



Особенности роста карциносаркомы Walker 256 у крыс линий Brattleboro и ISIAH (НИСАГ)

И.И. Хегай

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Исследована динамика роста перевиваемой линейнонеспецифической карциносаркомы Walker 256 у крыс, моделирующих наследственные системные патологические процессы. У крыс линии Brattleboro развивается гипоталамический несахарный диабет на фоне абсолютного отсутствия вазопрессина в крови. Вследствие гормонального дисбаланса нарушается регуляция водно-электролитного обмена. Крысы линии ISIAH (НИСАГ) являются носителями генетически обусловленной стресс-индуцируемой артериальной гипертензии. Сосудистая ригидность сопровождается дополнительными плейотропными эффектами. Эксперименты выполнены на инбредных крысах линий Brattleboro и ISIAH и их гибридах (ISIAH × Brattleboro) F₁ × Brattleboro. В качестве генетических маркеров расщепления потомков использовали мутантный ген вазопрессина *di* (*diabetes insipidus*) и гены окраски шерсти, альбино (*C*) и капюшон (*h*), локализованные в трех различных группах сцепления. Альтернативные пары признаков составили: для локуса вазопрессина – суточное потребление воды более 45 либо менее 20 % от веса тела; для локуса *альбино* – сплошной белый либо иной цвет шерсти; для локуса *капюшон* – наличие либо отсутствие неравномерности окраса шерсти. Установлены два принципиально различающихся варианта динамики роста привитой опухоли. У исходно гомозиготных по гену *di* крыс родительской линии Brattleboro и гомозигот *didi*, выщипавшихся в анализирующем скрещивании (ISIAH × Brattleboro) F₁ × Brattleboro, опухоль после некоторого начального роста переходила в стадию регрессии и постепенно уменьшалась вплоть до полного своего исчезновения. У выщипавшихся гибридных гетерозигот *di*+ и крыс родительской линии ISIAH с генотипом нормы (++) по локусу вазопрессина опухоль росла непрерывно и завершалась только летальным исходом животных. Обнаружено, что регрессия опухоли проявляет конкордантность исключительно с генотипом *didi*, и расщепление по данному признаку не зависит от генотипа локусов *альбино* и *капюшон*. Альтернативный регрессии опухоли ее непрерывный рост наблюдается у всех крыс, имеющих хотя бы один нормально экспрессирующийся ген вазопрессина.

Ключевые слова: вазопрессин; Walker 256; регрессия опухоли; генетические маркеры; конкордантность.

Details of Walker 256 carcinosarcoma growth in Brattleboro and ISIAH lines of rats

I.I. Kheday

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The growth dynamics of transplantable Walker 256 carcinosarcoma was investigated in rats modeling inherited systemic pathological processes. Hypothalamic diabetes insipidus is developing in Brattleboro rats on the background of total vasopressin absence in the blood. Regulation of water-electrolytic metabolism is disturbed due to hormonal disbalance. ISIAH rats are carriers of inherited stress-induced arterial hypertension. Vascular rigidity is accompanied by additional pleiotropic effects. The experiments have been carried out on inbred Brattleboro and ISIAH rats, and their hybrids segregated from (ISIAH × Brattleboro) F₁ × Brattleboro mating. The mutant vasopressin gene *di* (*diabetes insipidus*) and fur painting genes, *albino* (*C*) and *hooded* (*h*), localized in three different linkage groups, were used as genetic markers of progeny splitting. Alternative pairs of traits were: daily water consumption above 45 % or lower than 20 % of body weight – for the vasopressin locus; total white or other color of fur – for the *albino* locus; presence or absence of unevenness in fur painting – for the *hooded* locus. It has been found that there are only two types of growth dynamics of grafted tumor. In the rats of the inbred Brattleboro line and in the *didi* homozygotes, which were segregated from analytical mating (ISIAH × Brattleboro) F₁ × Brattleboro, tumor began to regress and diminished until absolute disappearance after some initial growing. Heterozygous offspring *di*+ and parental ISIAH rats with the normal vasopressin genotype (++) showed permanent tumor growth until lethal injury. It was found that tumor regression demonstrates concordance exclusively to the *didi* genotype, segregation of this feature does not depend on the genotype of the *albino* or *hooded* loci. Alternative to tumor regression, permanent growth of tumor is observed in all rats having at least one normally expressed vasopressin gene.

