

**ФЕДОРОВА (САНЧАКОВА)**

Елена Викторовна

**КЛОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАБДОМИОСАРКОМ  
МЫШЕЙ И КРЫС ПО СПЕКТРУ ИЗОЗИМОВ  
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

**03.00.17 —цитология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ**

**кандидата биологических наук**

ФЕДОРОВА (САНЧАКОВА)  
Елена Викторовна

КЛОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАБДОМИОСАРКОМ  
МЫШЕЙ И КРЫС ПО СПЕКТРУ ИЗОЗИМОВ  
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

03.00.17 —цитология

АВТОРЕФЕРАТ

ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Институте цитологии АН СССР, Ленинград.

Научный руководитель — доктор биологических наук Ю. Б. Вахтин.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук Л. И. Корочкин,  
кандидат биологических наук А. Л. Юдин.

Ведущее учреждение — Институт онкологии им. Н. Н. Петрова МЗ СССР,  
Ленинград.

Защита диссертации состоится «12» июня 1981 г. в 13 часов на заседании  
Специализированного совета К.002.73.01 при Институте цитологии АН СССР  
по адресу: 190121, Ленинград, пр. Маклина, 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии  
АН СССР.

Автореферат разослан «12» мая 1981 г.

Ученый секретарь  
Специализированного совета  
Доктор биологических наук

Г. Н. Можяева

**Актуальность темы.** Детальное изучение структуры, дифференцировки и репродукции клеточных популяций представляет собой одно из самых актуальных направлений в современной цитологии. За последние годы благодаря разработке методов клонального анализа и усовершенствованию методов цитохимии и электрофореза появилась возможность исследовать гетерогенность клеточных популяций не только по цитогенетическим особенностям и признакам морфологической дифференцировки, но и по многим биохимическим признакам.

Изучение гетерогенности клеточных популяций по биохимическим признакам привлекает очень большое внимание, так как именно биохимические признаки клеток играют решающую роль в их реакциях на регуляторные воздействия многоклеточного организма, определяют наиболее существенные стороны чувствительности клеток к действию фармакологических препаратов.

Особый интерес в этой связи представляет изучение гетерогенности по биохимическим признакам клеточных популяций злокачественных опухолей. Для злокачественных опухолей характерно нарушение чувствительности клеток к регуляторным воздействиям организма, инвазивный рост, способность к метастазированию, ярко выраженная дифференциальная чувствительность клеток к противоопухолевым агентам, гормонам и факторам, индуцирующим процессы цитотипической и гистотипической дифференцировки. Как известно, злокачественная трансформация клеток сопровождается закономерными изменениями их изозимного состава. Наблюдающиеся в опухолевых клетках изменения спектра изозимов выражены зачастую столь резко, что характеристика изозимного состава клеток и тканей эффективно используется для диагностики ряда злокачественных и доброкачественных опухолей (Шапот, 1975).

**Цель и задачи работы.** Целью настоящей работы являлось изучение экспериментальных рабдомиосарком мышей и крыс и их клоновых популяций по спектру изозимов лактатдегидрогеназы (ЛДГ). При этом были поставлены следующие основные задачи: 1) изучить спектры изозимов ЛДГ экспериментальных рабдомиосарком на разных этапах прогрессии опухолей; 2) с помощью клонального анализа *in vivo* выделить потомства отдельных злокачественных миобластов (клоны) и сопоставить изозимные спектры ЛДГ клонов с изозимными спектрами клонируемых опухолей; 3) в случае обнаружения ожидаемого полиморфизма — проанализировать его природу, т. е. определить роль наследственных и средовых факторов в возникновении и воспроизведении полиморфизма в ряду клеточных поколений.

**Научная новизна.** 1. Обнаружено, что для рабдомиосарком мышей и крыс характерны изменения спектров изозимов ЛДГ, обусловленные преобладанием изозимов, содержащих преимущественно М-субъединицы, и впервые показано, что наиболее сильно выраженные изменения спектра ЛДГ выявляются у низ-

кодифференцированных рабдомиосарком. 2. Выделены *in vivo* и охарактеризованы по изозимам ЛДГ клоны первичных и перевивных рабдомиосарком мышей и крыс. Обнаружено, что большая часть потомства отдельных опухолевых клеток воспроизводит спектры изозимов ЛДГ тех опухолей, от которых они получены. Однако, были выделены и клоны, отличающиеся по спектру ЛДГ от клонировавшихся рабдомиосарком, т. е. клоны с уменьшенным и увеличенным числом изозимов ЛДГ. Таким образом, впервые установлено, что клоновые популяции рабдомиосарком полиморфны по спектру изозимов ЛДГ. 3. Показано, что у перевивной рабдомиосаркомы РА-2 крыс характерные для клонов спектры изозимов ЛДГ сохраняются после реклонирования у большей части «клонов-потомков», и впервые определен коэффициент наследуемости ( $h^2$ ) по признаку «спектр изозимов ЛДГ». Тем самым доказан наследственный характер полиморфизма по спектру ЛДГ в клеточных популяциях рабдомиосарком. 4. Обнаружена зависимость проявления признака «спектр изозимов ЛДГ» от условий, в которых пролиферируют клетки — культивирование клонов низкодифференцированных рабдомиосарком в передней камере глаза мышей и крыс приводит к восстановлению спектра ЛДГ, характерного для нормальной мышечной ткани.

