

На правах рукописи

БОРХСЕНИУС

ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

ИЗУЧЕНИЕ КАРИОТИПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ
ПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ
КЛОНИРОВАНИИ IN VITRO И IN VIVO

03.00.17 - Цитология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ленинград 1973



БОРХСЕНИУС

ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

ИЗУЧЕНИЕ КАРИОТИПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ
ПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ
КЛОНИРОВАНИИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

03.00.17 - Цитология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ленинград

1973

Работа выполнена в Лаборатории генетики опухолевых клеток Института цитологии АН СССР (директор - член-корреспондент АН СССР А.С.Трошин).

Диссертация изложена на 141 стр. машинописного текста с 7 таблицами и 30 рисунками в тексте. Список литературы включает 188 названий.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Ю.Б.Вахтин

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
Л.З.Певзнер,
кандидат биологических наук
Ю.Л.Горощенко.

Оппонирующая организация - Институт экспериментальной
медицины АМН СССР.

Автореферат разослан " 27 " апрель 1973 г.

Защита состоится " 8 " июня 1973 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

Каротилическая гетерогенность популяций опухолевых клеток является одним из важнейших показателей их общей наследственной гетерогенности.

Изучение каротилической структуры популяций опухолевых клеток и ее изменений имеет большое значение для анализа проблем эволюции клеточных популяций, их адаптации, для выяснения механизмов метастазирования злокачественных опухолей и ответа популяций опухолевых клеток на действие противоопухолевых агентов.

Каротилическая гетерогенность популяций опухолевых клеток исследуется разными методами, ведущим из которых является метод тонкого анализа числа и морфологии хромосом. Использование этого метода, как известно, позволило вскрыть важные закономерности каротилической эволюции клеточных популяций.

Вместе с тем, за последние годы при изучении популяций опухолевых клеток все большее применение находит метод фотометрического определения содержания ДНК. Уступая методу кариологического анализа в точности индивидуального измерения, этот метод во многих случаях позволяет обнаружить такие сдвиги в структуре популяций, которые крайне трудно определить цитогенетически.

Особенно перспективным представляется определение содержания ДНК в сочетании с клональным анализом популяций опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

В задачу настоящего исследования входило изучение каротилической структуры популяций опухолевых клеток при клонировании *in vitro* и *in vivo* и при метастазировании. Полученные данные послужили материалом для выявления закономерностей изменчивости и отбора в популяциях опухолевых клеток при этих процессах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В опытах *in vitro* материалом исследования служили клетки линии HeLa (аденокарцинома шейки матки человека). Клетки культивировали по общепринятой методике, на среде I99 с добавлением 20% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота.

По клонированию клеток HeLa было поставлено 2 серии опытов: в I-й серии варьировали густоту посева клеток при клонировании, во II-й - изменением культуральной среды путем добавления NaCl достигали разной приспособленности клоновых популяций. Клонировали клетки по методу Пака и др. (Puck et al., 1956) с некоторыми изменениями (без применения клеток-кормилок). Клоны, выросшие на покровных стеклах, на 10, 15 и 23 сутки для I серии опытов и на 6 и 12 сутки для II серии опытов после начала клонирования фиксировали ацетоалкоголем (1:3) в течение 1 часа. Исходную массовую культуру HeLa фиксировали на 2 сутки после пересева (I серия опытов) и на 6 сутки после пересева (II серия опытов). Препараты окрашивали по Фельгену.

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 плоидности использовали лейкоциты периферической крови человека. Контрольные препараты окрашивали одновременно с опытными препаратами. Измерения содержания ДНК в ядрах проводили в отдельных хорошо разграниченных клонах. Всего фотометрически исследовали в I серии опытов 68 клонов (525 клеток), 100 клеток лейкоцитов и 100 клеток массовой культуры; во II серии опытов исследовали 293 клон (2111 клеток), 101 клетку массовой культуры и 101 клетку лейкоцитов.

