

## МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОНКОЛОГИИ

Н. А. ПОПОВА

Новосибирский государственный университет

### THE MODELS OF EXPERIMENTAL ONCOLOGY

N. A. POPOVA

*The models of experimental oncology include spontaneous and transplantable tumors in animals, the culture of tumor cells in vitro, human tumors transplanted in animals and molecular-genetic models.*

*Арсенал моделей экспериментальной онкологии включает спонтанные, пересаживаемые и индуцированные опухоли животных, культуры опухолей человека и животных, опухоли человека, привитые животным, и молекулярно-генетические модели.*

[www.issep.rssi.ru](http://www.issep.rssi.ru)

Несмотря на успехи в изучении причин и особенностей онкологических заболеваний [1–5], их частота и смертность от них продолжают увеличиваться. Это делает проблему злокачественного роста одной из самых актуальных в биологии и медицине.

Развитие онкологии невозможно без постановки экспериментов, проведение которых на человеке недопустимо. Этим занимается экспериментальная онкология, используя многочисленные модели, каждая из которых в определенной степени адекватна опухолям человека. Учитывая особенности моделей, полученные на них данные можно переносить в клинику, где они подвергаются корректировке или отвергаются вообще. В связи с этим выбор для исследования подходящей модели имеет исключительно важное значение.

#### СПОНТАННЫЕ ОПУХОЛИ ЖИВОТНЫХ

Как ни далеко животные отстоят от человека, все же изучение их опухолей помогло выявить основные закономерности злокачественного роста, характерные для всех животных, в том числе и для человека. Рак поражает все многоклеточные организмы, однако опухоли лишь немногих животных могут служить моделями опухолей человека. Начнем изложение со спонтанных опухолей животных. Спонтанными они называются потому, что обнаруживаются у животных, не подвергшихся каким-либо воздействиям со стороны экспериментатора.

Среди беспозвоночных животных наиболее популярным объектом у онкологов является дрозофила. Некоторые линии дрозофилы характеризуются высокой частотой развития спонтанных опухолей. На них проводятся исследования механизмов генетической предрасположенности к опухолям.

У рыб, наиболее многочисленного по числу видов класса позвоночных животных, описаны опухоли разных тканей. Рыбы могут быть удобной моделью для исследования канцерогенных факторов в естественных водоемах. Кроме того, многие рыбы хорошо размножаются в условиях аквариумов, где они приобретают статус лабораторных животных. К сожалению, в таком

качестве для онкологических исследований они используются редко.

Среди земноводных достаточно распространенными лабораторными животными являются лягушки, но спонтанные опухоли у них встречаются редко. У лягушек удается индуцировать опухоли канцерогенными веществами или вирусами. Наиболее популярной в онкологии является карцинома почек леопардовой лягушки, для которой доказано вирусное происхождение.

Из класса птиц наиболее часто в качестве модели онкологии используют домашних кур. У них довольно часто возникает саркома, вызываемая вирусом. Поэтому эта модель применяется для изучения вирусного канцерогенеза.

Классическими объектами экспериментальной онкологии являются млекопитающие, прежде всего мыши и крысы, которые хорошо адаптируются к условиям жизни в неволе и дают многочисленное потомство. Нет ни одной проблемы онкологии, которую не исследовали бы с использованием этих грызунов. Чаще всего у мышей встречаются опухоли молочных желез (ОМЖ). У самок мышей пять пар молочных желез. В каждой железе может возникнуть опухоль. Поэтому спонтанные ОМЖ часто бывают множественными. Как модель спонтанные ОМЖ мышей привлекают исследователей легкостью наблюдений, возможностью измерения, а также получения штаммов перевиваемых опухолей. И действительно, эта модель использовалась и используется в настоящее время для решения многих проблем онкологии: роли генотипа и вирусов в возникновении опухолей, роли гормонов, проблемы предраковых образований, тестирования канцерогенов и противоопухолевых соединений. Спонтанные ОМЖ у крыс возникают гораздо реже, чем у мышей, тем не менее и они служат объектом исследования онкологов.

У кроликов часто возникает вызываемая ДНК-содержащим вирусом спонтанная папиллома. Она представляет собой доброкачественные бородавчатые разрастания на коже ушей, которые впоследствии превращаются в злокачественную опухоль, метастазирующую в легкие и лимфоузлы. Эта модель с успехом применяется для решения проблем вирусологии и иммунологии опухолей.