**Теоретическое значение и практическая ценность.** Полученные в настоящей работе данные углубляют знания о характере изменения спектра изозимов ЛДГ при малигнизации и природе полиморфизма популяций опухолевых клеток по биохимическим признакам. Установление наследственного характера гетерогенности клеточных популяций рабдомиосарком по спектрам изозимов ЛДГ имеет важное значение для разработки теории прогрессии опухолей по биохимическим признакам. Выявленный широкий диапазон изменчивости спектров изозимов ЛДГ в клеточных популяциях рабдомиосарком под влиянием наследственных и средовых факторов следует учитывать при использовании показателя «спектр изозимов ЛДГ» для диагностики злокачественных новообразований. Апробированный в настоящей работе метод определения коэффициента наследуемости признака «спектр изозимов ЛДГ» может быть использован для определения наследуемости других биохимических признаков в популяциях опухолевых клеток.

**Апробация работы.** Результаты работы доложены на: 1) V Всесоюзном совещании по гисто-гематическим барьерам (Москва, 1978); 2) Советско-американском симпозиуме по генетике соматических клеток (Москва, 1980); 3) Всесоюзном симпозиуме «Генетические процессы в популяциях опухолевых клеток» (Ленинград, 1980); 4) совместном заседании научного семинара лаборатории генетики клеточных популяций и лаборатории цитологии опухолевого роста Института цитологии АН СССР (Ленинград, 1981). Материалы диссертации были использованы для оформления совместно с И. Н. Швембергер, Э. Г. Григорьевой,

Т. Н. Мосевич, Л. И. Степаньян, А. К. Аль-Рубей, Т. Н. Курсенковой стенда «Нормализация опухолевых клеток» на ВДНХ (Москва, 1981).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

**Объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов собственных исследований (3 главы), обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 198 названий. Работа изложена на 106 страницах машинописного текста, иллюстрирована 34 рисунками и 8 таблицами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы служили рабдомиосаркомы мышей СС57 и белых беспородных крыс — первичные, индуцированные внутримышечным введением 20-метилхолантрена и перевивные (МХ-53, РА-2).

При клонировании рабдомиосарком кусочки опухолевой ткани измельчали и обрабатывали 0,25% -м раствором трипсина; полученную суспензию одиночных опухолевых клеток вводили внутривенно (в хвостовую вену), развившиеся в легких опухолевые узлы извлекали и использовали для электрофоретического исследования, реклонирования и введения в переднюю камеру глаза мышей и крыс. Для доказательства клонального происхождения опухолевых узлов в легких крыс были поставлены специальные опыты по определению характера зависимости между числом вводимых внутривенно клеток и числом выросших в легочной ткани опухолевых узлов. Клональная природа опухолевых узлов, формирующихся в легких мышей после внутривенного введения суспензий одиночных опухолевых клеток, доказана с помощью эпигенатических маркеров (Вахтин и др., 1972).

Введение суспензии опухолевых клеток в переднюю камеру глаза (Строева, 1971; Швембергер, 1974) проводили под наркозом (внутрибрюшинное введение раствора хлоралгидрата). Прививаемость регистрировали на 15—20-е сутки после прививки. Выросшие трансплантаты извлекали и исследовали электрофоретически на содержание изозимов лактатдегидрогеназы.

Содержание изозимов лактатдегидрогеназы (ЛДГ: 1 — лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27) изучали методом электрофореза в полиакриламидном геле. В работе применяли прибор с вертикальными плоскими блоками геля. Толщина гелевой пластинки — 1 мм. Число лунок в геле для образцов — 6—25. Гель приготавливали по методике, изложенной в книге Маурера «Диск-электрофорез» (Маурер, 1971). Использовали буферную систему № 1 по Мауреру, применяли концентрации геля: крупнопористый — 15% -й и мелкопористый — 7% -й (рН 8,5). Концентрация образцов для опухолевых тканей мыши — 1,5 г/мл, для опухоле-

вых тканей крысы — 3 г/мл. Кусочки ткани для электрофореза промывали 0,15 М NaCl на 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4; осушали, взвешивали и соответственно нужной концентрации добавляли раствор для гомогенизации — 0,25 М раствор сахарозы на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4. Гомогенизирование проводили в стеклянных гомогенизаторах, на льду. Центрифугирование проводили в течение 1 часа при 10 000 (0° С), надосадочную жидкость наносили в лунки геля в объеме 5—10 мкл. Время электрофореза — 6 ч (при 0—4° С). Для выявления ЛДГ применяли инкубационную смесь, приготовленную по методике (Show, Prasad, 1970). Такой смесью заливали гелевый блок и инкубировали 1 ч при 37° С.

Для цитофотометрического исследования содержания ДНК мазки опухолей и клонов окрашивали по Фёльгену (гидролиз — 6 мин в 5 н. HCl при 37° С; использовали цитофотометр МЦФУ-1 (лаборатория цитохимии и гистохимии Института цитологии АН СССР). Диплоидный уровень ДНК определяли на лимфоцитах периферических узлов животных.