Для опытов *in vivo* была взята клоная линия полиморфноклеточной рабдомиосаркомы мыши (Ивашкевич и Вахтин, 1970).

Число хромосом для опухоли XIX генерации подсчитывали на метафазных пластинках (давленные препараты). Анализ структуры кариотипа не проводили.

Клонировали 4 опухоли полиморфноклеточной рабдомио-саркомы А-7 XX и XXI генераций. Мышам линии СС57 W вводили в хвостовую вену по 150-300 тыс. клеток. Легкие с опухолевыми узлами (клонами) и метастазы в различные органы извлекали на 21-26-е сутки.

В нашей работе по ряду причин (недостаточно рыхлая опухолевая ткань, малое количество материала и др.) мы не смогли применить общепринятую для фотометрии методику мазков. Вместо этого мы использовали методику давленных препаратов, часто употребляемую при работе с растительными объектами, а также применяемую в тех случаях, когда невозможно работать с мазками или отпечатками ткани (Зыбина, 1963; Зыбина и Мосьян, 1967).

Относительное содержание ДНК в интерфазных ядрах определяли на цитоспектрофотометре (см. выше, опыты *in vitro*). Содержание ДНК на гаплоидный набор (1 с) определяли путем фотометрирования ядер сперматид мышей линии СС57 W. В каждом клоне измеряли по 20-32 клетки. Всего исследовано 70 клонов от четырех опухолей (1904 клетки) и 15 метастазов в различные органы.

Для оценки интенсивности отбора в популяциях *in vitro* и *in vivo* использовали дисперсии, коэффициенты вариации и размах изменчивости по константам экспоненциального роста клонов. Скорость вытеснения одних клеточных вариантов другими вычисляли по Рейну (Rayn, 1963).

Расчет частоты геномных мутаций. В потомстве клетки с любым числом хромосом (диплоидным, анеуплоидным или полиплоидным) максимальное содержание ДНК в интерфазных ядрах (c_{max}) не должно превосходить минимальное (c_{min}) более, чем в 2 раза. $c_{max} / c_{min} > 2$ может наблюдаться только в клонах, в которых в ходе клеточного размножения произошли кратные или некратные изменения в числе хромосом, т.е. в клонах с геномными мутантами. Так как по первоначальным данным точность определения ДНК составляла $\pm 5\%$, немутантными клонами мы считали клоны, в пределах которых

$$\frac{0.95 c_{max}}{1.05 c_{min}} \leq 2,$$

а мутантными - клоны, в пределах которых

$$\frac{0.95 c_{\max}}{1.05 c_{\min}} > 2.$$

Частота геномных мутаций определялась по формуле

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

(см. Захаров и Квитко, 1967, стр. 101), где N_0 - общее число исследованных клонов; N_m - число "мутантных клонов"; n - число исследованных ядер.

В результате геномных мутаций (хромосомные при описанном методе не регистрировались из-за высокой ошибки единичного определения содержания ДНК) в клоне могут возникать как клетки с увеличенным, так и клетки с уменьшенным числом хромосом по сравнению с числом хромосом клетки-родоначальницы клона. Содержание ДНК в клетке-родоначальнице клона не может быть определено непосредственно, но его можно оценить по среднему содержанию ДНК в клетках клона (c_m). Исходя из этого, при $c_m - c_{\min} > c_m - c_{\max}$ мы относили мутантные клоны к категории "типоплоидных", а при $c_m - c_{\min} < c_m - c_{\max}$ к категории "гиперплоидных".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кариотипическая гетерогенность клоновых популяций

В исследованных клоновых популяциях HeLa *in vitro* и рабдомиосаркомы *in vivo* наблюдается сдвиг содержания ДНК в интерфазных ядрах в сторону повышенной пloidности (см. табл. 1 и 2).