Key words: vasopressin; Walker 256; tumor regression; genetic markers; concordance

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хегай И.И. Особенности роста карциносаркомы Walker 256 у крыс линий Brattleboro и ISIAH (НИСАГ). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):243-246. DOI 10.18699/VJ16.150

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kheday I.I. Details of Walker 256 carcinosarcoma growth in Brattleboro and ISIAH lines of rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):243-246. DOI 10.18699/VJ16.150

ORIGINAL ARTICLE

Received 18.11.2015 г.

Accepted for publication 30.11.2015 г.

© АУТОР, 2016

Особенностью крыс линии Brattleboro является гипоталамический несахарный диабет, генетически запрограммированный у них вследствие делеции в гене вазопрессина и характеризующийся отсутствием секретируемого гормона в крови (Schmale, Richter, 1984). Неэкспрессирующийся мутантный аллель *di* наследуется как рецессивный по отношению к нормальному аллелю (+) гена вазопрессина (Valtin, 1982). У гомозиготных мутантов развивается несахарный диабет с постоянно высоким уровнем потребления воды, достигающим в сутки 100 % в перерасчете на вес тела (Khegai, 2002). Нами было установлено, что крысы линии Brattleboro отличаются от крыс линии WAG с физиологически нормальным метаболизмом воды также и по динамике роста трансплантированных опухолей (Хегай и др., 2006; Khegai et al., 2006; Хегай и др., 2014; Khegai et al., 2014). Для уточнения характера наследования данного ранее неизвестного признака аналогичные исследования с привлечением дополнительных генетических маркеров были проведены на крысах линии ISIAH с генетически обусловленной артериальной гипертензией.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на инбредных крысах Brattleboro, ISIAH (НИСАГ) и гибридах, полученных от анализирующего скрещивания (ISIAH × Brattleboro) $F_1 \times$ Brattleboro. Крысы ISIAH с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией были любезно предоставлены А.Л. Маркелем (ИЦиГ СО РАН) (Markel, 1992). Гомологичность аллельного состава генома у крыс родительских линий составляет не менее 95 % (Bender et al., 1984). В качестве маркеров расщепления потомков использовали аллели локусов вазопрессина (*di*, +) капюшонной окраски шерсти (*h*, *H*) и окраски альбино (*c*, *C*) (O'Brien, 1987). Генотипирование фенотипических классов при анализе наследования гипоталамического несахарного диабета проводили по осмоляльности экскретируемой мочи и суточному потреблению воды в стандартных условиях содержания на основании ранее установленных критериев (Khegai, 2003). Аллели генов капюшон и альбино идентифицировали по характерному дискретному проявлению на шерсти различных вариантов окраски. Все процедуры выполняли в соответствии с принятыми «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным.

Суспензию клеток линейноспецифической опухоли Walker 256 прививали крысам в бедренную мышцу однократно в дозе 10^6 клеток в соответствии с литературными данными (Vrionis et al., 1996). Все крысы, задействованные в эксперименте с опухолью, были привиты одинаковым образом инъекциями из свежеприготовленного препарата клеточной суспензии. Растущие солидные опухоли ежедневно измеряли, и определяли их объем. Всего было исследовано 8 крыс ISIAH, 10 – Brattleboro и 17 гибридов, выращенных в скрещивании (ISIAH × Brattleboro) $F_1 \times$ Brattleboro. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Данные по количественной оценке параметров осморегуляции, использованные при фенотипической диагностике гипоталамического несахарного диабета у индивидуальных особей в родительских линиях и у гибридных потомков, представлены в табл. 1. У крыс линии Brattleboro экскретируется гипотоничная моча относительно стандартной осмоляльности плазмы крови, дефект компенсируется высоким уровнем потребления воды. Крысы линии ISIAH демонстрируют обратное соотношение исследованных параметров, соответственно, у них отмечается выделение концентрированной мочи и естественное для животных в норме сравнительно низкое ежедневное потребление воды.