Для гистологических исследований опухоли и клоны фиксировали в 10%-м формалине (трансплантаты, выросшие в передней камере глаза — по Буэну), заливали в парафин. Срезы толщиной 6 мкм красили гематоксилином-эозином, по методу Ван-Гизона, а также железным гематоксилином по Гейденгайну.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Спектры ЛДГ опухолей.** Спектры ЛДГ были определены у первичных и перевивных опухолей мышей и крыс.

В опухолевой ткани 4 первичных рабдомиосаркомы мышей и полученных от них при подкожной трансплантации опухолей I—VII генераций (МХ-55, МХ-56, МХ-62, МХ-71) было обнаружено по 2 изозима ЛДГ (ЛДГ-5, -4), у одной первичной рабдомиосаркомы (МХ-64) — все пять изозимов ЛДГ. У первичной опухоли МХ-65 мышей, гистологически не исследованной, также обнаружены все пять изозимов ЛДГ. 5 изозимов ЛДГ выявлялись и в дефинитивных скелетных мышцах мышей.

В подкожно растущих опухолях перевивной рабдомиосаркомы А-7 обнаружены 2 изозима ЛДГ (ЛДГ-5, -4). Рабдомиосаркомы МХ-53 и МХ-III также содержали 2 изозима (ЛДГ-5, -4), но у них выявлялись и следовые количества изозима ЛДГ-3. Электрофоретическое изучение перевивной полиморфноклеточной рабдомиосаркомы РА-2 крыс на содержание изозимов ЛДГ, на LX, LXI и LXII пассажах дало сходные результаты — во всех гомогенатах подкожно растущих опухолей были выявлены 3 изозима ЛДГ (ЛДГ-5, -4, -3). В гомогенатах первичной рабдомиосаркомы крыс РА-3 выявлено 4 изозима ЛДГ (ЛДГ-5, -4, -3, -2).

Таким образом, в гомогенатах опухолевой ткани первичных и перевивных рабдомиосарком мышей и крыс выявлено умень-

шенное по сравнению с дефинитивной мышечной тканью число изозимов ЛДГ, причем в гомогенатах большинства рабдомиосарком не выявляются изозимы ЛДГ-1 и ЛДГ-2. Спектр изозимов ЛДГ у рабдомиосарком изменен, причем изменения однотипны для всех исследованных опухолей.

Полученные результаты, как и данные И. А. Ходосовой и сотр. (1975), позволяют отнести рабдомиосаркомы мышей и крыс к опухолям, изменение спектра изозимов в которых происходит за счет преобладания М-субъединиц.

**Спектры ЛДГ клонов.** При исследовании гомогенатов опухолевой ткани остается неизвестным, все ли опухолевые клетки имеют одинаковый спектр ЛДГ, или популяция опухолевых клеток полиморфна по этому признаку. Чтобы ответить на этот вопрос, нами был проведен клональный анализ экспериментальных рабдомиосарком мышей и крыс. Эффективность клонирования первичных опухолей мышей и крыс очень низка. Только 7 первичных опухолей из 14 образовывали клоны через 31—54 сут после введения суспензий одиночных опухолевых клеток животным. Эффективность клонирования перевивных опухолей значительно выше. Все подвергавшиеся клонированию перевивные рабдомиосаркомы через 16—30 сут после введения суспензий одиночных опухолевых клеток образовывали клоны в легочной ткани. Клоны удавалось получать почти во всех повторностях опытов. При клонировании перевивных опухолей внутривенно вводили значительно меньше клеток (до 50 тыс. клеток на животное), чем при клонировании первичных опухолей, при этом получали в 2—4 раза больше клонов у каждого привитого животного.

В случаях, когда были исследованы лишь единичные клоны от опухолей (МХ-71 и МХ-III) в них не были обнаружены изменения изозимного спектра ЛДГ по сравнению с клонируемой опухолью.

Содержание изозимов, ЛДГ у клонов 3 рабдомиосарком мышей, находящихся на разных стадиях прогрессии, приведены на рис. 1 (МХ-57 — высокодифференцированная рабдомиосаркома, МХ-62 — низкодифференцированная рабдомиосаркома, МХ-53 — полиморфноклеточная рабдомиосаркома). Каждая опухоль дала гетерогенную по спектру ЛДГ популяцию клонов. Распределение клонов по спектрам изозимов специфично для опухоли.

У первичной рабдомиосаркомы МХ-57 большой процент клонов содержит 4 изозима, спектр изозимов этих клонов отличается от спектра изозимов нормальной мышечной ткани лишь отсутствием изозима ЛДГ-1. У первичной рабдомиосаркомы МХ-53 клоны с 4 изозимами не обнаружены, преобладают клоны с резко измененным спектром изозимов ЛДГ, причем у 15% клонов выявлен лишь один изозим — ЛДГ-5. Опухоль МХ-62 занимает как бы промежуточное положение. Большинство ее клонов содержит резко измененный спектр ЛДГ, но есть и клоны, у которых выявляются 4 изозима.



