

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ АКАДЕМИИ НАУК СССР

На правах рукописи

УДК 578:616-006

ТРУСОВА

Валентина Дмитриевна

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ТЕРМАЛЬНОГО ОТВора
В ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК ПЕРВИЧНОЙ РАДОММОСАРКОМЫ
РА-2 КРЧС

03.00.17 — цитология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ленинград

1988

Работа выполнена в лаборатории генетики клеточных популяций
Института цитологии АН СССР

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Д.Б.Вахтин

Официальные оппоненты: доктор биологических наук Л.З.Кайданов,
кандидат биологических наук
В.Б.Андроников

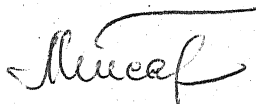
Ведущая организация: Белорусский НИИ онкологии и радиологии
МЗ БССР

Защита состоится "17" июня 1988 г. в 10 час.
на заседании Специализированного совета Д.002.73.01 при Институте
цитологии АН СССР по адресу: 194064 Ленинград, Тихорецкий пр., 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
цитологии АН СССР

Автореферат разослан "12" мая 1988 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета
канд. биол. наук



Л.Н.Писарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. До последнего времени изучение чувствительности клеток к термальному воздействию проводилось в рамках разработки более общих проблем реакции клеток на действие адекватных и неадекватных раздражителей и повреждающих агентов (Александров, 1985) и цитозологии (Ушаков, 1982-1984). Обнаружение внутривидовых и межвидовых различий по теплоустойчивости клеток позволило обосновать новый - цитологический - критерий вида.

В последние годы благодаря открытию белков теплового шока (Tissieres et al., 1974 и др.) и использованию гипертермии при лечении злокачественных новообразований резко усилился интерес к молекулярно-генетическим механизмам регуляции терморезистентности, фенотипическому и наследственному полиморфизму популяций опухолевых клеток по чувствительности к термальным воздействиям (Nielsen, Overgaard, 1982; Urano, Hahn, 1985; Urano, 1986 и др.). Селекция клонов и линий опухолевых клеток с генетически обусловленными различиями по терморезистентности позволяет моделировать процесс возникновения терморезистентности опухолей в ходе термотерапии и анализировать с помощью генетических методов механизмы, обуславливающие реакцию нормальных и опухолевых клеток на действие повышенной температуры. Изучение динамики отбора на терморезистентность в клеточных популяциях представляет интерес и для разработки новых методов селекции клеточных штаммов-продуцентов.

Цель и задачи исследования. Цель исследования - изучить реакцию количественного признака "терморезистентность" в клеточных популяциях перевивной органотропной рабдомиосаркомы крыс на действие массового искусственного отбора.

Для достижения этой цели были поставлены конкретные задачи:

- 1) Определить параметры фенотипического проявления признака "терморезистентность" в популяции клеток рабдомиосаркомы РА-2;
- 2) На основании литературных данных по наследственной обусловленности признака "терморезистентность", полученных данных о фенотипической реализации признака и наследственной структуре се-

лектируемой популяции разработать программу селекции в популяции клеток РА-2 на повышение терморезистентности.

3) Изучить динамику отбора на повышение терморезистентности по разработанной программе селекции. Оценить темпы и эффективность отбора.

4) Охарактеризовать полученный в результате отбора субштамм по радиорезистентности, онкогенности и ряду других цитологических и биохимических показателей.

Научная новизна. Впервые показана эффективность многократного массового отбора в популяции клеток перевивной опухоли, осуществляемого путем сублетальных термальных воздействий на клетки в условиях *in vitro* и последующего получения экспериментальных метастазов от терморезистентных клоногенных опухолевых клеток. Впервые дана количественная характеристика динамики отбора на терморезистентность в популяции клеток перевивной опухоли - рабдомиосаркомы РА-2 крыс с органотропным метастазированием и показано, что массовый отбор на повышение терморезистентности эффективен вплоть до достижения резистентности к нагреву при 45°C в течение 20-30 мин. Получен штамм перевивной рабдомиосаркомы крыс с наследственно обусловленной повышенной терморезистентностью. Дана характеристика прививаемости, кинетики роста экспериментальных метастазов, плоидности, генетической стабильности и радиорезистентности полученного штамма. Впервые показано, что отбор в популяции опухолевых клеток на повышение терморезистентности сопровождается повышением радиорезистентности опухолевых клеток и замедлением темпов формирования экспериментальных метастазов. Впервые показано, что метастатический потенциал спонтанно возникающих в популяции терморезистентных опухолевых клеток ниже, чем метастатический потенциал термочувствительных клеток, однако, в ходе дальнейшей селекции терморезистентных вариантов их метастатический потенциал может быть повышен до исходного уровня. Изучение динамики отбора позволяет рассматривать резистентность опухолевых клеток к нагреву при температурах $43-45^{\circ}\text{C}$ как количественный (полигенно обусловленный) признак с низкой наследуемостью.

Практическая ценность. Полученные данные, характеризующие динамику отбора на терморезистентность в популяции клеток перевивной

опухоли представляют интерес с точки зрения совершенствования методов гипертермии опухолей. Полученный в результате работы органотропный терморезистентный штамм РА-21 крыс может быть использован для скрининга химиопрепаратов, избирательно действующих на опухолевые клетки, нечувствительные к термотерапевтическим воздействиям.