У потомков от анализирующего скрещивания наблюдалась неоднородность данных количественных признаков по сравнению с обеими родительскими линиями. У 8 из 17 гибридных особей зафиксированы примерно такие же значения исследуемых параметров осмотического концентрирования, как у крыс Brattleboro, но остальные 9 гибридов почти не отличались по этим показателям от крыс линии ISIAH. В совокупности уровень потребления воды и осмоляльность мочи позволяют с достаточной точностью генотипировать выщепляющиеся фенотипические классы относительно исходных родительских линий, и гибриды (ISIAH × Brattleboro) $F_1 \times$ Brattleboro формируют два фенотипических класса в соответствии с теоретически ожидаемым расщеплением генотипов при анализирующем скрещивании ($\chi^2 = 0,06$; $p > 0,05$). По результатам генотипирования гибриды были распределены в две экспериментальные группы, соответственно, с гетерозиготным генотипом *di+* и гомозиготным *didi*. На рисунке (а) показаны графики роста опухолей, сформировавшихся в данных группах гибридных крыс после трансплантации им клеток карциносаркомы Walker 256.

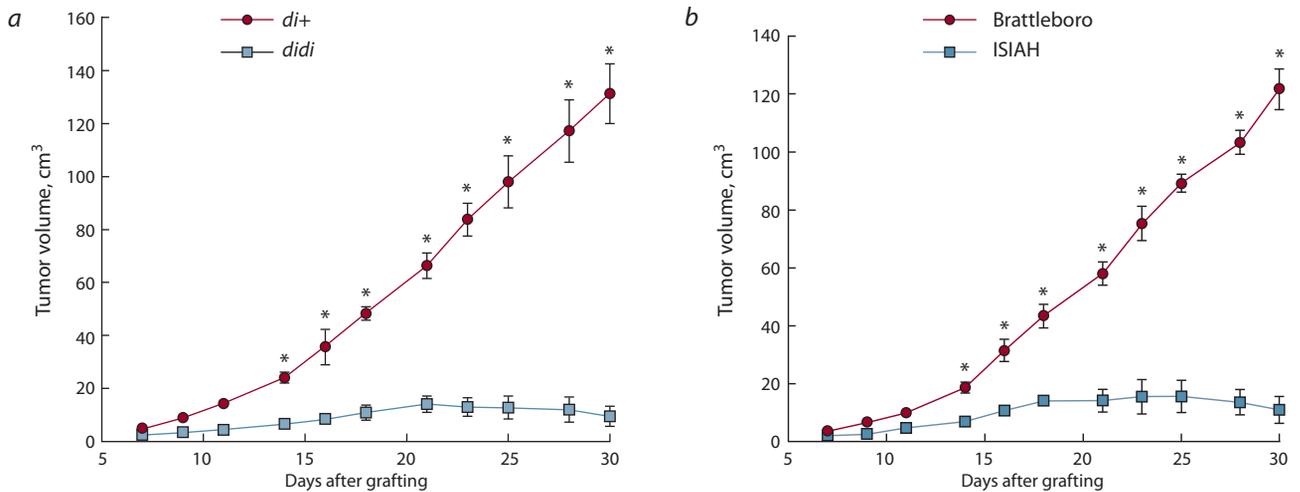
Внешние признаки опухоли в обеих группах начинают проявляться примерно через неделю после начала эксперимента, однако почти сразу соответствующие кривые роста демонстрируют различную динамику. С 14-го дня и далее до конца эксперимента у крыс регистрируют достоверные межгрупповые различия. В конечном итоге гетерозиготы *di+* и гомозиготы *didi* формируют два совершенно разных патоморфологических фенотипических класса. У гетерозиготных особей опухоль увеличивается в объеме почти прямолинейно на протяжении всего срока наблюдения и к 30-дневному сроку достигает размеров, сопоставимых с габаритами всего тела (верхняя кривая). У гомозигот опухоль изначально растет более медленными темпами, через две недели рост прекращается, опухоль переходит в стадию постепенной регрессии вплоть до полного своего исчезновения и завершается последующим выздоровлением крыс.