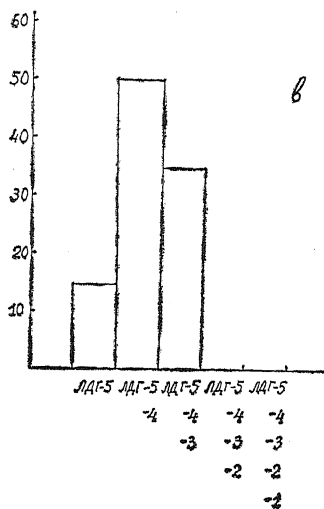
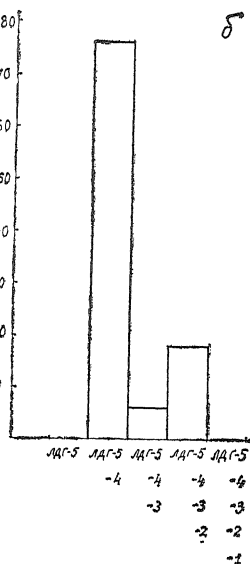
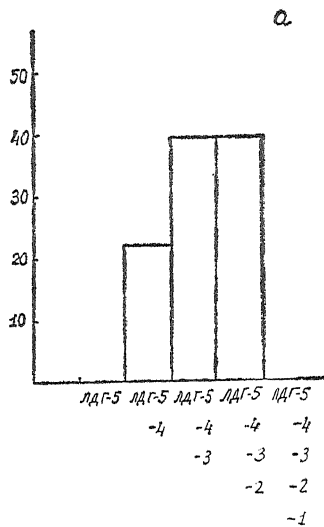


Рис. 1. Распределение клонов рабдомиосарком мышей по спектрам изотимов лактатдегидрогеназы (ЛДГ).  
По вертикали — число клонов, в процентах; по горизонтали — спектр изотимов ЛДГ.

а — МХ-57; б — МХ-62; в — МХ-53.

При проведении клонального анализа рабдомиосарком крыс были поставлены опыты по определению зависимости между числом вводимых клеток и числом формирующихся в легких опухолевых узлов. Эти опыты показали, что в диапазоне доз от 400 клеток до 25000 клеток зависимость носит линейный характер, что указывает на клональное происхождение формирующихся в легких узлов (Hill, Bush, 1969).

Распределения клонов рабдомиосарком крыс по спектру изозимов ЛДГ приведены на рис. 2. Первичная рабдомиосаркома РА-3 образовывала клоны с 3, 4 и 5 изозимами, причем клоны со спектром из пяти изозимов составляли треть всех клонов. Перевивная рабдомиосаркома РА-2 дала те же классы клонов, но в совершенно другом соотношении ( $p < 0.01$ ). Почти половина клонов имела резко измененный спектр изозимов, и только 1 клон из 54 исследованных содержал спектр из 5 изозимов.

Как показывают приведенные данные и от первичных, и от перевивных рабдомиосарком мышей и крыс были получены клоны, различающиеся по спектру изозимов ЛДГ. Лишь часть полученных клонов имели тот же спектр ЛДГ, что и клонируемые опухоли (например, 52% у РА-2 и 43% у РА-3). Остальные клоны имели либо более полный спектр изозимов ЛДГ, чем подкожно растущие опухоли, либо спектры, еще более обедненные изозимами, в состав которых входит Н-субъединица. От первичных опухолей был получен большой процент клонов с нормальными (5 изозимов) и почти нормальными (4 изозима) спектрами ЛДГ, чем от перевивных.

В целом, изучение спектров ЛДГ в клонах рабдомиосарком мышей и крыс показало, что во всех опытах, в которых удалось получить и исследовать значительное число клонов (от 16 до 100), наряду с клонами, повторяющими спектр клонируемой опухоли, выявлялись и клоны с измененными спектрами ЛДГ. На основании этого можно сделать вывод, что от всех рабдомиосарком мышей и крыс могут быть получены полиморфные по спектру ЛДГ популяции клонов. При этом могут выявляться как клоны с еще более нарушенным спектром ЛДГ, чем у клонируемой опухоли, так и клоны, имеющие нормальные и почти нормальные спектры ЛДГ.

Интересные различия по соотношению клонов с разными спектрами изозимов наблюдаются у рабдомиосарком, находящихся на разных стадиях прогрессии (рис. 1, 2). У перевивных опухолей достоверно понижен процент клонов с нормальным или мало измененным спектром изозимов и соответственно повышен процент клонов, в которых выявляются лишь 1—3 изозима.

