

от основного. Указывается на необходимость проведения кариотипирования разных тканей плода или рожденного ребенка с целью подтверждения истинного либо ограниченного мозаицизма.

Out of 460 amniocyte cultures, 7 cases of mosaicism were detected and cytogenetically analyzed. In 3 cultures sex chromosome mosaicism was detected, in 2 cultures – **marker chromosome** mosaicism, in remaining 2 cultures – deletions and inversions of autosomes. In most of the presented cases, main stimuli for performing invasive prenatal diagnostics were changes in biochemical markers of the blood serum of pregnant women in their 1-st and/or 2-nd trimester. In addition, individual colonies with a phenotype deviant from the main cell phenotype were detected in 4 cultures. Stress is laid on the strong need for performing karyotyping of several tissues from fetus or from the born child in order to confirm a true or tissue-limited mosaicism.

ГУЛЬКО Т.П., КОВАЛЬЧУК М.В.

*Институт Молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150*

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЫШЕЙ, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К СПОНТАННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ.

В экспериментальной онкологии широко используют модели грызунов, особенно, мышей со спонтанными опухолями. Более адекватными моделями онкологических заболеваний человека являются те, которые подразумевают использование животных со спонтанно возникающими новообразованиями. Такие модели широко используются для исследования механизмов возникновения и развития опухолей, т.к. в этих случаях опухоль образуется из клеток организма, подвергшихся спонтанной злокачественной трансформации [1,2].

Исследования на моделях линий мышей, предрасположенных к спонтанным новообразованиям, позволяют приблизиться к пониманию основных биологических свойств неопластических заболеваний человека, и разработать новые эффективные подходы к воздействию с целью лечения или уменьшения риска онкозаболеваний [3].

В нашей работе использовались половозрелые мыши (2-2,5 мес.) линии ICR, которая является потомством аутбредной популяции полученной в Institute of Cancer Research (США), и путем близкородственных скрещиваний животных в сочетании тщательной селекцией поддерживается с начала 80-х годов в виварии Института Молекулярной биологии и генетики НАН Украины [2,3].

Постоянное и широкое использование в экспериментах линейных животных требует регулярных и объективных сведений об их физиологических и молекулярно – генетических особенностях.

Целью данного исследования было изучение некоторых физиологических и молекулярно-генетических особенностей описанной выше популяции мышей. Работа была предпринята для оптимизации использования этих животных в изучении онкогенеза, в частности, развития рака молочной железы, который является одной из самых частых форм злокачественных новообразований у человека и животных [3,4]. Для изучения оптимальных подходов в осуществлении генетических манипуляций был проведен поиск молекулярных маркеров для изучаемой линии. Известно, что фрагменты некодирующих (а потому накапливающих мутации) повторяющихся последовательностей ДНК могут служить молекулярными маркерами как геномов линий, так и индивидуальных геномов. Микросателлитные локусы с большой частотой

встречаются в геноме и достаточно равномерно распределены по длине генома. Длина микросателлитов варьирует в популяции, но наследуется как стабильная аллель. Для генетического маркирования исследуемых мишей линии ICR использовался микросателлитный анализ локуса TNF, который находится в районе главного комплекса гистосовместимости (H-2) 17-й хромосомы, а именно, микросателлитных районов, связанных с генами *Tnfa* и *Tnfβ*. Локус *Tnfa* содержит простые прямые повторы CA, а локус *Tnfβ* – сложные нуклеотидные повторы [8]. Выбор именно этого района был связан с тем, что ген *Tnfa* кодирует противовоспалительный мультифункциональный цитокин, который вовлечен в регуляцию широкого спектра биологических процессов, а именно, воспалительных, пролиферативных, иммунной регуляции, антивирусных ответов. Лимфотоксин, продукт гена *Tnfβ*, также является цитокином, который продуцируется Т-киллерами. Полиморфизм в районах выбранных локусов может быть также полезен в исследовании процессов канцерогенеза [9].