Достоверное различие между отдельными клоновыми популяциями по средней пloidности клеток показывает, что изменения состава клеточных популяций при клонировании зависят не только от самого процесса клонирования, но и от действия ряда неизвестных факторов. Для клоновых популяций *in vitro* при снижении эффективности клонирования наблюдается повышение средней пloidности клеток. Средняя пloidность клеток обнаруживала подобную же зависимость от сред-

Таблица I. Карิโอтипическая гетерогенность клоновых популяций *NeLa*

Число высеянных клеток и культуральная среда	Сутки после посева	Число клеток	Плоидность клеток		Число клонов	Плоидность клонов	
			размах варьирования	M ± m		размах варьирования	M ± m
10.000							
Обычная	6	194	1.9-10.6	3.5±0.093	31	2.0-5.5	3.42±0.21
То же	12	293	1.1-9.9	4.2±0.085	30	1.6-7.0	4.11±0.22
С удвоенным к-вом NaCl	6	133	2.5-12.3	5.6±0.18	30	3.3-10.6	5.91±0.40
То же	12	259	1.1-10.2	3.8±0.19	30	2.1-6.7	3.67±0.22
С утроенным к-вом NaCl	12	227	2.1-23.8	5.0±0.28	30	3.0-10.1	5.03±0.36
5.000							
Обычная	6	172	1.9-11.6	4.2±0.15	29	2.4-8.7	4.56±0.36
То же	12	277	1.9-14.1	4.1±0.089	30	2.9-8.1	4.02±0.21
С удвоенным к-вом NaCl	6	137	2.2-17.1	5.2±0.24	30	2.4-13.8	5.61±0.52
То же	12	297	1.3-15.2	4.9±0.13	30	2.9-9.6	4.88±0.34
С утроенным к-вом NaCl	6	122	1.9-13.1	4.5±0.22	23	2.5-7.9	4.46±0.33

них констант экспоненциального роста в клоновых популяциях.

В опытах *in vivo* наиболее резко выраженные различия клонов по гетерогенности входящих в их состав клеток оказались статистически достоверными. Например, в варианте 386 критерий Фишера при сравнении дисперсий наименее гетерогенных клонов с дисперсиями наиболее гетерогенных, равнялся 19.51 ($p < 0.01$). Кариотипическая гетерогенность клонов (оцененная по коэффициенту вариации) оказалась связанной только со средним содержанием ДНК в клетках клонов ($r = + 0.28$; $p < 0.05$).

Как показывают данные таблицы I, вариабельность плоидности клеток в клоновых популяциях *in vitro* была, как правило, выше, чем вариабельность средней плоидности клонов. Это различие отразилось на всех показателях кариотипической гетерогенности популяции: повысился размах изменчивости по степени плоидности, увеличилась дисперсия, возрос коэффициент варьирования. Следует отметить, что дисперсия по плоидности в клоновых популяциях несколько снижалась при повышении эффективности клонирования или при повышении констант экспоненциального роста клоновых популяций.

В опытах с рабдомиосаркомой мыши *in vivo* сильнее всего кариотипическая гетерогенность повысилась в клоновых популяциях, полученных от опухолей 386 и 392, в которых одновременно была повышена и средняя плоидность клеток - в этих клоновых популяциях размах изменчивости клеток по содержанию ДНК увеличился в 1.5 - 2 раза, по сравнению с популяциями клонируемых опухолей. Распределения клеток в клоновых популяциях по содержанию ДНК достоверно отличались (по критерию λ - Колмогорова, Урбах, 1964) от распределений клеток в клонируемых опухолях ($p < 0.01$).

Повышение средней плоидности клеток и клонов HeLa и усиление размаха кариотипической вариабельности можно связать, в ряде случаев, с изменением степени благоприятности среды, хорошими показателями чего являются эффективность клонирования и средняя скорость роста клонов в попу-

Таблица 2. Содержание ДНК (в единицах плоидности) в интерфазных ядрах клеток подкожно растущей рабдомиосаркомы мыши и полученных от нее *in vivo* клонов.