Получение штамма с наследственно обусловленной терморезистентностью и радиорезистентностью опухолевых клеток будет способствовать исследованию молекулярно-генетических механизмов клеточной терморезистентности и радиорезистентности клеток.

Полученные данные, характеризующие динамику отбора в клеточной популяции по количественному (полигенно обусловленному) признаку, важны для разработки новых методов селекции клеточных штаммов-продуцентов.

Публикации и апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 6 работ. Результаты исследования докладывались на лабораторных семинарах Лаборатории генетики клеточных популяций Института цитологии АН СССР, на I Всесоюзном симпозиуме "Применение гипертермии в онкологии" (Москва, 1986), на III Всесоюзном совещании по генетике соматических клеток в культуре (Звенигород, 1986), на V Всесоюзном симпозиуме "Управление радиочувствительностью опухоли и нормальных тканей" (Алма-Ата, 1987), на I Всесоюзном симпозиуме "метагазирование злокачественных опухолей. Новые подходы" (Киев, 1987).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах, включая 7 таблиц, 17 рисунков, приложения и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы, список литературы из 171 публикации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проводили в клеточной популяции субштамма перевивной органотропной рабдомиосаркомы РА-2 крыс, прошедшей длительную селекцию на органотропность к легким и злокачественность (Степаньян, 1980; Каминская, 1986). Работа была начата с легочными клонами 164-го цикла отбора на повышение злокачественности, полученного от Е.В. Каминской.

В эксперименте использовали самок белых беспородных крыс весом 100-130 г (разводка питомника АМН СССР "Рапполово").

Клонирование в у ловиях *in vivo* проводили по стандартной методике методом легочных колоний (Hill, Bush, 1969; Степаньян, 1980; Каминская, 1986).

Клетки, а также опухолевую ткань легочных клонов и их подкожных трансплантатов нагревали в среде Хенкса ($\text{pH} \pm 7.2$) в ультратермостате U-10 (точность нагрева 0.1°C), перед прививкой материал выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре. Теплоустойчивость клеток рабдомиосаркомы РА-2 оценивали по критерию репродуктивной гибели клеток в условиях *in vivo* (Пелевина и др., 1977), теплоустойчивость клонов и их трансплантатов - по проценту торможения роста (Эмануэль, 1977). Теплоустойчивость интерфейсных клеток к 5-минутному нагреву определяли с помощью окраски 0.01% нейтральным красным (Auerberg, 1966; Wolman, 1965).

Построение кривых доза-эффект и вычисление D_{50} проводили по общепринятой методике (Henle et al., 1976; Bhuyan, 1979).

При отборе на терморезистентность суспензии клеток подвергали *in vitro* нагреву при 43°C заданной продолжительности, от выживших клеток получали клоны методом легочных колоний, и клетки полученных клонов вновь подвергали действию повышенной температуры. В каждом последующем цикле отбора время нагревания увеличивали на 5 мин, а затем использовали, как правило, варианты, выжившие после наибольшей продолжительности нагревания. Клетки этих же вариантов вводили животным без нагревания для тестирования их клоногенной способности (контроль). С XI цикла отбор начали проводить на устойчивость к 44°C , с XV - на устойчивость к 45°C .

В каждом цикле отбора регистрировались: режим термального воздействия; доза в/в вводимых нагретых и ненагретых клеток; число клонов в легких привитых животных; число клонов в легких привитых животных в пересчете на 10^5 клеток (КОЕ); величина КОЕ в процентах к контролю. Величину КОЕ в контрольных и опытных вариантах выражали в процентах от КОЕ штамма РА-2, служившего исходным материалом для селекции на терморезистентность.

Кинетические параметры роста клонов определяли по Эмануэлю (Эмануэль, 1977), при этом использовали метод спрямления кривой

(Снедекор, 1961) и регрессионный анализ (Спиридонов, Лопаткин, 1970).

Цитофотометрия мазков опухолевых клеток, окрашенных по Фельгену (гидролиз в 5 N HCl, 45 мин при 37°C): проводили на цитофотометре Morphoquant (K. Zeiss) при $\lambda = 550$ нм, проточную флуориметрию на приборе ИЦ СССР (Третьяков, 1983).

Частоты геномных мутаций (ЧГМ) вычисляли на основании данных цитофотометрии (Вахтин, 1974), учитывая 5% погрешность цитофотометрического метода (Агроскин, 1967).

Коэффициент наследуемости термочувствительности клонов определяли по коэффициенту корреляции между процентом торможения роста клонов и процентом торможения роста полученных от них трансплантатов (Вахтин, 1984; Исмаилов, 1986).

Радиочувствительность клеток определяли методом легочных колоний (Hill, Bush, 1969; Целевина и др., 1977) и по прививаемости в переднюю камеру глаза крыс (Швембергер, 1976). За 1 ч до прививки суспензию клеток при комнатной температуре облучали на рентгеновском аппарате РУФ-1, фильтр I.0 Cu, 257 р/мин; дозы облучения 1-10 Гр.

При совместном действии повышенной температуры и облучения суспензии клеток нагревали при 44°C в течение 20 мин и через 5-10 мин после нагревания облучали в дозах 1-10 Гр.