Материалы и методы

В исследованиях использовались половозрелые животные, происходящие от исходной линии ICR, длительно поддерживаемой путем инбредного размножения в виварии ИМБиГ НАН Украины. На протяжении всего жизненного периода фиксировали ряд физиологических (поведенческие качества животных, их характер, длительность жизни животных, плодовитость, жизнеспособность потомства и многие другие), а также онкологических параметров (частота возникновения опухолей, их форма, структура и локализация). Определение вида опухоли производили путем стандартного гистологического исследования срезов ткани, получаемых оперативным путем. Изучались препараты, фиксированные формалином, а также нефиксированные замороженные препараты. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Приготовленные препараты анализировали под микроскопом при увеличении 200х и 400х. Микросателлитные локусы анализировали с помощью ПЦР. Для сравнения использовали лабораторные линии BALB/c, C57BL/6, изученные по анализируемым локусам. Тотальную ДНК из крови отдельных мышей выделяли с помощью тест-системы «BLV-test». Выявление полиморфизма в локусах *Tnfa* и *Tnfβ* проводили с использованием праймеров f(5'GGACAGAGAAGAAATGGGTTTC 3') и r(5'TCGAATCTGGGGCCAATCAGGAGGG 3') для локуса *Tnfa*, а также f(5'TTCCTGTGGCGGCCTTATCAG 3') и r(5'AGACAATGGGTAACAGAGGCA 3') для *Tnfβ* [9]. Реакционная смесь для ПЦР содержала 10х буфер, 2мМ хлорид магния, 0,20мМ нуклеотидтрифосфаты, 0,25мкМ праймеры и Taq-полимеразу «Fermentas» (Литва). Разделение продуктов амплификации проводили в 12% ПААГ с последующей визуализацией в ультрафиолетовом излучении с использованием бромистого этидия.

Результаты и обсуждение

В результате длительного и постоянного наблюдения было отмечено, что животные очень требовательны к условиям ухода, кормления и содержания. Мыши достаточно подвижны, в меру агрессивны. У них отчетливо выражен инстинкт запасаения пищи. Самки дают многочисленное потомство, заботливо относятся к своим детенышам, хорошо выкармливают мышат. Детеныши быстро растут и созревают. Отход детенышей в подсосный период очень низкий (до 3%). Животные обладают достаточно высокой интенсивностью роста и развития.

Биологические параметры изучаемых животных следующие:

Половая зрелость	30-35 дней.
Физиологическая зрелость	45-55 дней.
Продолжительность жизни	до 3 лет (у самцов) до 1,5 лет (у самок)*

Продолжительность беременности	19-21дн.
Плодовитость	6-20 детенышей/помет.
Продолжительность лактации	20-25дней
Масса новорожденных мышат	1,9-2,5г
Возраст отсадки молодняка	21-25дн.

* Причиной более ранней гибели самок является возникновение спонтанных злокачественных опухолей

График изменения веса в зависимости от возраста представлен на рисунке 1.

Эти животные являются привлекательной моделью для исследования канцерогенеза в силу возможности наблюдения за ростом и развитием опухоли на протяжении длительного периода времени. В результате наших исследований была установлена высокая частота спонтанного возникновения опухолей, 80% из которых представлена злокачественными новообразованиями молочной железы (у самок), 10% - раком прямой кишки, и 10% - лейкемией (у самцов). Анализ литературных данных показал, что исследуемые животные по частоте развития спонтанных опухолей молочной железы занимает среди различных линий одно из первых мест [5,6].

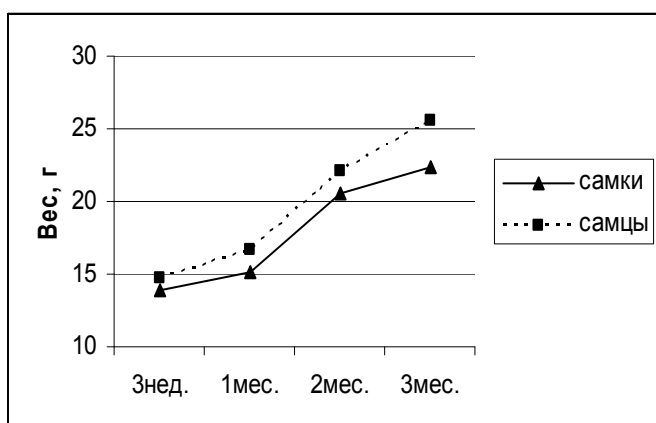


Рис. 1. Изменение веса у мышей различного возраста исследованной популяции, восходящей к линии ICR

Даже у виргинных самок, принадлежащих к этой популяции, частота спонтанного возникновения опухолей превышает аналогичный показатель высокораковой линии A/Sn (39% по сравнению с 22%), что может быть обусловлено генетически детерминированным гормональным

профилем [7]. Частота злокачественных новообразований у рожавших самок еще выше, и составляет более 80%. Предположительно, предрасположенность к злокачественным новообразованиям может наследоваться потомством во время кормления молоком, что позволяет говорить о возможной вирусной природе этих новообразований.