№ опыта	Объект исследования	Число изученных клеток и клонов	Плоидность клеток и клонов (в с)		
			Lim	$M \pm m$	σ^2
I	клетки опухоли 386	103	1.7-7.8	3.4 ± 0.12	1.4
	клоны	13	2.9-5.8	4.1 ± 0.30	1.2
	клетки клонов	348	1.3-10.7	4.2 ± 0.11	4.3
II	клетки опухоли 387	93	1.4-6.0	2.6 ± 0.09	0.7
	клоны	9	2.4-3.3	2.9 ± 0.11	0.1
	клетки клонов	246	1.5-7.5	2.9 ± 0.06	0.9
III	клетки опухоли 392	82	1.3-4.4	2.5 ± 0.08	0.5
	клоны	15	2.1-4.0	3.1 ± 0.15	0.6
	клетки клонов	408	1.2-9.3	3.1 ± 0.06	1.5
IV	клетки опухоли 398	79	1.2-5.8	2.4 ± 0.10	0.9
	клоны	33	2.1-6.2	2.7 ± 0.13	0.7
	клетки клонов	902	1.0-9.9	2.7 ± 0.05	1.2
II-IV	клетки опухолей	254	1.2-6.0	2.5 ± 0.02	0.7
	клоны	57	2.1-6.2	2.9 ± 0.09	0.5
	клетки клонов	1556	1.0-9.9	2.8 ± 0.03	1.2

пуляции. В опытах *in vitro* добавление NaCl в среду приводило к снижению эффективности клонирования, к повышению средней ploидности клонов и к повышению размаха изменчивости в клоновых популяциях (табл. I).

Частота геномных мутаций

Уже в первой разведочной серии опытов *in vitro* частота геномных мутаций оказалась очень высокой - в среднем 8.3×10^{-2} на клетку на поколение. Последующие опыты с клетками HeLa *in vitro* показали, что частота геномных мутаций может варьировать в популяциях в широких пределах - от 3.2×10^{-2} (в контрольных вариантах) до 16.7×10^{-2} (в вариантах с утроенным содержанием NaCl в среде). Средняя частота геномных мутаций в этой серии опытов была равна 9.4×10^{-2} на клетку на поколение.

Опыты *in vivo* с перевивной рабдомиосаркомой мыши также характеризуются высокими частотами геномных мутаций. Во всей совокупности из 70 клонов в повторностях были получены примерно одинаковые частоты геномных мутаций ($10.3 - 12.2 \times 10^{-2}$ на клетку на поколение), не отличающиеся достоверно от средней их частоты, вычисленной для всех опытов и повторностей (10.9×10^{-2}).

По нашим данным как в условиях *in vivo* так и в условиях *in vitro* число изученных клеток не оказывает существенного влияния на определение частоты геномных мутаций.

Во всех опытах гиперploидные мутанты (с увеличенным содержанием ДНК) возникали чаще, чем гипопloидные (с уменьшенным содержанием ДНК). Для популяций HeLa наблюдалось 3-х кратное преобладание гиперploидных мутантов. В опытах с рабдомиосаркомой гипопloидные мутанты были зарегистрированы в 29 случаях, а гиперploидные в 58, т.е. в 2 раза чаще.

Получение сходных результатов при изучении клонов HeLa *in vitro* и клонов перевивной рабдомиосаркомы мыши *in vivo* вряд ли может быть случайным. Скорее всего,

отмеченные особенности процесса мутирования вообще характерны для возникновения клеток с измененными числами хромосомом - как опухолевых, так и нормальных.

Отбор в клоновых популяциях

В данной работе для определения интенсивности отбора была использована формула Рейна (Rayn, 1963). Приспособленность клеточных вариантов может быть оценена по константам экспоненциального роста формируемых ими клонов.