Интенсивность синтеза белка устанавливали по включению ³⁵S-метионина, который в концентрации 0,8-0,9 МБк/мл, добавляли в среду без метионина с 10% сыворотки. Через 1 ч инкубации клетки лизировали путем замораживания-оттаивания (3 цикла). Для определения радиоактивности лизат переносили на фильтры и промывали последовательно 10%-ной ТХУ и 90%-ным этиловым спиртом.

Белковый состав исследовали электрофоретически в 12%-ном полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия, по методу Лемли (Laemli, 1970) с последующей флуорографией. Окрашенные гели и пленки после флуорографии фотометрировали на микроденситометре.

Статистическая обработка материала проводилась по: Рокицкий, 1973; Урбах, 1975.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Термочувствительность РА-2. Как показывает рис. 1, в популяции клеток РА-2 наблюдается описанное многими авторами (Giovanella et al., 1973; Nielsen, Overgaard, 1979; Simonds et al., 1984) изменение характера дозных кривых при переходе от температуры 41-42° к температурам 42,5-43°С и выше. Величины D_0 на начальных этапах репродуктивной гибели клеток существенно меньше величин D_0 при более продолжительном нагреве. При 43° D_0 для начального отрезка кривой равно 1,6 мин, а для последующего - 4,9 мин. При температуре 44° величины D_0 равны 1,6 и 4,0 мин, при 45° - 1,2 и 2,0 мин, соответственно.

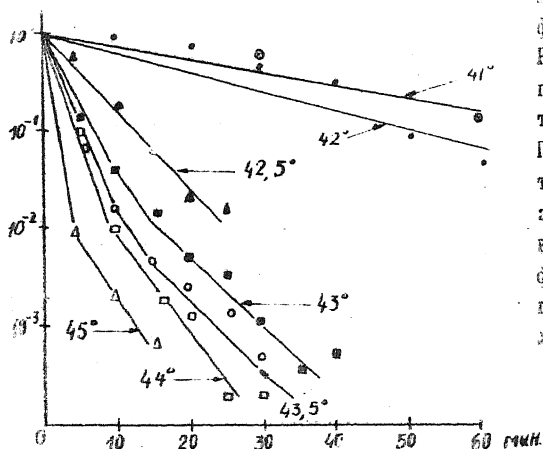


Рис. 1. Изменение величины фракции клоногенных клеток РСМ РА-2 при различной температуре и продолжительности нагрева *in vitro*. По горизонтали - продолжительность нагрева суспензии клеток, мин; по вертикали - величина выжившей фракции клоногенных клеток при тестировании методом меченых колоний.

Полученные данные показывают, что в популяции клеток РА-2 обнаруживаются две различающиеся по термочувствительности фракции клоногенных клеток. Экспозиция в течение 30 мин при 43°С снижает клоногенную способность примерно в 1000 раз, причем в течение 0,5 - 1 мин после такого нагрева первичные термальные повреждения не репарируются. Однако, начать селекцию с нагрева 43° в течение 30 мин не удалось - к III циклу все отобранные варианты погибли. Селекци-

ально поставленные опыты показали, что и при более мягком режиме нагрева 43° 25 мин коэффициент наследуемости признака "терморезистентность" в популяции клонов РА-2 достоверно не отличается от 0 ($\chi^2 = 0.05$), хотя фенотипически исследованная популяция гетерогенна по термочувствительности. Очевидно, при такой интенсивности нагрева в популяции РА-2 происходит неселективная гибель клеток (Ушаков, 1982, 1984), что связано с пороговым проявлением признака на прямолинейном участке дозных кривых (Вахтин, Исмаилов, 1986).

Изменение терморезистентности клеток в процессе отбора. Термальный отбор при более мягком режиме нагрева оказался эффективным (табл. I). К X циклу отбора доля клеток, сохраняющих репродуктивную способность после нагрева 43° 30 мин повысилась примерно в 100 раз, причем значительная часть клеток сохраняла репродуктивную способность и после более продолжительного нагрева - 60 - 90 мин.

Достигнутый уровень устойчивости к нагреву 43° 30 мин сохранялся на протяжении 7 пассажей без поддерживающего отбора (рис. 2), что указывает на наследственный, а не модификационный характер полученного в ходе отбора повышения терморезистентности.

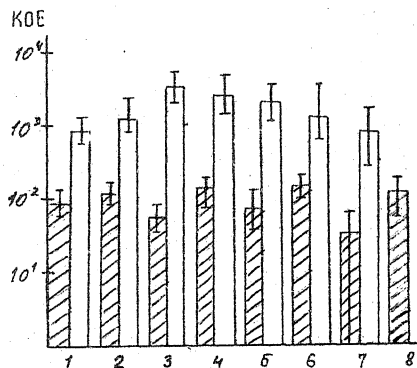


Рис. 2. Клоногенная способность в норме (□) и после нагрева 43° 30 мин (▨) клеток XVII цикла при в/в пассировании без поддерживающего отбора.

По вертикали - клоногенная способность (число легочных клонов на 100 тыс. в/в введенных клеток).

1-8 - пассажи без поддерживающего отбора.