Часто опухоли сопровождаются многочисленными метастазами. Срок появления и развития метастазов у каждого отдельного животного может быть различным. В большинстве случаев у появившихся одиночных или множественных метастазов, расположенных рядом с основной опухолью, определяются те же особенности морфологии и биологические характеристики, что и у первичной опухоли [5]. Возникновение рака молочной железы у самок обычно наблюдается в возрасте 6-8 месяцев, при этом имеет значение возраст самки в момент первых родов. Многие исследователи связывают образование и рост опухоли с генетической нестабильностью, которая повышается с возрастом и сопряжена со способностью неопластических клеток к интенсивной пролиферации [6].

Как и следовало ожидать, опухоли, особенно при длительном существовании, оказывают резко выраженное влияние на организм, вызывая глубокие нарушения обмена веществ, ведущие к всеобщему истощению организма – кахексии и дистрофии. Было отмечено, что опухоли в процессе роста меняют форму и структуру. На начальных этапах развития опухоль определяется в виде маленького плотного узелка, который по мере роста опухоли может видоизменяться, приобретая плотную или рыхлую структуру. Поскольку у мышей 5 пар сосков, то часто спонтанные опухоли бывают множественными с различными местами локализации.

В результате гистологического анализа было установлено, что опухоль молочной железы представляет собой типичную аденокарциному и по своей морфологической характеристике не отличается от описанных ранее опухолей у других линий мышей. Как и в человека, эта опухоль относится к высоко агрессивным злокачественным опухолям вследствие высокой потенции к метастазированию [5]. Метастазы чаще встречаются в подмышечных лимфатических узлах (60%), подключичных (20%) и парастеральных (20%). Безусловно, что на рост и структурную выраженность опухоли сильно влияют индивидуальное состояние животного и индивидуальные биологические особенности организма.

Изучалась также зависимость частоты возникновения опухолей различной локализации опухолей от времени года (рис.2). Путем проведения статистического анализа (критерий χ^2) было показано наличие достоверной разницы между распределением частот опухолей различной локализации в зимне-осенний и весенне-летний период. Летом преобладают опухоли, локализованные в области задних конечностей и гениталий, тогда как в остальное время года частоты таких опухолей сравнимы с частотой опухолей, локализованных в области передних конечностей. Что касается опухолей всех прочих локализаций, то они возникают практически исключительно в зимне-осенний период. Предположительно, это может быть связано или с сезонными колебаниями гормонального фона животных – или же с их возрастными особенностями.

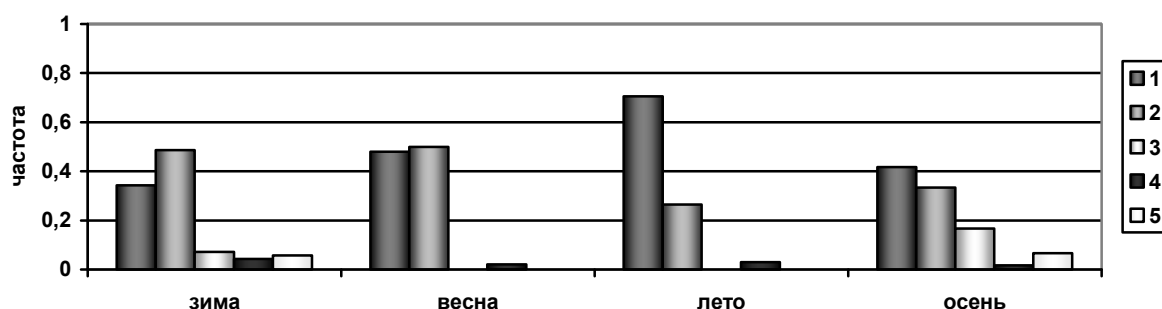


Рис. 2. Локализация спонтанно возникающих опухолей у мышей исследованной популяции, восходящей к линии ICR

1 - область задних конечностей и гениталий; 2 - область передних конечностей; 3 - вентральная поверхность туловища; 4 - латеральная поверхность туловища; 5 - другие локализации

Сравнительный анализ с использованием микросателлитных маркеров показал, что TNFa микросателлиты отличаются по размеру в пределах трех тестируемых лабораторных линий. Для животных линии ICR характерен самый короткий повтор. По локусу *Tnfβ* у линий не обнаружено явной гетерогенности.