В I серии опытов *in vitro* в логарифмически растущей популяции для изменения соотношения хорошо и плохо приспособленных вариантов в 10 раз достаточно 5.5 - 6 суток. Такая интенсивность отбора кажется очень высокой. Темп размножения клеток в клонах не зависел от числа клонируемых клеток.

Характеристика клоновых популяций II серии опытов дана в табл. 3. Как показывают приведенные в ней данные, эффективность клонирования, средняя скорость размножения клеток в популяции и размах изменчивости клонов по числу клеток были неодинаковыми в разных опытах.

Эффективность клонирования резко снижалась при повышении тоничности питательной среды. Одновременно с этим, как и следовало ожидать, наблюдалось сильное торможение средней скорости размножения клеток. Во всех без исключения случаях эффективность клонирования, определенная на 12-е сутки, оказалась значительно меньше, чем на 6-е из-за присутствия в популяциях на 6-е сутки абортивных клонов (Puck et al., 1956). В исследованных клоновых популяциях

HeLa соотношение между крайними по скорости размножения вариантами на нормальной среде изменялось в 10 раз за 4-5 суток, а при ухудшении условий культивирования (добавление NaCl в среду) - за 20 - 30 суток.

По селективной ценности клетки - родоначальницы клонов не варьируют от нуля до некоторой максимальной величины (в наших опытах эта величина равна ~ 0.34), все клетки с константами экспоненциального роста от нуля до какого-

Таблица 3. Характеристика популяций $HeLa$ на 6-е и 12-е сутки после начала клонирования

Число высеванных клеток и культуральная среда	Сутки после посева	Эффективность клонирования (в %)	Число изученных клонов	Константы экспоненциального роста клонов		σ	ν (в %)
				средние	пределы		
10.000							
Обычная	6	68.7	884	0.35 ± 0.0043	0-0.65	0.0167	36.5
То же	12	50.0	130	0.50 ± 0.0089	0.16-0.69	0.0104	20.4
С удвоенным к-вом $NaCl$	6	34.4	834	0.27 ± 0.0037	0-0.58	0.0114	38.9
То же	12	17.1	201	0.38 ± 0.0055	0.12-0.58	0.0060	20.2
С утроенным к-вом $NaCl$	12	13.3	631	0.19 ± 0.0034	0-0.41	0.0072	44.0
5.000							
Обычная	6	74.0	600	0.32 ± 0.0061	0-0.84	0.0222	46.1
То же	12	52.0	179	0.50 ± 0.0066	0.21-0.69	0.0078	17.8
С удвоенным к-вом $NaCl$	6	56.4	419	0.26 ± 0.0046	0-0.61	0.0091	36.3
То же	12	18.5	200	0.32 ± 0.0065	0.06-0.52	0.0085	29.1
С утроенным к-вом $NaCl$	6	1.5	53	0.25 ± 0.020	0-0.56	0.0219	59.1

то определенного значения, практически обладают нулевой селективной ценностью и не принимают участия в формировании клеточной популяции. Их элиминация из состава популяции происходит не благодаря отбору, а осуществляется автоматически. По-видимому, вымирание абортивных клонов является одной из причин того, что изменчивость популяций по константам экспоненциального роста (оцениваемая по дисперсии и коэффициенту варьирования) резко уменьшается к 12-м суткам культивирования (табл. 3).

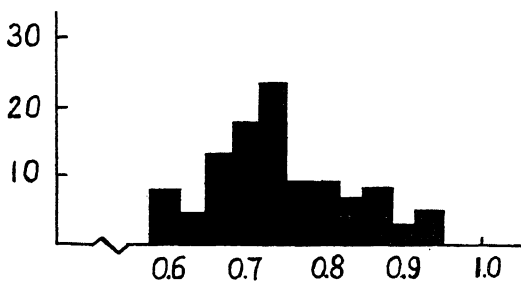


Рис. 1. Распределение 70 клонов рабдомиосаркомы мыши по константам экспоненциального роста.