У обезьян довольно часто встречаются и доброкачественные и злокачественные опухоли разных органов, некоторые из них образуют метастазы. Это свидетельствует о принципиальной возможности использования спонтанных опухолей обезьян в качестве экспериментальной модели. Правда, тот факт, что опухоли у них возникают, как правило, в возрасте 10–15 лет, делает эту модель очень дорогостоящей.

Из домашних животных в большей степени опухолями поражаются собаки. У них возникают опухоли разных органов, чаще молочных желез. Спонтанные опухоли собак иногда используют на последних предклинических этапах испытания противоопухолевых химических соединений.

## СПОНТАННЫЕ ОПУХОЛИ ИНБРЕДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Самым главным недостатком спонтанных опухолей животных как моделей для онкологических исследований является низкая частота их возникновения, в результате чего онколог не может одновременно располагать материалом, достаточным для изучения. Чтобы исправить эту ситуацию, ученые пытались перенести опухоль, возникшую у одного животного, на большое число других, то есть осуществить перевивку опухоли, или трансплантацию.

В 1975 году М.А. Новинскому впервые удалось перевить опухоль от одной собаки другой. Фактически им была создана первая экспериментальная модель злокачественного роста. Вслед за этим и другими исследователями было показано, что в некоторых случаях возможны успешные трансплантации опухолей животным того же вида, но генетически различающимся. В большинстве случаев подобные попытки оказывались неудачными. Так, Пауль Эрлих, один из основателей экспериментальной онкологии, пробовал перевивать более тысячи спонтанных опухолей мышей, но только 14 из них развивались у новых хозяев.

Важнейшим этапом в развитии экспериментальной онкологии явилось выведение инбредных линий животных. Раньше, чем онкологи, инбридинг (близкородственное скрещивание) стали использовать любители, разводившие мышей с интересующими их признаками. В Японии были популярны “танцующие” или “вальсирующие” мыши. Впоследствии было показано, что это является результатом наследственного нарушения функции вестибулярного аппарата. Люди, разводившие таких мышей для продажи, знали, что “танцующие” появляются только в потомстве “танцующей” пары. Опухоль, случайно возникшая у одной из “танцующих” мышей, была успешно трансплантирована другим таким же мышам и не росла у “нетанцующих”. Таким образом впервые результат трансплантации был поставлен в зависимость от родственных отношений между донором опухоли и ее реципиентами. К тому времени было уже известно учение Иоганнсена о чистых линиях, гласившее, что близкородственное разведение в ряду поколений любую разнородную популяцию разделяет на инбредные, или чистые, линии. Все особи в пределах одной линии гомозиготны и идентичны по всем генам, как однозиготные близнецы. У мышей

состояние 100%-ной гомозиготности генов (за исключением генов половых хромосом) достигается через 20 поколений сестринско-братского инбридинга. Первая инбредная линия мышей получена американским онкологом Литтлом в 1909 году. Это линия DBA, которая существует и поныне. При создании линий мышей для онкологических исследований ученые сочетали инбридинг с селекцией на высокую или низкую частоту опухолей определенных органов. В результате создано несколько сот линий мышей, каждая из которых имеет определенные онкологические характеристики (рис. 1). Они сохраняются как линейная принадлежность независимо от того, в какой стране и каком виварии содержатся мыши данной линии. У мышей одних линий в определенном возрасте возникают опухоли молочной железы, печени, легких или лейкозы. Это так называемые высокораковые и высоколейкозные линии (рис. 2). У других, наоборот, опухоли возникают с низкой частотой или не возникают совсем – это низкораковые линии.



**Рис. 1.** Мыши разных инбредных линий



**Рис. 2.** Самка высокораковой линии мышей A/He с опухолью молочной железы

Может создаться впечатление, что инбредные линии – искусственная модель. Ведь ничего подобного у человека не существует (кроме монозиготных близнецов, которые рождаются крайне редко). Однако это не так. Известно, что, только вычленив определенный фактор, можно досконально его исследовать. Действительно, с появлением инбредных линий были решены некоторые фундаментальные проблемы онкологии.