При продолжительном нагреве выживаемость клеток зависит не только от их первичной теплоустойчивости, но и от способности

клеток повышать резистентность в ответ на термальное воздействие (Александров, 1985). Чтобы продолжать отбор на повышение первичной терморезистентности температура нагрева с XI цикла была повышена до 44° , а продолжительность нагрева была сокращена до 5-15 мин. Ступенчатый отбор при 44°C также оказался эффективным (табл. I). К XVII циклу отбора свыше 1% клеток стали выживать после нагрева 30 мин и более. Устойчивость к нагреву 44° 30 мин сохранялась без поддерживающего отбора в течение 2 пассажей, затем доля резистентных клеток падает.

При переходе к нагреву при 45°C отбор на повышение терморезистентности продолжал быть эффективным вплоть до XXIII цикла (табл. I). Последующие 10 циклов отбора не привели к повышению доли клеток, сохраняющих репродуктивную способность после нагрева в течение 25-35 мин.

Показатели терморезистентности отселектированного субштамма PA-2T. В отселектированном штамме PA-2T, как и в исходном штамме PA-2 обнаруживаются две фракции клеток, различающиеся по термочувствительности (рис. 3). По критерию "репродуктивная гибель" D_{50} клеток PA-2T при 43°C равно 10 мин (в 2-5 раз больше, чем у PA-2), при 44°C - 4.9 и 14 мин (в 3 раза больше, чем у PA-2), при 45°C - 2 и 12 мин (в 1.5 - 6 раз больше, чем у штамма PA-2).

Различия между штаммами PA-2 и PA-2T выявлены и по критерию "интерфазная гибель клеток". У варианта PA-2T, отселектированного на устойчивость к нагреву 44° 30 мин, после 5-минутного нагрева $LD_{50} = 49.2^{\circ}\text{C}$, а $LD_{80} = 50.6^{\circ}\text{C}$, в то время как у исходного штамма PA-2 $LD_{50} = 48.2^{\circ}\text{C}$, а $LD_{80} = 50.8^{\circ}\text{C}$. У варианта PA-2T, отселектированного на устойчивость к 45° 20 мин LD_{50} повысилось до 49.8° , а LD_{80} до 52° . После размножения клеток без поддерживающего отбора в течение 1 пассажа (то есть через 46 сут после термального воздействия на клетки-родоначальницы клонов) показатели терморезистентности по этому критерию у обоих вариантов PA-2T не изменились, что свидетельствует о наследственном, а не модификационном повышении терморезистентности в ходе проводившегося термального отбора.

Использование прижизненного окрашивания нейтральным красным

Таблица I

Величины выживших фракций клеток (в % к контролю) на разных циклах термального отбора в популяции клеток РА-2

Циклы отбора	Время нагревания, мин									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Нагрев при 43°C										
1-3	1.0	14.0	6.7	1.9	0.5	0.1				
4-6		5.0	11.0	12.5	4.5	2.0				
7-9				24.0	16.5	11.3	7.9	2.0		
10-12*							9.6	6.9	4.7	3.4
Нагрев при 44°C										
11-13	1.6	2.0	1.2	1.3						
14-16			5.0	2.2	1.3	0.4	0.2			
17-19					0.5	1.3	1.7	1.7	0.6	
20-22				3.2	1.3	1.5	0.2			
23-25					2.2	1.9	1.2	0.8	0.2	
26-28						1.7	0.1	0.1		
29-31						0.7	1.2	0.9	0.5	0.01
32-33							1.1	1.2	1.0	0.07
Нагрев при 45°C										
16	1.6	0.1	0.1							
17-18		1.5	1.2	0.15	0.07					
19-21				0.3	0	0.9				
22-24		2.7	1.4	0.9	1.5	1.9				
25-27				0.04	0.2	0.03	0.02			
28-30				0.8	0.3	0.2	0			
31-33				0.5	0.7	0.5	1.03			

Примечание: Контроль - клетки того же цикла отбора, привитые без нагревания. * - после нагрева 60 мин выжил 1.0% клеток, после нагрева 90 мин - 0.4%.

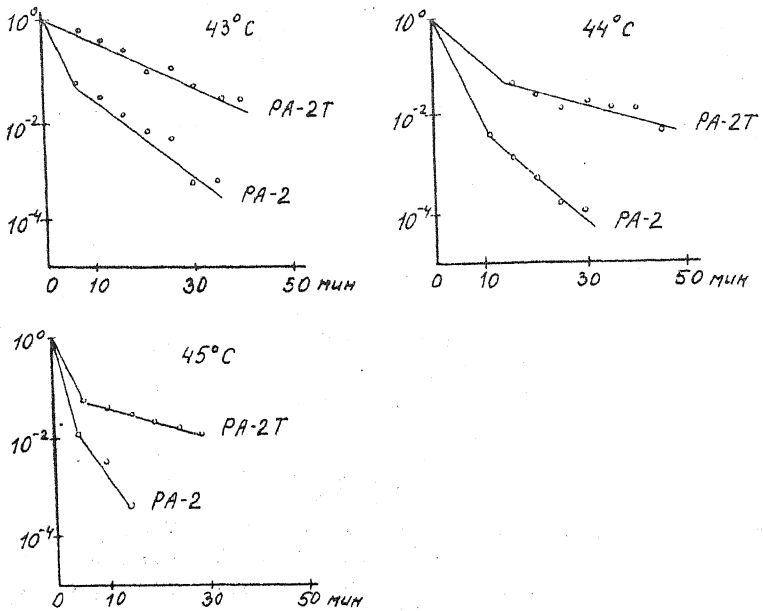


Рис.3. Изменение величины фракции выживших клоногенных клеток рабдомиосаркомы PA-2T при различной температуре и продолжительности нагрева *in vitro*.