По горизонтали - константы экспоненциального роста; по вертикали - число клонов (в %).

Распределение клонов рабдомиосаркомы *in vivo* по константам экспоненциального роста приведено на рис. 1. Как видно из этого рисунка, модальное значение сдвинуто несколько влево, в сторону более низких скоростей роста. В популяции полностью отсутствуют, так называемые, абортивные клоны, для которых в условиях *in vitro* характерны константы экспоненциального роста порядка 0.3 - 0.4 и менее. По-видимому, клетки - родоначальницы клонов с кон-

стантами экспоненциального роста от 0 до 0.5-0.6, т.е. клетки с генерационным временем больше 33 часов в описываемых опытах погибали или давали начало абортивным клонам, погибшим к 20-26 дню после клонирования.

Различия клонов по константам экспоненциального роста определяют динамику вытеснения клеток медленно растущих клонов клетками быстро растущих клонов из состава популяции, т.е. характеризуют интенсивность отбора в популяции. Как видно, в исследованных клоновых популяциях рабдомиосаркомы *in vivo* соотношение между крайними по скорости размножения вариантами изменялось в 10 раз за 7-16 суток, и интенсивность отбора по этому показателю приближалась к интенсивности отбора в популяциях HeLa *in vitro* выращенных на нормальной питательной среде.

Отсутствие в клоновых популяциях рабдомиосаркомы абортивных клонов позволяет вычислить интенсивность отбора в них по формуле, аналогичной формуле, предложенной Холдейном для определения интенсивности отбора в популяциях многоклеточных организмов (Haldane, 1954) как разность между логарифмами средней приспособленности популяции и приспособленности варианта с максимальной селективной ценностью. В нашем случае - по разности средних для клоновых популяций констант экспоненциального роста и максимальных констант. В остальных клоновых популяциях интенсивность отбора варьировала в пределах 0.09-0.18, что соответствует 10-кратному изменению соотношения клеток в пользу максимального приспособленного варианта за 13 - 34 суток.

М е т а с т а з ы

Среднее содержание ДНК в клетках исходной опухоли в опыте с метастазами было равно 2.9 с.

Среднее содержание ДНК в метастазах, локализованных в печени, колебалось от 2.7 до 3.1 с. Морфологически метастазы представляли собой полиморфноклеточные рабдомиосаркомы со слабым поли-анизоморфизмом клеток и сильно выраженной способностью к ориентированному росту.

Среднее содержание ДНК в метастазах в лимфоузлах колебалось от 2.3 до 3.0 с. Эти метастазы также являлись полиморфноклеточными рабдомиосаркомами; три из них обладали сильным полианизоморфизмом клеточных элементов и слабо выраженной способностью к ориентированному росту, один — слабым полианизоморфизмом и слабым ориентированным ростом и один — сильным полианизоморфизмом и сильно выраженным ориентированным ростом.

Среднее содержание ДНК в клетках метастазов в кишечник, почку, плевру, под кожу, колебалось от 1.9 до 3.4 с. Как и в предыдущих случаях, все метастазы являлись полиморфноклеточными рабдомиосаркомами с варьирующим полианизоморфизмом клеток и с варьирующей степенью выраженности ориентированного роста.

В некоторых метастазах встречались участки некроза, пикнотичные ядра, полиплоидные ядра, содержащие 2-3 ядрышка, гнезда гигантских многоядерных клеток. Метастазы в лимфоузлы, плевру и подкожные часто прорастают прилежащие мышцы. Связи между морфологическими особенностями метастазов и средним содержанием ДНК в их клетках обнаружено не было. Распределения клеток метастазов по содержанию ДНК отличались от нормального. Коэффициенты вариации содержания ДНК в клетках метастазов колебались от 16 до 44%, в клетках исходной опухоли коэффициент вариации был равен — 32 %. В целом, по карiotипической гетерогенности исследованные метастазы не уступали клеточной популяции исходной опухоли, что, по-видимому, обусловлено высокой частотой карiotипической изменчивости опухолевых клеток.