Помимо мышей созданы также сотни инбредных линий крыс. Большинство линий крыс ведут свое происхождение от колонии крыс-альбиносов из вивария при Вистаровском институте США. Среди крыс нет линий с высокой частотой спонтанных опухолей, поэтому они используются в онкологии в основном для индукции опухолей канцерогенами, а также для работы с перевиваемыми опухолями.

Число инбредных линий морских свинок невелико. Они отселектированы в основном для исследований в области иммунологии. Еще меньше линий хомячков и кроликов, которые в онкологии используются для трансплантации опухолей человека. Но об этом несколько позже. А сейчас вернемся к перевиваемым опухолям.

## ПЕРЕВИВАЕМЫЕ ОПУХОЛИ

Создание инбредных линий позволило ввести в арсенал моделей экспериментальной онкологии перевиваемые опухоли. Онкологам-экспериментаторам уже не надо было дожидаться появления спонтанных опухолей. При прививке они могли получить достаточное для исследований количество опухолей. Это делало возможным постановку эксперимента с большим числом сравниваемых групп животных. Трансплантация опухоли с одной особи на другие в пределах одной линии мышей всегда успешна. Любую спонтанно возникшую или индуцированную опухоль можно превратить в перевиваемый штамм, то есть опухоль, сохраняющую свои свойства при последующих перевивках. Штамм можно подвергнуть замораживанию с применением криопротекторов и хранить в таком состоянии в контейнере с жидким азотом сколь угодно долго. В случае надобности штамм размораживают и трансплантируют животным. В онкологических центрах и лабораториях существуют банки, где хранятся сотни перевиваемых штаммов опухолей. С использованием перевиваемых опухолей инбредных мышей получают более воспроизводимые и статистически достоверные результаты, причем на меньшем числе животных. Все это делает перевиваемые опухоли незаменимой моделью для исследований в области экспериментальной терапии. Как правило, неизвестный препарат испытывают на нескольких штаммах, причем в этот список непременно включают метастазирующие штаммы опухолей, а

также штаммы, обладающие лекарственной устойчивостью. Все химиопрепараты, применяющиеся в онкологической клинике в настоящее время, непременно проявили противоопухолевую активность на какой-нибудь перевиваемой опухоли животных.

Наряду с явными преимуществами перевиваемые опухоли как модели имеют один существенный недостаток. Дело в том, что при прививке опухоль переносится в организм здорового животного. По отношению к онкологическим заболеваниям человека это искусственная ситуация. Более адекватными в этом смысле моделями являются спонтанные и индуцированные опухоли, так как в этих случаях опухоль возникает из клеток организма, подвергшихся злокачественной трансформации.

## ИНДУЦИРОВАННЫЕ ОПУХОЛИ

С тех пор как Персиваль Потт доказал роль печной сажи в возникновении рака мошонки у трубочистов, выявлено множество химических веществ-канцерогенов, вызывающих различные опухоли [4, 5]. Первую экспериментально индуцированную опухоль получили Ямагива и Ишикава путем многократного смазывания кожи кролика каменноугольным дегтем. В дальнейшем канцерогенные вещества были выделены в чистом виде и стали использоваться для индукции опухолей у животных. При исследовании индуцированных канцерогенными веществами опухолей были получены факты, необходимые для понимания сущности процесса злокачественного роста.

Опухоли могут быть индуцированы у животных также онкогенными вирусами. Первым вирусом, для которого доказана роль в возникновении опухолей, был открытый в 1910 году П. Раусом из Рокфеллеровского университета США вирус саркомы кур. За это исследование П. Раус в 1966 году удостоен Нобелевской премии. В начале 30-х годов Шоуп открыл вирус папилломы у кроликов, а в 1936 году Биттнер — вирус рака молочных желез у мышей. Далее один за другим открыты вирусы лейкозов мышей, названные по именам открывателей вирусами Гросса, Френд, Молони и Раушера.

В отличие от животных, у которых открыты десятки опухолеродных вирусов, лишь для относительно небольшого числа опухолей человека доказана роль вирусов в их возникновении [1, 5]. Среди них несколько редких, встречающихся в определенных географических регионах опухолей. Например, лимфома Бэркитта, поражающая детей в Африке. В ее возникновении играет роль сочетание вируса и тропической малярии. На фоне общей иммунодепрессии вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) может вызывать развитие саркомы Капоши и лимфомы. В последнее время внимание исследователей

привлечено к широко распространенным вирусам папилломы. Имеются данные, что носительство этого вируса (особенно типов 16 и 18) увеличивает вероятность заболевания раком шейки матки [6]. Группу повышенного риска составляют также люди, больные гепатитами В и С. Изменения в печени, вызываемые этими вирусами, создают условия для возникновения рака печени.