По горизонтали - продолжительность нагрева суспензии клеток, мин; по вертикали - величина фракции выживших клоногенных клеток при тестировании методом легочных колоний.

позволило обнаружить способность клеток PA-2 и PA-2T "закаливаться" при использованной нами продолжительности термального воздействия (рис. 4). Хотя повышение термотолерантности наблюдается при температурах, вызывающих практически полную репродуктивную гибель клеток, способность клеток PA-2T повышать первичную терморезистентность в ответ на нагревание указывает, по нашему мнению, на перспективность дальнейшего термального отбора.

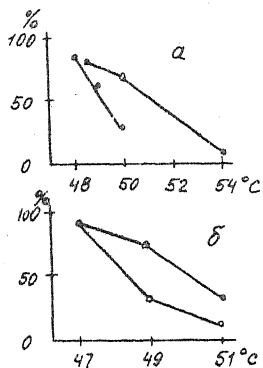


Рис. 4. Влияние предварительного нагрева на первичную теплоустойчивость клеток РА-2 (а) и РА-2Т (б), определенную по способности к гранулообразованию нейтрального красного.

По горизонтали - температура 5-минутного нагрева; по вертикали - число клеток с гранулами (в % к контролю).

1 - без предварительного нагрева; 2- те же суспензии клеток после предварительного нагрева 20 мин при 45°C (а), 25 мин при 45°C (б).

Изменение показателей злокачественности в ходе термального отбора. На протяжении всего термального отбора проводилось определение клоногенной способности в контрольных вариантах - потомствах клоногенных клеток, не подвергавшихся термальному воздействию. Как показывает рис. 5, термальный отбор вызвал резкое (в 2-3 раза) падение клоногенной способности клеток, определяемой методом легочных колоний. В дальнейшем в ходе отбора на резис-

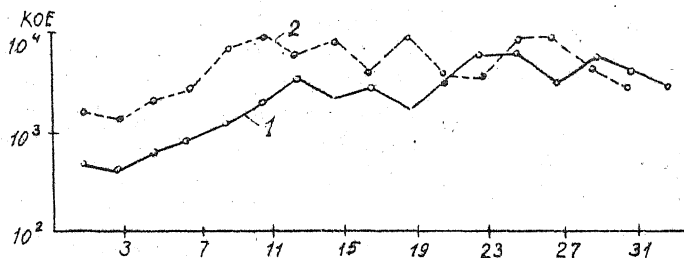


Рис. 5. Клоногенная способность клеток, не подвергавшихся термальному воздействию, на разных этапах селекции штамма РА-2Т (1) и у исходного штамма РА-2 (2).

По горизонтали - циклы термального отбора; по вертикали - число экспериментальных метастазов в легких на 100 тыс. внутривенно введенных клеток.

тентность к 43°C величина КОЕ у РА-2Т непрерывно повышалась. Переход к отбору при 44 и 45°C вызывал кратковременное падение клоногенной способности, после чего этот показатель вновь повышался. В результате, к 23-33 циклам отбора величина КОЕ у РА-2Т достигла уровня, характерного для исходного штамма РА-2. Полученные результаты показывают, что наследственно терморезистентные варианты клеток РА-2 обладают пониженным метастатическим потенциалом по сравнению с термочувствительными клетками этой же популяции, однако в ходе селекции злокачественность клеток по этому показателю может быть повышена до исходного уровня.

Уже на первых циклах отбора темпы формирования легочных метастазов клетками РА-2Т заметно понизились, из-за чего интервалы между пассажами пришлось увеличить на несколько дней. Заметных изменений динамики формирования легочных клонов в ходе термального отбора не наблюдалось. Анализ кинетики роста легочных метастазов (рис. 6) обнаружил удлинение латентного периода их роста по сравнению с РА-2, в то время как среднее время удвоения числа клеток в логарифмическую фазу роста не изменилось.

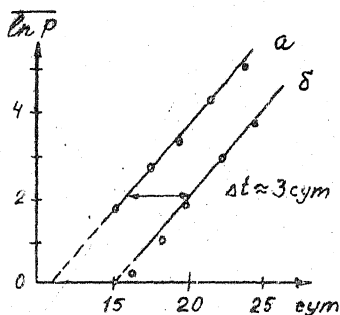


Рис.6. Зависимость средних значений логарифмов весов клонов ($\overline{\ln P}$) рабдомиосаркомы РА-2 (а) и РА-2Т (б) от времени их роста.

По горизонтали — время после внутривенного введения клеток, сут; по вертикали — среднее значение натуральных логарифмов весов клонов ($\overline{\ln P}$).

Плоидность клеток и частота геномных мутаций. Как показывают ДНК-гистограммы на рис. 7, уровень плоидности клеток селективируемой популяции в ходе термального отбора не изменился. Не различались и модальные классы G_1 и G_2 клеток РА-2 и РА-2Т по содержанию ДНК, определенному методом фельгеновской цитофотометрии. Таким образом, повышение терморезистентности клеток в ходе отбора не обусловлено изменениями уровня их плоидности.