- - - - -

Полученные нами данные, также как и данные ряда авторов, показывают, что карiotипическая изменчивость в популяции опухолевых клеток при клонировании и метастазировании представляет собой широко распространенное явление.

Вместе с тем, изменение кариотипической структуры популяций не является обязательным - в некоторых опытах, как при клонировании, так и при метастазировании, не наблюдаются ни усиления размаха изменчивости опухолевых клеток по содержанию ДНК (по числу хромосом), ни изменений модальных классов. Не всегда происходит, в частности, и сдвиг популяций в полиплоидную сторону.

Подобный неоднозначный ответ популяций на изменение условий (клонирование и метастазирование опухолевых клеток) связан, очевидно, с множественностью факторов, влияющих на структуру популяций.

Следует отметить, что и клонирование, и метастазирование может сопровождаться отбором клеток с разными кариотипами. За счет этого, очевидно, и наблюдаются в некоторых экспериментах более или менее резкие сдвиги клоновых популяций и клеток метастазов в полиплоидную сторону. Скорее всего такого рода изменения обусловлены повышенной устойчивостью полиплоидных клеток к действию неблагоприятных факторов. Вместе с тем, как показали наши опыты, указанный источник изменчивости при клонировании не является единственным.

Темп деления клеток в разных клонах резко и наследственно различается и, в частности, клоны с высокой средней плоидностью клеток, как правило, обладают более низкими темпами размножения. За счет этого кариотипический состав популяций должен сдвигаться в сторону пониженной плоидности. Очевидно, при обнаруженной нами высокой интенсивности отбора дифференциальное размножение клеток с различными кариотипами, в целом, должно оказывать большее влияние на кариотипическую структуру, чем изменения, связанные с неодинаковой выживаемостью клеток - родоначальниц клонов и метастазов.

Сильное влияние на кариотипическую структуру популяций опухолевых клеток может оказывать изменчивость опухо-

левых клеток по числу хромосом. Как показали наши опыты, частота геномных мутаций *in vitro* и *in vivo* может достигать величины порядка $10 - 20 \times 10^{-2}$ на клетку на поколение. При таких высоких частотах изменчивости должна быстро нарастать гетерогенность популяций опухолевых клеток, что и наблюдается во многих случаях при клонировании и метастазировании опухолей.

Следует подчеркнуть, что по нашим данным, изменчивость опухолевых клеток носит асимметричный характер, и клетки гиперплоидные (клетки с увеличенным числом хромосом) возникают в 2-3 раза чаще, чем гипоплоидные клетки (клетки с уменьшенным числом хромосом). Каковы бы ни были причины подобной асимметрии, по-видимому, она может приводить, в ряде случаев, к сдвигу кариотипической структуры популяций в сторону повышенной ploидности. Таким образом, повышенная ploидность популяций клонов и метастазов может обуславливаться не только отбором, но и самим характером кариотипической изменчивости.

Заслуживает интерес обнаруженная нами связь кариотипической структуры популяций опухолевых клеток, интенсивности отбора и частоты геномных мутаций в опухолевых клетках с ухудшением условий, в которых пролиферируют опухолевые клетки. В благоприятных условиях, очевидно, решающее влияние на кариотипическую структуру должны оказывать селективные процессы; в неблагоприятных условиях (в связи с ослаблением интенсивности отбора) - кариотипическая структура популяций может меняться, главным образом, за счет случайных по своей природе геномных мутаций. Подобные популяции, по классификации В.М.Сенина (Сенин, 1972), должны быть отнесены к популяциям с нестабильным кариотипом.