Модели индуцированных вирусами опухолей животных, а также модели злокачественно трансформированных под влиянием вирусов клеток, культивируемых в условиях *in vitro*, позволили не только раскрыть многие тайны вирусного канцерогенеза, но и создать общую концепцию молекулярных механизмов возникновения опухолей.

Опухоли могут быть индуцированы также различными видами облучения. У людей, подвергшихся действию ионизирующей радиации, возникают опухоли кроветворной ткани, костей, легких, печени, щитовидной железы и других органов. В экспериментах на животных при воздействии облучения возникают опухоли такого же широкого спектра.

Нарушения баланса гормонов могут играть одну из главных ролей в патогенезе злокачественных опухолей. Моделями исследования этого процесса служат опухоли животных, образующиеся вследствие введения гормонов или, наоборот, удаления желез внутренней секреции (гипофиза, яичников).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ОПУХОЛИ ЧЕЛОВЕКА

Исследования опухолей животных, спонтанных, индуцированных и перевиваемых, показали, что полной корреляции между экспериментальными и клиническими данными нет и, следовательно, прямой перенос результатов в клинику опухолей человека невозможен. Последнее касается прежде всего отбора противоопухолевых препаратов. Это заставляло онкологов искать подходы к использованию опухолей человека в экспериментальных моделях.

Различные опухоли человека можно выращивать на питательных средах. В этом обзоре нет возможности рассмотреть все разнообразие культуральных моделей. Назову лишь самые распространенные из них: орган-ные, тканевые и клеточные культуры, культуры в агаре. Многие фундаментальные проблемы онкологии решены с использованием культуры опухолевых клеток. С практической точки зрения важным является применение культуры клеток опухолей человека для отбора противоопухолевых препаратов, установления индивидуальной чувствительности опухоли к химиопрепаратам, а также для испытания генотоксических свойств



веществ. В этой модели самым привлекательным является то, что экспериментатор имеет дело с опухолями человека. Однако они находятся вне организма, в искусственных условиях. Это главный недостаток данной модели. Тем не менее на ней можно испытывать препараты, оказывающие токсический эффект на клетки, хотя при этом об избирательности их действия на опухолевые клетки судить невозможно. Для тестирования препаратов, обладающих опосредованным эффектом на опухоли, эта модель не годится. Также непригодна она и для исследования веществ, подвергающихся в организме метаболической активации. Поэтому исследователи прилагали усилия для получения модели, позволяющей опухолям человека расти в организме животных.

С этой целью используют гетеротрансплантацию опухолей человека. Для того чтобы опухоли человека развивались в организме животных, необходимо преодолеть или обойти барьер тканевой несовместимости между опухолью и реципиентом. Для этого опухоли человека трансплантируют в так называемые привилегированные органы. В этих органах на чужеродные трансплантаты (гетеротрансплантаты) иммунные реакции не развиваются. К таким органам относятся передняя камера глаза, мозг, семенники, защечные мешки у хомячков. При прививке опухоли в эти органы можно работать только с опухолями маленьких размеров. Как только опухоль прорастает окружающие ткани, привилегированность данного района отменяется и опухоль отторгается. Гетеротрансплантацию опухолей человека можно производить также на развивающийся куриный эмбрион. И в этом случае недостатки модели те же. В связи с этим подобные трансплантации широкого применения в экспериментальной онкологии не нашли. Более адекватной является трансплантация человеческих опухолей животным в диффузионных камерах. Кусочки опухоли помещают в миллиметровую камеру, размер пор которой предотвращает проникновение в нее клеток иммунной системы. На этой модели можно отбирать противоопухолевые препараты, требующие активации в организме. Однако исследования с использованием диффузионных камер весьма трудоемки. Кроме того, при этом есть трудности в оценке противоопухолевого эффекта. Это является серьезным препятствием для применения модели, в частности для установления индивидуальной чувствительности опухоли к химиопрепаратам.