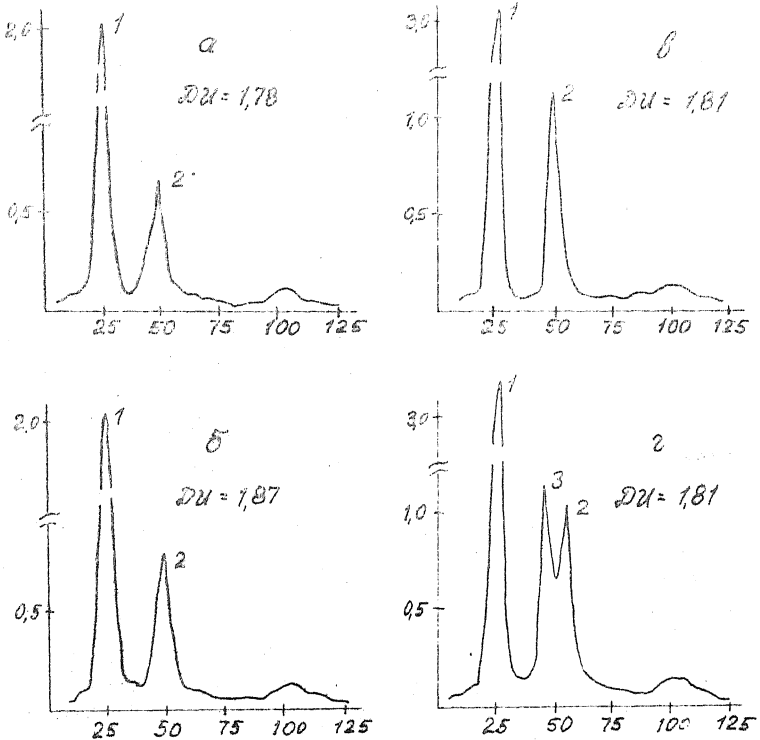


Рис.7. ДНК-гистограммы распределения клеток клонов РМС РА-2 и РА-2Т крыс по данным проточной флуориметрии.
По горизонтали - содержание ДНК, отн.ед. (каналы); по вертикали - количество клеток, тыс.
а - смесь клеток 25 клонов РА-2; б - смесь клеток 25 клонов РА-2Т X-го цикла отбора; в, г - смесь клеток 25 клонов РА-2Т XXXIII-го цикла отбора.
1 - диплоидные клетки стромы клонов (лимфоциты); 2 - G_1 -опухольные клетки; 3 - эритроциты лягушки.

При неизменном уровне плоидности в популяции клеток РА-2Т резко понизилась частота геномных мутаций (табл. 2). Следует отметить, что само по себе термальное воздействие вызывает повышение внутриклональной вариабельности клеток по регистрируемому содержанию ДНК-фуксина, поэтому снижение частот геномных мутаций у клеток РА-2Т нельзя объяснить длящимся десятилетиями клеточных поколений "температурным последствием", вызывающим снижение внутриклональной вариабельности сорбции фуксина.

Радиорезистентность клеток РА-2 и клеток РА-2Т. Сочетанная радиотермотерапия широко применяется в клинической практике, в связи с чем представляло интерес изучить радиорезистентность клеток РА-2Т и клеток исходного штамма РА-2. Как показывают данные рис. 8, в диапазоне доз 1-10 Гр радиочувствительность РА-2Т намного выше, чем радиочувствительность РА-2. По величине D_{50} РА-2Т превосходит РА-2 в полтора раза (соответственно 2.4 и 1.6 Гр). Повышенная радиорезистентность клеток РА-2Т была обнаружена и в опытах с прививкой облученных клеток в переднюю камеру глаза крыс. Различия по радиорезистентности между РА-2 и РА-2Т наблюдались и при облучении после предварительного термального воздействия на клетки этих штаммов (рис. 8).

Синтез белков теплового шока. Клетки РА-2 и клетки РА-2Т не различались по конститутивному синтезу белков теплового шока. Нагревание при 42 и 44°C в течение 60 мин индуцировало в клетках синтез белков теплового шока, однако различий в индуцибельном синтезе БТШ при указанных воздействиях также не было обнаружено.

В целом, полученные данные показывают, что примененный нами отбор на повышение терморезистентности оказался эффективным. В ходе селекции наблюдается медленное повышение средней терморезистентности селективируемой популяции. Подавляющее большинство потомков отбираемых терморезистентных вариантов резко уступает по терморезистентности клеткам-родоначальницам, что не должно было бы наблюдаться при отборе мутантов с резко повышенной резистентностью. В ходе отбора признак "теплоустойчивость" ведет себя как количественный (полигенно обусловленный) признак с низкой наследуемостью. Поведение этого признака в ходе термального отбора хорошо согласуется с литературными данными, согласно которым тепло-

Частоты генетических мутаций в популяции клеток рабдомиосаркомы РА-2 в и популяции клеток, полученного в ходе термального отбора субштамма РА-2Т (10%)