Рисунок (б) демонстрирует аналогичное соотношение между кривыми роста опухоли в родительских линиях Brattleboro и ISIAH при их сравнении между собой. Эти линии генетически различаются по присутствию или отсутствию нормально экспрессирующегося гена вазопрессина. Вследствие того что мутантный аллель гена

Table 1. Daily water consumption and urine osmolality

Rats	Genotype	Water consumption, % of body weight	Urine osmolality, mOsm/kg H ₂ O
Brattleboro	<i>didi</i>	72.1 ± 4.8	184 ± 19
(ISIAH × Brattleboro) F ₁ × Brattleboro	<i>didi</i>	69.9 ± 5.2	208 ± 13
	<i>di+</i>	13.8 ± 4.0*	1836 ± 246*
ISIAH	++	5.6 ± 2.1*	2221 ± 79*

*Difference from the Brattleboro rat strain significant at $p < 0.001$.



Tumor growth in rats after carcinoma Walker 256 grafting: *a*, hybrids *di+* and *didi*; *b*, parental strains Brattleboro and ISIAH.

*Difference significant at $p < 0.001$.

Table 2. Phenotypical expression of marker genes in parental strains Brattleboro and ISIAH and in hybrids obtained in test crosses

Rats	Locus genotype			Blood vasopressin	Tumor regression
	<i>diabetes</i>	<i>albino</i>	<i>hooded</i>		
Brattleboro	<i>didi</i>	CC	<i>hh</i>	absent	yes
(ISIAH × Brattleboro) F ₁ × Brattleboro	<i>didi</i>	Cc	<i>hh</i>	absent	yes
	<i>di+</i>	Cc	<i>hh</i>	present	no
ISIAH	++	cc	<i>hh</i>	present	no

вазопрессина рецессивен, у гетерозиготных гибридов *di+* также в достаточном количестве синтезируется вазопрессин, и, соответственно, у них никак не проявляются признаки несахарного диабета. Это делает их фенотипически не отличимыми от гомозигот (++) с нормальным геном вазопрессина (табл. 1).

Крысы линий Brattleboro и ISIAH имеют ряд других различий в составе аллелей некоторых маркерных локусов. Для оценки влияния генетического фона на проявление искомого признака мы провели дополнительный анализ расщепления по локусам *капюшон* (*hooded*, *h*) и *альбино* (*albino*, *C*). На генетической карте крысы маркеры лока-

лизованы в разных группах сцепления: *капюшон* – в 6-й, *альбино* – в 1-й, а *вазопрессин* (*diabetes*) – в 4-й (O'Brien, 1987; Kheday, Golubjatnikova, 1993). Распределение гибридных потомков по фенотипам маркерных генов приведено в табл. 2.

Очевидно, что регрессия опухоли наследуется конкордантно только с мутантным гомозиготным генотипом *didi*, а в случае наличия у особи хотя бы одного нормального гена вазопрессина имеет место непрерывный рост опухоли независимо от состава аллелей генов маркеров окраса шерсти. Данный признак также не проявляется и не расщепляется при скрещивании крыс ISIAH и нормотен-

живных крыс с гомозиготным генотипом по нормальному гену вазопрессина и, следовательно, не зависит от экспрессии большинства генов, обуславливающих наследственный характер стресс-индуцированной артериальной гипертензии. Генетическая детерминация нарушенного артериального давления у крыс ISIAH имеет другую более сложную структуру и затрагивает преимущественно калликреин-кининовую систему гемостаза почки (Редина и др., 2014; Redina et al., 2015).