**Наследственный характер межклональных различий.** Как известно, полиморфизм в клеточных популяциях может быть обусловлен наследственной (мутационной или эпигенетической) и модификационной изменчивостью. Для того, чтобы выяснить характер обнаруженной в клоновых популяциях первичных и пере-

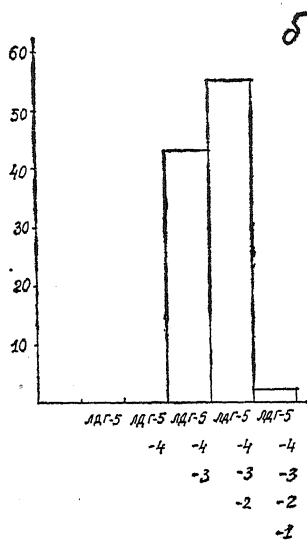
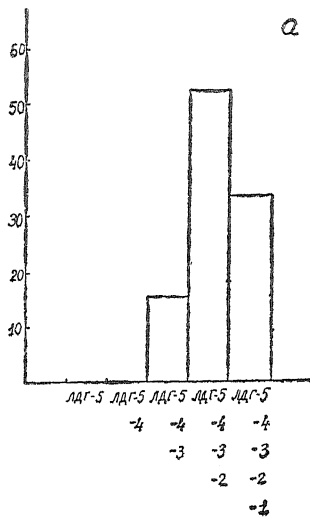


Рис. 2. Распределение клонов рабдомиосарком крыс по спектрам изоимов лактатдегидрогеназы (ЛДГ).  
По вертикали — число клонов, в процентах; по горизонтали — спектр изоимов ЛДГ.  
а — РА-3; б — РА-2.

вивных рабдомиосарком гетерогенности, нами была поставлена серия опытов по реклонированию индивидуальных клонов рабдомиосаркомы РА-2 в условиях *in vivo*. Эксперименты проводили по следующей схеме: каждый взятый для исследования клон делили на две части — одну половину исследовали на содержание ЛДГ методом вертикального полиакриламидного электрофореза, другую половину использовали для приготовления суспензии опухолевых клеток, которую вводили внутривенно 1, 2 или 3 животным. Через 16—25 сут выросшие клоны подсчитывали и исследовали на содержание изозимов ЛДГ.

Число «клонов-потомков», полученных от разных «родительских клонов», резко варьировало (от 0 до 210), что свидетельствует о значительных различиях клонов РА-2 по признаку «клоногенная способность». Гистологическое исследование «родительских клонов» и «клонов-потомков» показало их очень большую морфологическую однородность — все клоны относились к одному и тому же типу веретенчатой рабдомиосаркомы.

При изучении спектров изозимов ЛДГ «родительских клонов» и полученных от них «клонов-потомков» оказалось, что все потомки клона с 5 изозимами содержали также 5 изозимов. От 9 клонов с 4 изозимами было изучено 90 «клонов-потомков»: 83 клон сохранили родительский спектр изозимов, у 7 клонов спектр оказался измененным — они содержали не 4, как родительские клоны, а только 3 изозима ЛДГ. Наибольшая вариабельность наблюдалась в потомстве 2 клонов, содержавших только 3 изозима. В потомстве одного клона этот спектр не воспроизвелся совсем; в потомстве второго клона воспроизведение родительского спектра из 3 изозимов наблюдалось у 8 клонов, а 2 клон имели нормальный спектр из 5 изозимов. В целом, у большинства «клонов-потомков» (у 101 из 120) сохранился родительский спектр ЛДГ, у 7 произошла утрата одного из изозимов, у 12 число изозимов увеличилось. Таким образом, при реклонировании в легочной ткани, спектр изозимов ЛДГ ведет себя как довольно стабильный признак, а случаи утраты или приобретения изозимов ЛДГ-1 и ЛДГ-2 происходят с примерно равной вероятностью.

Приведенные выше данные были использованы для определения коэффициента наследуемости ( $h^2$ ) признака «спектра изозимов ЛДГ» (Рокицкий, 1974). Вычисление коэффициента наследуемости по признаку «спектр изозимов ЛДГ» дало величину 0,68 ( $p < 0,01$ ). Таким образом, примерно на 68% полиморфизм популяции клоногенных клеток рабдомиосаркомы РА-2 обусловлен их наследственными различиями по признаку «спектр изозимов ЛДГ», а на 32% — средовыми факторами, т. е. различиями условий, в которых происходит пролиферация потомств клоногенных клеток в легочной ткани.

**Культивирование в передней камере глаза.** По данным литературы, нормализация спектров изозимов ЛДГ наблюдалась при

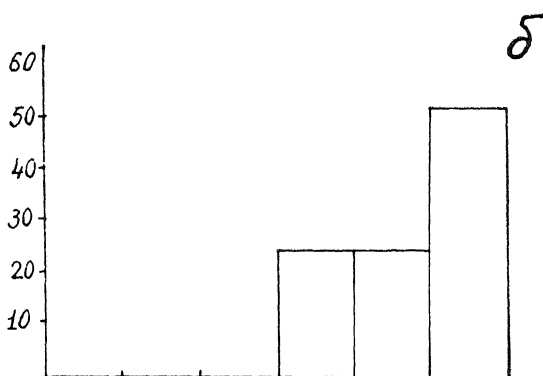
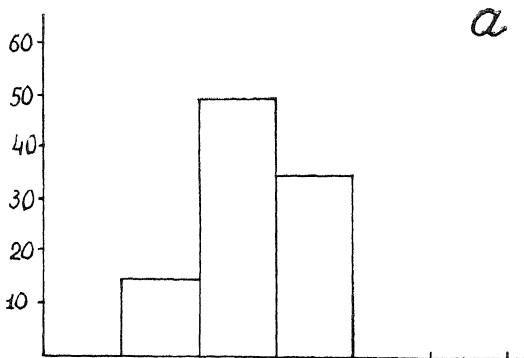
культивировании клеток эмбриональной карциномы в тех случаях, когда происходило спонтанное повышение степени дифференцированности культивируемых клеток (ho, Gilula, 1980). Клетки рабдомиосарком способны сливаться в многоядерные миосимпласты и формировать миофибриллы, т. е. проявлять признаки многоклеточной дифференцировки под влиянием различных воздействий (Вахтин, Швембергер, 1968; Швембергер, 1976). Очень глубокая и резкая стимуляция миогенеза в клеточной популяции экспериментальных рабдомиосарком наблюдается при их культивировании в передней камере глаза мышей и крыс (Швембергер и др., 1977; Швембергер и др., 1979; Мосевич, Швембергер, 1980).