Субштамм	Без учета погрешностей		С учетом погрешностей			
	цитофотометрии	гип плоиды гиперплоиды всего	цитофотометрии	гипоплоиды гиперплоиды всего		
РА-2	7.4±0.58	11.16±1.18	20.78±1.02	4.53±0.37	6.20±0.00	11.37±0.76
РА-2 + (45°, 20 мин)	9.92±1.01	13.70±1.52	26.33±1.52	8.13±1.01	8.13±1.02	17.72±1.01
РА-2Т	4.17±1.52	12.41±1.23	17.95±1.02	2.04±0.74	5.45±0.59	7.74±0.36

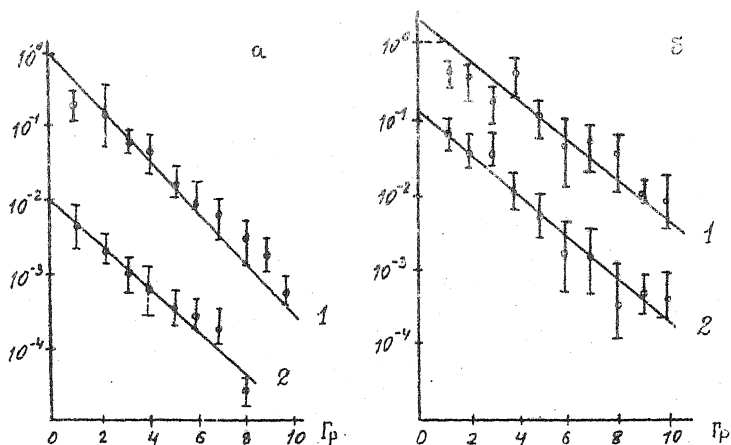


Рис.8. Влияние облучения *in vitro* клеток рабдомиосаркомы РА-2 (а) и ее терморезистентного варианта РА-2Т (б) на их колониобразующую способность в условиях *in vivo*.

По горизонтали - доза облучения, Гр; по вертикали - фракция выживших клоногенных клеток.

1 - без предварительного термального воздействия на клетки;
2 - клетки перед облучением нагревали *in vitro* в течение 20 мин при 44°C.

устойчивость клеток зависит от многих независимо генетически программируемых клеточных признаков (Александров, 1988). При повышении интенсивности термального воздействия в популяции начинает преобладать неселективная гибель клеток, из-за чего средняя терморезистентность в потомствах отобранных вариантов сколько-нибудь заметно не повышается. По-видимому, на прямолинейных участках дозных кривых наблюдается пороговое проявление признака "теплоустойчивость" (см. Вахтин, Исмаилов, 1988), что должно препятствовать эффективности отбора при термальных воздействиях, при которых выживает менее 1% клеток.

Отбор на повышение терморезистентности повлек за собой изменение целого ряда других признаков - клоногенной способности, тем-

пов формирования легочных метастазов (клонов), спонтанной частоты геномных мутаций и радиорезистентности. Вместе с тем, плоидность клеток и синтез клетками БТШ не изменились. Причины корреляции между терморезистентностью, также как причины отсутствия связи между терморезистентностью и способностью клеток синтезировать БТШ, описанной многими авторами (Schlesinger et al., 1952; Hahn, Li, 1962; Landri et al., 1965), в настоящее время не ясны.

Повышение клоногенной способности у терморезистентных вариантов в ходе селекции до исходного уровня объясняется скорее всего тем, что нами проводился массовый, а не индивидуальный термальный отбор - в большинстве циклов отбора тестировались суспензии, представляющие смесь клеток 10 и более клонов. У штамма PA-2 как и у других высокозлокачественных опухолевых штаммов, межклональные различия по клоногенной способности очень велики и наследственно обусловлены, из-за чего в клеточной популяции в ходе пассирования по принятой нами методике идет эффективный отбор на повышение клоногенной способности (Fidler, 1976, 1984; Степаньян, 1980; Исмаилов, 1980; Каминская, 1986). По-видимому, подобный же спонтанный отбор, протекавший на фоне высокого уровня наследственной изменчивости (табл. 2), и привел к восстановлению клоногенной способности PA-2T до исходного уровня.

Как известно (Виленчик, 1976), при повышении температуры частота первичных наследственных повреждений в клетках резко повышается, а нерепарируемые генетические повреждения являются основной причиной репродуктивной гибели клеток (Хансон, Комар, 1985). По-видимому, этим объясняется снижение спонтанной частоты геномных мутаций в популяции клеток P⁻2, прошедших длительную селекцию на повышение терморезистентности и одновременное резкое повышение радиорезистентности клеток этой же популяции. Положительная корреляция между радиорезистентностью и терморезистентностью клеток организмов разных видов описана рядом авторов (Александров, 1985); судя по полученным нами результатам, подобные корреляции могут наблюдаться и в популяциях злокачественных опухолей.

Особенности полученного в ходе отбора штамма PA-2T делают его перспективным для исследования по цитологии, генетике опухолевых клеток и экспериментальной онкологии. В частности, полученный штамм PA-2T может быть использован для изучения влияния температу-

ды на изменение активности генетического материала, механизмов, обуславливающих повышенную терморезистентность клеток, в ряде других проблем клеточной биотехнологии.