Гель-электрофореграмму продуктов ПЦР, полученных с помощью праймеров к вариабельным последовательностям локуса TNFa и *Tnfβ* представлено на рисунке 3.

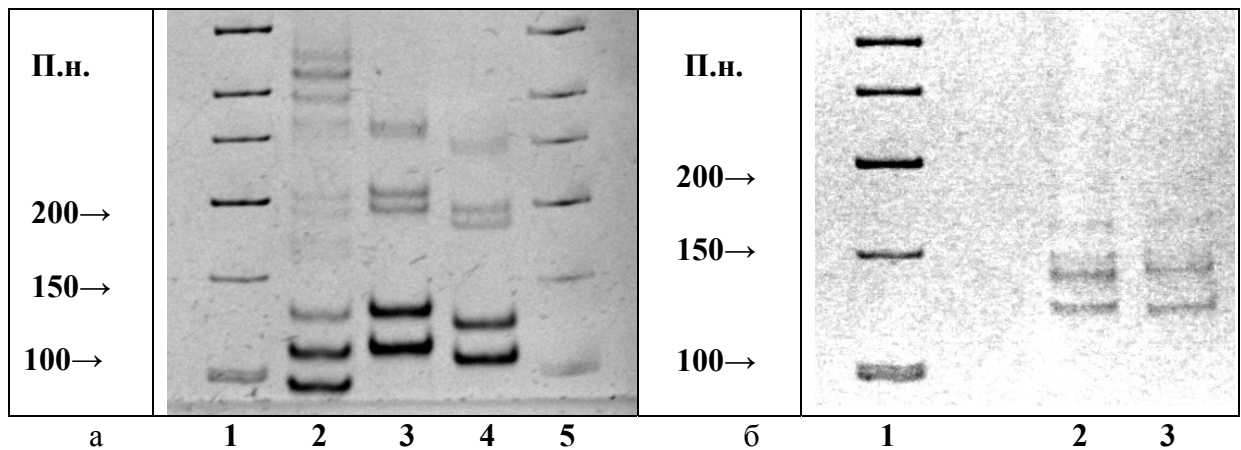


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации, полученных с помощью праймеров к переменным последовательностям локуса TNF α (а) и TNF β (б): 1, 5 – маркер 50 bp DNA Ladder (Fermentas); 2 – линия ICR; 3 – линия BALB/c; 4 – линия C57BL/6

Литература

1. *Медведев Н.И.* Линейные мыши // Ленинград:— Медицина.— 1964.—С.180.
2. *Бланцова З.К., Душкин В.А., Малащенко В.М.* Линии лабораторных животных для медико –биологических исследований //—М. Наука.— 1983.—С.190.
3. *Лобанова З.И., Бланцова З.К.* Онкологическая характеристика мышей инбредных линий // Биология лабораторных животных.—М.1971.—Вып.3.— С.20-22.
4. *Литвинов С.В., Крюкова И.Н.* Молекулярно-генетические основы онкогенного действия вируса рака молочной железы мышей // Эксп. Онкол.— 1985.—Т.7, № 1.—С. 3-10.
5. *Мартынова Р.П., Роничевская Г.М., Диденко В.И.* // Морфологическая характеристика спонтанных опухолей молочных желез, возникших у мышей высококорактовых линий А и СЗН // В. Лабораторные животные в медицинских исследованиях. Тез. конф.— Москва.— 1974.—С. 35-39.
6. *Ковалева О.А., Вагина И.Н., Морозова Л. М., Глазко Т.Т., Глазко В. И.* Генетическая нестабильность и предрасположенность к развитию опухолей у лабораторных линий мышей // Доп. НАН України. — 2007. — № 2. — С. 158-162.
7. *Kharkovskaya N.A., Krasnova N.N., Klepicov N.N., Khrustalev S.A.* Oncologic and genetic characteristics of A/Sn mice // Exp.Oncol. – 2000. – Vol.22. – P. 157 – 159.
8. *Love J.M., AM Knight A.M., McAleer M. A.* Towards construction of a high resolution map of the mouse // Nucleic Acids Research. — 1990. — Vol.18, № 14. — P.4123 - 4130.
9. *Abdolhossein Rezaeian, Mohammad hossein Alimohammadian, Sirous Zeinali.* Microsatellite analysis of mouse TNF and Cypla2 loci for polymorphism: detection and evaluation of genetic contamination // Scand. J. Lab. Anim. Sci. — 2003. — Vol. 30, № 3. - P.143-149.