На основании этих наблюдений было выбрано культивирование в передней камере глаза для оценки возможности изменить спектр ЛДГ у рабдомиосарком мышей и крыс путем изменения внешних условий; одновременно были изучены морфологические изменения рабдомиосарком и их клонов при культивировании в передней камере глаза, а также проведено цитофотометрическое изучение содержания ДНК в клеточных популяциях рабдомиосарком при разных условиях их трансплантации.

Трансплантацию клонов в переднюю камеру глаза проводили по следующей схеме: одну половину каждого легочного клона исследовали электрофоретически, из другой половины готовили суспензию опухолевых клеток, которую вводили в переднюю камеру глаза. Выросшие в передней камере глаза трансплантаты также были исследованы электрофоретически.

У клонов, рабдомиосаркомы МХ-53, трансплантированных в переднюю камеру глаза мышей, число электрофоретически выявляемых изоформ ЛДГ по сравнению с клонами, выросшими в легочной ткани увеличилось (рис. 3). При этом большая часть клонов (9 и 17), выросших в передней камере глаза, имели все пять изоформ ЛДГ, как и дефинитивная мышечная ткань. Хорошо заметно, что в клоновой популяции МХ-53 после роста в передней камере глаза произошли резкие изменения — полностью исчезли клоны, у которых выявлялись 1 и 2 изоформа ЛДГ, и преобладающими стали клоны с 4 и 5 изоформами, не встречавшиеся в популяции клонов, выросших в легочной ткани.

Трансплантаты, выросшие в передней камере глаза крысы при введении отдельных клонов РА-2 крысы, также были изучены на содержание изоформ ЛДГ. Клетки 4 клонов, выросших в легочной ткани, дали начало трансплантатам в передней камере глаза с полным спектром изоформ ЛДГ. Из 13 легочных клонов с 3 изоформами ЛДГ (ЛДГ-5, -4, -3) полный спектр изоформ ЛДГ после роста в передней камере глаза восстановили потомства 7 клонов, в то время как от остальных клонов были получены трансплантаты, в которых дополнительно выявлялся лишь изоформ ЛДГ-2. Полный спектр изоформ ЛДГ был обнаружен у 5 трансплантатов в переднюю камеру глаза, происходящих от ле-



ЛДГ-5    ЛДГ-5    ЛДГ-5    ЛДГ-5    ЛДГ-5

-4        -4        -4        -4

          -3        -3        -3

                  -2        -2

                          -1

Рис. 3. Распределение клонов рабдомиосаркомы МХ-53, выросших в легких (а) и в передней камере глаза мышей (б) по спектру изоэнов лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

По вертикали — число клонов, в процентах; по горизонтали — спектр изоэнов ЛДГ.

точных клонов, изозимные спектры которых определить не удалось. На рис. 4 приведено распределение трансплантатов 23 клонов РА-2 в передней камере глаза крыс по содержанию изозимов ЛДГ и распределению клонов РА-2 в легочной ткани по спектру изозимов ЛДГ. Среди клонов, культивировавшихся в передней камере глаза не обнаружены варианты с 3 изозимами ЛДГ, а доля вариантов, в которых выявлялся полный спектр изозимов ЛДГ, резко повысилась.

Цитофотометрическое изучение клеточных популяций первичных и перевивных рабдомиосарком при подкожных трансплантациях опухолей и при их трансплантациях в переднюю камеру глаза мышей и крыс показала достоверное сужение размаха варьирования интерфазных ядер по содержанию ДНК при культивировании опухолей в передней камере глаза по сравнению с подкожно растущими опухолями ( $p < 0,05$ ). При исследовании гистологических препаратов трансплантатов рабдомиосарком мышей и крыс в передней камере глаза в большинстве случаев не удалось выявить повышения степени морфологической дифференцировки.

Приведенные данные показывают, что проявление признака «спектр изозимов ЛДГ» у рабдомиосарком мышей и крыс может резко меняться в зависимости от условий трансплантации опухолей. Рабдомиосаркомы МХ-53 мышей и РА-2 крыс в ходе прогрессии утратили полный спектр изозимов ЛДГ. Неполные спектры изозимов ЛДГ характерны и для клонов, полученных от этих рабдомиосарком. Восстановление нормального спектра из 5 изозимов ЛДГ после культивирования рабдомиосарком и их клонов в передней камере глаза следует, очевидно, рассматривать как изменение в сторону нормальной ткани, как повышение степени дифференцированности клеток этих опухолей по рассматриваемому биохимическому признаку — по спектру изозимов ЛДГ.