Таким образом, анализ полученных результатов в совокупности позволяет сделать заключение, что особенности динамики опухоли, наблюдаемые у крыс линии Brattleboro, с высокой вероятностью связаны с отсутствием у них вазопрессина. Механизм регрессии карциносаркомы Walker 256 у особей мутантного генотипа *didi*, по-видимому, включает элементы иммунологического контроля гистосовместимости и регуляцию клеточной пролиферации. Предполагается продолжение работы в этом направлении.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2015-0004.

The author is grateful to the staff of the Vivarium of conventional animals, ICG SB RAS, Novosibirsk, for assistance in animal breeding.

Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

References

- Bender K., Adams M., Baverstock P.R., den Biemann M., Bissbort S., Brdicka R., Butcher G.W., Cramer D.V., von Deimling O., Festing M.F.W., Gunter E., Guttman R.D., Hedrich H.J., Kendall P.B., Kluge R., Moutier R., Simon B., Womack J.E., Yamada J., van Zutphen B. Biochemical markers in inbred strains of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenetics*. 1984;19:257-266.
- Khegai I.I. Specific expression of gene *di* (diabetes insipidus) in homologous inbred rat lines. *Rus. J. Genet.* 2002;38(12):1424-1427.
- Khegai I.I. Phenotypic expression of the mutant gene diabetes insipidus in rats and criteria of genotyping by phenotype. *Rus. J. Genet.* 2003;39(1):57-60.
- Khegay I.I., Golubjatnikova A.V. Localization in the fourth linkage group of a gene *di* affecting diabetes insipidus in rats. *Biochem. Genet.* 1993;31(3/4):201-204.
- Khegai I.I., Melnikova V.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. The effect of vasopressin on the Zajdela hepatocellular carcinoma growth rate. *Doklady Biol. Sci.* 2014;457(3):222-224.
- Khegai I.I., Melnikova V.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. The effect of vasopressin on Seidel's hepatocellular carcinoma growth rate. *Doklady Akademii Nauk=Proceedings of the Russian Academy of Sciences.* 2014;457(3):363-365.
- Khegai I.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. Walker 256 tumor growth in rats with hereditary defect of vasopressin synthesis. *Bul. Exp. Biol. Med.* 2006;142(3):344-346.
- Khegai I.I., Popova N.A., Zakharova L.A., Ivanova L.N. Walker 256 tumor growth in rats with a hereditary defect of vasopressin synthesis. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny=Bulletin of experimental biology and medicine.* 2006;142(9):316-318.
- Markel A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. In: Genetic hypertension. Volume 218. Sassard J., editor. London: Colloque INSERM; 1992:405-407.
- O'Brien S.J. Genetic Maps. Cold Spring Harbor Laboratory. 1987;4:464-469.
- Redina O.E., Klimov L.O., Ershov N.I., Abramova T.O., Ivanova L.N., Markel A.L. The downregulation of genes controlling vascular tone in kidneys of ISIAH rats with stress-induced arterial hypertension. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2014;18(4/2):910-919.
- Redina O.E., Klimov L.O., Ershov N.I., Abramova T.O., Ivanova L.N., Markel A.L. The decreased expression of genes controlling the vascular tone in the kidneys of ISIAH rats with stress-induced arterial hypertension. *Rus. J. Genet.: Appl. Res.* 2015;5(4):340-347. DOI 10.1134/S2079059715040127
- Schmale H., Richter D. Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature.* 1984;308:705-709.
- Valtin H. The discovery of the Brattleboro rat, recommended nomenclature, and the question of proper controls. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982;394:1-9.
- Vrionis F.D., Wu J.K., Qi P., Cano W.G., Cherington V.J. Tumor cells expressing the herpes simplex virus-thymidine kinase gene in the treatment of Walker 256 meningeal neoplasia in rats. *J. Neurosurg.* 1996;84:250-257.