В исследованиях по экспериментальной онкологии субштамм PA-2T может быть использован для скрининга лекарственных препаратов, избирательно подавляющих рост и метастазирование терморезистентных вариантов опухолевых клеток, для изучения сравнительной лекарственной чувствительности термочувствительных и терморезистентных опухолевых клеток, особенностей их метастазирования в ряде других вопросов, важных для повышения эффективности термотерапии злокачественных новообразований человека.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризована динамика ступенчатого отбора в популяции клоногенных (способных формировать экспериментальные метастазы) клеток переносной органотропной рабдомиосаркомы PA-2 крыс на резистентность к нагреву 5-60 мин при 43°C, последующего отбора на резистентность к нагреву 5-40 мин при 44°C и дальнейшего отбора на резистентность к нагреву 5-30 мин при 45°C.

2. Массовый ступенчатый отбор (при нагреве *in vitro* и выделении терморезистентных вариантов методом легочных колоний) оказался эффективным на протяжении более 20 циклов вплоть до нагрева 30 мин при 45°C. 10 циклов дальнейшего термального отбора не привели к повышению достигнутого уровня терморезистентности. На основании данных по кинетике термального отбора признак "теплостойчивость" в популяциях опухолевых клеток следует отнести к категории количественных (полигенно обусловленных) признаков с низкой наследуемостью.

3. В результате термального отбора D_{50} клеток селективируемого штамма по критерию "репродуктивная гибель" возросло с 1.6 - 4.9 мин до 10 мин при 43°C, с 1.6 - 4.0 до 4.9 - 14 мин при 44°C и с 1.2 - 2 до 2 - 12 мин при 45°C, а LD_{50} по критерию "интерфазная гибель" - на 1-2°C.

4. Достигнутое в ходе отбора повышение терморезистентности является наследственно обусловленным. В популяции клеток полученного субштамма PA-2T устойчивость к нагреву 43°, 30 мин ведет се-

бя как наследственно закрепленный признак, устойчивость к нагреву 44° , 30 мин и устойчивость к нагреву 45° , 30 мин - как наследственно метастабильный признак.

5. Клоногенная способность понизилась на первых этапах отбора в 2-3 раза, в ходе дальнейшей селекции она повысилась вплоть до уровня, характерного для исходного штамма РА-2.

6. Терморезистентные варианты клоногенных клеток РА-2 отличаются от термочувствительных замедленными темпами формирования легочных метастазов, что обусловлено удлинением латентного периода роста метастазов на 3 сут.

7. В процессе термального отбора уровень плоидности клеток РА-2 не изменился, частоты геномных мутаций снизились с 11.37×10^{-2} до 7.74×10^{-2} на клетку на поколение, радиорезистентность резко повысилась (с $D_0 = 1.6$ Гр до $D_0 = 2.4$ Гр), заметных изменений в синтезе белков теплового шока не произошло. Полученные данные позволяют предполагать, что в ходе термального отбора произошло повышение активности ферментов, репарирующих повреждения ДНК, в клетках селекционируемого штамма.

8. Полученный штамм перевивной органотропной рабдомиосаркомы крыс, отличающийся по теплоустойчивости и ряду других признаков от штамма РА-2, может быть использован для исследований по цитологии, генетике и экспериментальной онкологии, в том числе для скрининга лекарственных препаратов, избирательно поражающих резистентные к термотерапевтическим воздействиям опухолевые клетки.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Трусова В.Д., Вахтин М.И. Термальный отбор в популяции клеток перевивной рабдомиосаркомы РА-2 крыс // ДАН БССР. - 1987. - Т.31. - № 10. - С.938-940.
2. Трусова В.Д. Отбор на повышение терморезистентности в клеточных популяциях перевивных рабдомиосарком // Тезисы Всесоюзной конференции по генетике соматических клеток в культуре, Звенигород. - 1986. - С.84.
3. Трусова В.Д., Каминская Е.В., Федорова Т.В. эастати эский

- потенциал, кинетика роста метастазов и радиочувствительность терморезистентного субштамма рабдомиосаркомы РА-2 крыс // Тезисы I Всесоюзного симпозиума "Метастазирование злокачественных опухолей. Новые подходы". - Киев. - 1987. - С.130-131.
4. Трусова В.Д., Гужова И.В., Маргулис Б.А., Федорова Е.В., Каминская Е.В., Константинова М.Ф. Механизмы наследственно обусловленной резистентности опухолевых клеток к кратковременному термальному воздействию // Тезисы I Всесоюзного рабочего совещания "Биофизика рака". - Черногородка. - 1987. - С. 135.
5. Вахтин Ю.Б., Трусова В.Д., Федорова Е.В., Гужова И.В., Каминская Е.В., Константинова М.Ф., Маргулис Б.А. Терморезистентность и радиорезистентность опухолевых клеток // В сб.: Управление радиочувствительностью опухоли и нормальных тканей. - Алма-Ата. - 1988. - С.22.
6. Трусова В.Д., Григорьева Э.Г., Штейн Г.И., Полищук Е.В. Изменчивость содержания ДНК в потомствах различающихся по терморезистентности клоногенных клеток перевивной рабдомиосаркомы крыс // В сб.: Материалы II рабочего совещания по цитохимии хроматина. - Л. - 1988. - С.10-11.

Сдано в пр-во 27.03.88 г. Подписано в печать 18.03.88 г.
АТ - 12543 Объем 3 п.л. Тираж 110. Заказ 310.
Формат 60x84 1/16. Бесплатно.

Ротапринт СПТУ № 32 г. Минск, ул. В.Лоружей, 7.