). Цитология, 11, 9, 1137-1147, 1969.
27. Изменчивость и отбор в клоновых популяциях HeLa. II. Кармотипическая гетерогенность клоновых популяций (совместно с Т.В.Борхсениус). Цитология, 11, 10, 1313-1322, 1969.
28. Изучение эпигенетической изменчивости соматических клеток методом клонирования in vivo (совместно с И.Н.Швембергер). Сб. "Метаплазия тканей", М., 107-130. 1970.
29. Получение перевиваемых клоновых линий опухолей крыс (совместно с А.Г.Авашевич). Вопр. онкол., 16, 3, 78-84, 1970.
30. Evolution of rhabdomyosarcoma cell populations (совместно с Т.В.Борхсениус, А.Г.Авашевич, И.Н.Швембергер). Proc. 4 Int. Cancer Congress, Houston, 358, 1970.

31. Генетика соматических клеток и метастазирование. В кн. "Метастазирование злокачественных опухолей" (ред. И.В. Лазарев и И.Ф.Трех). М., 164-179, 1971.
32. Цитологическое исследование опухолей скелетных мышц мышцей (совместно с Т.В. Борхсениус, Л.Г. Ивашкевич, И.Н. Швембергер). Цитология, 13, 2, 260-264, 1971.
33. Дифференцировка рабдомиосарком мышцей в процессе пассирования (совместно с Л.Г. Ивашкевич, И.Н. Швембергер). Цитология, 13, 3, 374-381.
34. Цитодифференцировка в первичных опухолях скелетных мышц мышцей (совместно с Л.Г. Ивашкевич, И.Н. Швембергер). Цитология, 13, 5, 656-659, 1971.
35. Определение частоты геномных мутаций в соматических клетках. Тез. докл. II съезда ВОГИС, М., 1, 57, 1972.
36. Отбор в популяциях опухолевых клеток. Тез. докл. II съезда ВОГИС, М., 1, 129-130, 1972.
37. Клетка и ткань. К вопросу о биологических основах патологической морфологии (совместно с И.Н. Швембергер). Архив патологии, 34, 1, 61-65, 1972.
38. Эволюция клеточных популяций рабдомиосарком крысы. III. Клональный анализ полиморфноклеточной рабдомиосаркомы (совместно с И.Н. Швембергер). Цитология, 14, 1, 104-112, 1972.
39. Изменчивость и отбор в клоновых популяциях HeLa. III. Частота геномных мутаций (совместно с Т.В. Борхсениус). Цитология, 14, 1, 97-103, 1972.
40. Сохранение активности генов миозина в клетках перенесенных рабдомиосарком (совместно с В.В. Матвеевым, Т.В. Борхсениус, И.Н. Швембергер, Г.П. Цинаевым). Об.: "Научн. конф. Инст. цитологии АН СССР", Л., 60-61, 1972.
41. Частота геномных мутаций опухолевых клеток при клонировании *in vivo* (совместно с Т.В. Борхсениус). Докл. АН СССР, 204, 5, 1240-1242, 1972.
42. Анализ клонообразования *in vivo* с помощью эпигенетических маркеров (совместно с Л.Г. Ивашкевич, И.Н. Швембергер). Цитология, 14, 7, 884-889, 1972.

43. Содержание ДНК в клетках экспериментальных метастазов перевивной рабдомиосаркомы мыши (совместно с Т.В.Борхсениус, И.Н.Швембергер). Цитология, 14, 7, 911-915, 1972.

44. Эпигенетическая изменчивость в клеточных популяциях рабдомиосарком мыши (совместно с Л.Г.Ивашкевич, И.Н.Швембергер). Цитология, 14, 8, 1015-1022, 1972.

45. Изменчивость и отбор в клоновых популяциях рабдомиосарком мышей *in vivo*. 1. Частота геномных мутаций (совместно с Т.В.Борхсениус, И.Н.Швембергер). Цитология, 14, 9, 1178-1183, 1972.

46. Изменчивость клеточных элементов миогенных и соединительнотканых опухолей крыс (совместно с И.Н.Швембергер). Цитология, 14, 11, 1405-1413, 1972.

Материалы диссертации доложены на:

Всесоюзном симпозиуме по цитохимии и гистохимии опухолей (Тбилиси, 1964), Всесоюзном симпозиуме по медицинской генетике (Ленинград, 1964), Международном симпозиуме по генетической изменчивости соматических клеток (Прага, 1965), Научной конференции, посвященной памяти А.А.Заварзина (Ленинград, 1965), Всесоюзном совещании по эволюционной генетике и генетике популяций (Ленинград, 1966), Симпозиуме по детерминации и метаплазии тканей (Ивано-Франковск, 1967), Симпозиуме по метаплазии тканей (Москва, 1968), Симпозиуме по культуре клеток Научного совета по проблемам цитологии АН СССР (Ленинград, 1969), III генетической школе ВОГИС (Рига-Елгава, 1970), II Всесоюзном совещании по полиплоидии (Бреван, 1971), II Съезде Всесоюзного общества генетиков и селекционеров (Москва, 1972), Расширенном заседании Проблемной комиссии по биологии и биохимии опухолевой клетки (Ленинград, 1972), II школе по биологии развития (Москва, 1972), II Всесоюзном съезде онкологов (Таллин, 1972), Научных конференциях Института цитологии АН СССР (1967, 1969, 1972), заседании Ленинградского отделения ВОГИС (1971), Научных семинарах в Институте молекулярной биологии АН СССР (Москва, 1971) и Институте атомной энергии им. Курчатова (Москва, 1972).