Проведенный клональный анализ не позволяет сделать каких-либо выводов о том, какие именно наследственные изменения лежат в основе обнаруженного наследственного полиморфизма исследованных опухолей по признаку «спектр изозимов ЛДГ». Дедифференцированные и закончившие прогрессию рабдомиосаркомы МХ-53 и РА-2 давали клоны с более обедненными спектрами ЛДГ, чем первичные более дифференцированные рабдомиосаркомы. Эти обычные для прогрессии злокачественных опухолей изменения (Шапот, 1975) в свете обнаруженного наследственного характера полиморфизма клеточных популяций по признаку «спектр изозимов ЛДГ» должны рассматриваться как изменения в наследственной структуре популяций опухолевых клеток в ходе их прогрессии.

В клеточных популяциях, гетерогенность которых обусловлена лишь модификационными различиями составляющих ее клеток, ни искусственный, ни естественный отбор не могут быть эф-

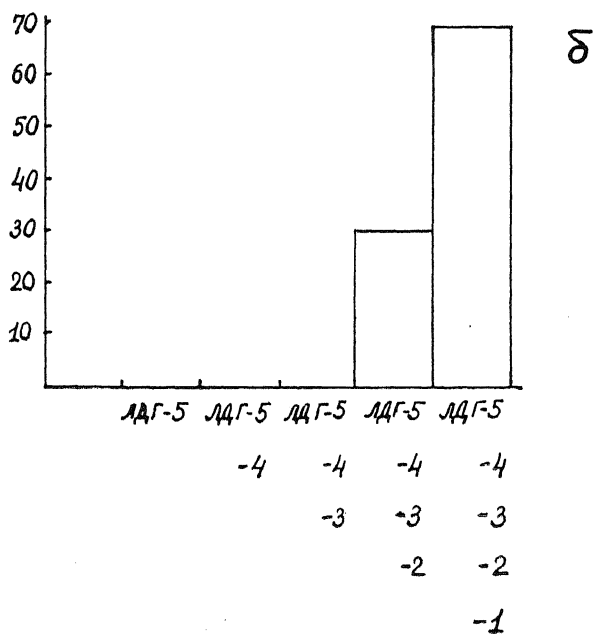
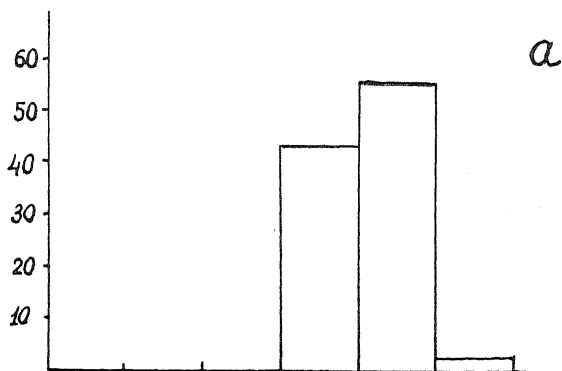


Рис. 4. Распределение клонов рабдомиосаркомы РА-2, выросших в легких (а) и в передней камере глаза крыс (б), по спектру изоимов лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

По вертикали — число клонов, в процентах; по горизонтали — спектр изоимов ЛДГ.



фективными (Лобашев, 1967; Рокицкий, 1974; Гершензон, 1979). Напротив, в гетерогенной по какому-либо признаку популяции не только возможен искусственный отбор по указанному признаку, но должен происходить и естественный отбор. Естественный отбор является почти неизбежным следствием наследственного полиморфизма популяций потому, что различие по какому-либо признаку лишь в очень редких случаях могут быть селективно нейтральными (Кирпичников, 1979).

Результаты клонального анализа рабдомиосарком показали, что клеточные популяции этих опухолей наследственно гетерогенны по признаку «спектр изозимов ЛДГ» и, очевидно, естественный отбор может оказывать влияние на прогрессию опухолей по указанному признаку.

## ВЫВОДЫ

1. Рабдомиосаркомы мышей и крыс относятся к злокачественным опухолям, для которых характерны изменения спектра лактатдегидрогеназы (ЛДГ), обусловленные преобладанием изоэлемента, содержащих преимущественно М-субъединицы. У большинства рабдомиосарком электрофоретически выявляются 2 изоэлемента ЛДГ (ЛДГ-5, ЛДГ-4), лишь у некоторых первичных (высокодифференцированных) опухолей обнаружены 4 (ЛДГ-5, ЛДГ-4, ЛДГ-3, ЛДГ-2) и 5 (ЛДГ-5, ЛДГ-4, ЛДГ-3, ЛДГ-2, ЛДГ-1) изоэлементов.

2. При клонировании рабдомиосарком *in vivo* большая часть клонов воспроизводит спектр изоэлементов ЛДГ исходной опухоли, однако формируются и клоны с увеличенным и уменьшенным числом изоэлементов. Таким образом, клоновые популяции рабдомиосарком являются полиморфными по спектру ЛДГ.