Успешную трансплантацию опухолей человека можно осуществлять мышам и крысам с мутацией *nu*. Мутация *nu* обладает множественными эффектами. Главные ее проявления — отсутствие тимуса и шерстного покрова. Поэтому таких животных называют *nude* — голые. Из-за отсутствия тимуса у мышей и крыс *nude*



**Рис. 3.** Мышь *nude* с привитой опухолью человека

развивается иммунодефицит, в результате чего гетерологичные опухоли у них успешно прививаются (рис. 3).

Наиболее пригодной, на мой взгляд, для трансплантации опухолей человека являются созданные недавно мыши SCID/Нu. Это мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, которым в раннем возрасте трансплантированы кусочки тимуса и печени человека. Метаболические процессы у этих мышей максимально приближены к человеческим. Такие животные с трансплантированными им опухолями человека используются в настоящее время в различных онкологических экспериментах.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

С развитием молекулярной биологии в онкологию пришли новые модели и возник самостоятельный раздел молекулярной онкологии. Появилась возможность исследования механизмов злокачественной трансформации на молекулярном уровне. Интересующий экспериментатора ген может быть выделен из генома, клонирован (то есть получено много его копий) и расшифрована его структура. Кроме того, ген может быть перенесен в геном другого животного, которое будет называться трансгенным. В настоящее время получены трансгенные мыши, представляющие собой ценную и перспективную модель для изучения различных аспектов злокачественного превращения клеток. Манипулирование с генами позволяет также осуществить выведение (нокаут) определенного гена. Так получают «нокаутированных» мышей. На модели трансгенных и «нокаутированных» мышей показано, что развитие опухоли может быть результатом мутации в генах, играющих ключевую роль в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток. Необходимые для изучения гены могут быть внесены в клетки, растущие в культуре ткани. Такие клетки называются трансфицированными. В последнее время они активно используются в онкологии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальная онкология обладает достаточно большим числом моделей, которые могут быть использованы для решения многих проблем злокачественного роста. Для каждого конкретного исследования экспериментатор выбирает модель, учитывая ее особенности и адекватность поставленной задачи, достоинства и недостатки. Часто эксперименты ставятся на нескольких моделях, при этом недостатки одной из них восполняются достоинствами другой. Наиболее трудоемки и дорогостоящи испытания веществ на канцерогенную активность и отбор противоопухолевых препаратов. Это требует использования нескольких моделей опухолей животных (спонтанных и перевиваемых) и человека, растущих в культуре ткани или у животных в виде гетеротрансплантатов. Для развития экспериментальной онкологии в питомниках и вивариях разных стран выращивают миллионы лабораторных животных.

В последние годы обострились споры вокруг использования животных для экспериментов, в которых они испытывают страдания. Альтернативу представляют собой исследования, проводимые *in vitro*. Среди аргументов в пользу отказа от испытаний на живых организмах их защитники кроме необходимости избавления животных от гибели выдвигают также невозможность прямой экстраполяции полученных данных на человека. Это действительно так. Тем не менее, поскольку модели *in vitro* на современном этапе не позволяют полностью отказаться от использования животных, необходимо, очевидно, искать компромиссные реше-

ния. Прежде всего нужно совершенствовать модели и методы *in vitro*, с тем чтобы уменьшить число используемых экспериментальных животных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелев Г.И.* Что такое опухоль // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 10. С. 85–90.
2. *Васильев Ю.М.* Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток: Сигнальные молекулы, вызывающие размножение и гибель клеток // Там же. № 4. С. 17–22.
3. *Васильев Ю.М.* Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток: Клетки строят ткань // Там же. № 5. С. 20–25.
4. *Зюсс Р., Кинцель В., Скрибнер Дж. Д.* Рак: Эксперименты и гипотезы. М.: Мир, 1977. 358 с.
5. *Trichopoulos D., Li F.P., Hunter D.J.* What Causes Cancer // *Sci. Amer.* 1996. № 9. P. 80–87.

*Рецензент статьи Ю.М. Васильев*

\* \* \*

Нэлли Александровна Попова, кандидат биологических наук, доцент кафедры цитологии и генетики Новосибирского государственного университета, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических основ онкогенеза Института цитологии и генетики СО РАН. Область научных интересов – иммунология и экспериментальная онкология. Автор 80 научных работ.