В В В О Д И

1. Исследования методом двухволновой флуориметрии исследовали кармотипическую структуру популяций опухолевых клеток при клонировании *in vitro* и *in vivo* и при метастазировании.

2. В клонных популяциях HeLa *in vitro* и рабдомиосаркомы мыши *in vivo* наблюдается высокая среднее плодородности клонов и клеток, а также усиление кармотипической гетерогенности. При ухудшении условий кармотипическая гетерогенность популяций опухолевых клеток уменьшается.

3. Определена частота геномных мутаций в клонных популяциях, которая характеризуется величинами порядка $5-10 \times 10^{-2}$ за клетку на поколение. В культурах 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.

4. По константам экспоненциального роста клонов определена интенсивность отбора в популяциях опухолевых клеток. Клонные популяции HeLa *in vitro* и рабдомиосаркомы мыши *in vivo* характеризуются высокой интенсивностью отбора. При ухудшении условий интенсивность отбора в популяциях опухолевых клеток уменьшается.

5. Экспериментальные метастазы рабдомиосаркомы мыши в различные органы не отличаются по среднему содержанию ДНК в их клетках от исходной опухоли.

6. В благоприятных условиях, очевидно, решающее влияние на кармотипическую структуру популяций опухолевых клеток должны оказывать селективные процессы; в неблагоприятных условиях (в связи с ослаблением интенсивности отбора) — кармотипическая структура популяций может меняться, главным образом, за счет случайных по своей природе геномных мутаций.

Основные материалы диссертации изложены в следующих работах:

1. Фотометрическое изучение клонов HeLa , полученных при высокой эффективности клонирования (совместно с Ю.Б. Вахтиным). Цитология, 9, 8: 991-998, 1967.
2. Karyotypic variations and temps of selection in populations of HeLa cells at cloning.
(совместно с Ю.Б.Вахтиным). Proc. XII Intern. Congress of Genetics, Tokyo, 1: 158, 1968.
3. Изменчивость и отбор в клоновых популяциях HeLa .
I. Интенсивность отбора (совместно с Ю.Б.Вахтиным). Цитология II, 9: II37-II47, 1969.
4. Изменчивость и отбор в клоновых популяциях HeLa .
II. Кариотипическая гетерогенность клоновых популяций (совместно с Ю.Б.Вахтиным). Цитология II, 10: I313-I322, 1969.
5. Evolution of rhabdomyosarcoma cell populations
(совместно с Ю.Б.Вахтиным, Л.Г.Ивашевич и И.Н.Швембергер). Abst. X Intern. Cancer Congress, Houston:358, 1970.
6. Фотометрическое исследование рабдомиосаркомы при клонировании *in vivo* . Тезисы II съезда ВОГиС, М.,
IV: I3, 1972.
7. Изменчивость и отбор в клоновых популяциях HeLa .
III. Частота геномных мутаций (совместно с Ю.Б.Вахтиным). Цитология, I4, 1: 97-103, 1972.
8. Содержание ДНК в клетках экспериментальных метастазов перевивной рабдомиосаркомы мыши (совместно с Ю.Б.Вахтиным и И.Н.Швембергер). Цитология I4, 7: 911-915, 1972.
9. Частота геномных мутаций опухолевых клеток при клонировании *in vivo* (совместно с Ю.Б.Вахтиным). ДАН СССР, 204, 5: I240-I242, 1972.

Ю. Изменчивость и отбор в клонových популяциях рабдомиосарком мышей *in vivo* (совместно с Ю.Б.Вахтиным).
Цитология 14, 9: 1178-1183, 1972.

Материалы диссертации доложены на:

Школе по генетике развития (Новосибирск, 1969), II Всесоюзном совещании по полиплоидии (Ереван, 1971), Научных конференциях Института цитологии АН СССР (1966, 1969, 1972) и демонстрировались:
на II Съезде Всесоюзного общества генетиков и селекционеров (Москва, 1972).