3. Полиморфизм клоновых популяций рабдомиосарком специфичен для каждой опухоли. У перевивных рабдомиосарком МХ-53 мышей и РА-2 крыс наблюдается постоянство в соотношении клонов с разными спектрами ЛДГ.

4. Низкодифференцированные и закончившие прогрессию рабдомиосаркомы мышей и крыс имеют более резко выраженные изменения спектра ЛДГ по сравнению с первичными высококодифференцированными рабдомиосаркомами, причем эти различия характерны и для получаемых от опухолей клоновых популяций. От первичных высококодифференцированных рабдомиосарком легко получить клоны с нормальным спектром из 5 изоэлементов (ЛДГ-5, ЛДГ-4, ЛДГ-3, ЛДГ-2, ЛДГ-1), характерным для мышечной ткани, в то время как от перевивной низкодифференцированной рабдомиосаркомы МХ-53 мышей были получены клоны, в которых выявлялся лишь 1 изоэлемент — ЛДГ-5.

5. При реклонировании межклональные различия по спектру ЛДГ большей частью сохраняются, что указывает на наследственный характер обнаруженного полиморфизма по этому признаку. Коэффициент наследуемости ( $h^2$ ) признака «спектр изоэлементов ЛДГ» в клеточной популяции перевивной рабдомиосаркомы РА-2 крыс равен 0,68. Таким образом, наблюдающийся полиморфизм клоновых популяций этой опухоли по спектру ЛДГ примерно на 70% обусловлен наследственными различиями клоногенных опухолевых клеток, а на 30% — варьированием факторов среды.

6. Культивирование клонов рабдомиосарком МХ-53 и РА-2 в передней камере галаза мышей и крыс приводит к восстановлению спектра ЛДГ, характерного для нормальной мышечной ткани, что не сопровождается у этих клонов появлением морфологических признаков миогенной дифференцировки. В этих условиях межклональные различия по спектру ЛДГ перестают четко выявляться.

7. Проведенный клональный анализ рабдомиосарком *in vivo* показывает, что характерные для опухолей данного гистогенеза изменения спектра ЛДГ, являются не только следствием изменения условий пролиферации и функционирования опухолевых тканей по сравнению с нормальными, но и следствием наследственных изменений в популяции опухолевых клеток по признаку «спектр изозимов ЛДГ». Обнаруженный наследственный полиморфизм клеточных популяций первичных и перевивных рабдомиосарком по спектру ЛДГ свидетельствует, что наблюдающиеся в ходе прогрессии опухолей закономерные изменения спектра ЛДГ могут ускоряться действием естественного отбора по этому признаку.

## РАБОТЫ ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Швембергер И. Н., Крыленков В. А., Степаньян Л. И., Санчакова Е. В., Вахтин Ю. Б. 1977. Перспективы использования передней камеры глаза для изучения пролиферации, дифференциации и гибридизации опухолевых клеток. *Цитология*, 19, 6: 665—669.

2. Григорьева Э. Г., Санчакова Е. В., Степаньян Л. И., Швембергер И. Н. 1978. Использование метода трансплантаций в переднюю камеру глаза в сочетании с цитофотометрическим определением содержания ДНК в ядрах опухолевых клеток для изучения кариотипической нормализации клеток.— Мат. Всес. конф. по современным методам морфологического исследования в теоретической и практической онкологии. Тбилиси: 56—58.

3. Степаньян Л. И., Швембергер И. Н., Григорьева Э. Г., Санчакова Е. В. 1978. Изменение кариотипической структуры экспериментальных опухолей при трансплантации в переднюю камеру глаза и яичко.— Тез. Всесоюзного совещания по проблеме «Гисто-гематические барьеры». М.: 205—206.

4. Санчакова Е. В. 1979. Клональный анализ прогрессии перевивных рабдомиосарком мышей по признаку «спектр изоферментов ЛДГ». Мат. конф. молодых онкологов Ленинграда. Л.: 75—76.

5. Степаньян Л. И., Григорьева Э. Г., Санчакова Е. В., Швембергер И. Н. 1979. Изменение кариотипической структуры рабдомиосарком мышей и крыс при их трансплантации в переднюю камеру глаза. — *Цитология*, 21, 9: 1074—1080.

6. Санчакова Е. В., Вахтин Ю. Б. 1981. Изменение спектра изозимов ЛДГ в клонах перевивных рабдомиосарком, трансплантированных в переднюю камеру глаза.— *Цитология*, 23, 6: 682—686.

7. Yu. B. Vakhtin, E. V. Sanchakova. 1981. LDH polymorphism of rat and mouse rhabdomyosarcomas.— *Isozyme Bull.*, 14: 61—63.

Для заметок

112  
Ф333

Подписано к печати 06.05.81. М-20019. Зак. 6199. Тир. 110. Бесплатно. Ордена Трудового  
Красного Знамени ленинградская типография № 3 имени Ивана Федорова Союзполи-  
графпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и  
книжной торговли. 191126, Ленинград, Звенигородская ул., 11.