Резюме

Представлены некоторые характеристики исследуемых мышей линии ICR, предрасположенных к опухолям. Выявлена высокая и стабильная частота возникновения спонтанных новообразований, из которых 80% представляют рак молочной железы у самок. Показана возможность использования гетерогенности по локусу TNF α для генетических манипуляций и микросателлитного маркирования линии.

Представлено окремі характеристики досліджуваних мишей лінії ICR, схильних до утворення пухлин. Виявлена висока і стабільна частота появи новоутворень різної локалізації і гістогенезу, із яких 80% являють рак молочної залози у самок. Показана можливість використання гетерогенності локусу TNF α для генетичних маніпуляцій та микросателітного маркування лінії.

The biological and oncologic characteristics of mice line ICR predisposed to swellings were introduced. The high and stable frequency of appearing of spontaneous neoplasms different localization and histogenesis was detected; 80 % of malignant swellings are breast cancer. The possibility of using locus TNF α heterogeneity for genetic manipulations was shown.

ГУЛЬКО Т.П., ЛИХАЧЕВА Л.И., МАЦЕВИЧ Л.Л., КОРДИУМ В.А.

Институт Молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150

ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ СМЕСИ (БАС) НА ЧАСТОТУ СПОНТАННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У МЫШЕЙ

Профилактика онкологических заболеваний является актуальной задачей. Многочисленные исследования показали сходство многих аспектов канцерогенеза у человека и животных. Особенно это просматривается в выяснении вопросов этиологии, патогенеза, процесса роста опухолей у животных. Поэтому современная экспериментальная онкология активно использует разнообразные животные модели. Для каждого конкретного исследования экспериментатор выбирает модель, учитывая ее особенности и адекватность поставленной задачи, достоинства и недостатки. Классическими объектами экспериментальной онкологии являются линии грызунов, прежде всего, мышей, характеризующиеся повышенной частотой спонтанного возникновения опухолей [1-3].

В данной работе использовались мыши отечественного разведения линии ICR с высокой частотой возникновения спонтанных опухолей (рак молочной железы), содержащиеся на базе вивария Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Эти животные были впервые выведены в Institute of Cancer Research (ICR) и завезены к нам, как аутбредная популяция мышей со спонтанным возникновением опухоли – рака молочной железы у самок.

В результате длительного близкородственного скрещивания и тщательного отбора животных по таким признакам, как выживаемость, жизнеспособность потомства и опухоленосительство, получена и стабильно поддерживается нами высоко инбредная и высокоракочная так называемая сублиния мышей отечественной разводки линии ICR [3,4].

Для животных этой линии характерна высокая частота спонтанного возникновения опухолей молочной железы различной локализации у самок 6 - 8-месячного возраста. А к 1,5 годам от опухолей погибают все самки. Так как у мышей 5 пар сосков, проявление опухолей может быть множественным. Опухоленосительство, как свойство этих мышей, передается по наследству потомству, возможно, при кормлении молоком, что не происходит у человека[5].

Целью наших исследований было изучение влияния скармливания биологически активной смеси (БАС) в качестве добавки к ежедневному рациону на здоровье и физические параметры животных со спонтанно возникающими опухолями молочной железы, как до возникновения опухоли, так и в процессе ее роста.

Материалы и методы

В наших исследованиях использовались самки репродуктивного возраста (на момент начала эксперимента – 2-2,5 мес.), характерным свойством которой является повышенная частота спонтанного возникновения опухолей молочной железы в более позднем возрасте. Из половозрелых мышей были сформированы семьи; эти семьи были разделены на две группы – опытную и контрольную. Экспериментальные животные ежедневно получали дополнительно к стандартному рациону постоянную дозу биологически активной смеси (БАС), которая представляла собой комплексную биодобавку, состоящую из применяемых в медицинской практике витаминов и