

Генетически-обусловленное образование опухолей в легких мышей линии Af при влиянии радиационного и химического факторов, и старении

Н. И. Тимохина, Э. А. Надыров*, Н. Н. Веялкина, С. Н. Сушко,
 С. В. Гончаров, К. М. Фабушева

*Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии НАН Беларуси»,
 Гомель, Республика Беларусь*

**Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,
 Гомель, Республика Беларусь*

Экспериментальные модели образования опухолей с использованием лабораторных мышей наиболее часто применяются при изучении механизмов канцерогенеза. Линия мышей Af характеризуется тем, что в процессе развития у интактных животных возникают спонтанные опухоли.

Цель работы – изучение влияния химического и радиационного факторов на образование опухолей в легких мышей *in vivo*.

Материал и методы. Исследование проводилось на мышах линии Af. Животные подвергались однократному облучению в дозе 1 Гр или однократному ингаляционному воздействию смеси газов диоксида серы и аммиака в течение 1 ч, концентрации газов в камере составляли 1 мг/м³ и 5 мг/м³, соответственно. Также была проанализирована частота образования опухолей в легких мышей этой линии в 12- и 16-месячном возрасте. Оценивали частоту появления опухолей (%) и количество опухолей на одну особь, проводили гистологический анализ выявленных опухолей.

Результаты. В группах животных, подверженных химическому или радиационному воздействию, наблюдалось значительное возрастание частоты образования опухолей по сравнению с группой возрастного контроля. Однако данный показатель был сравним с частотой опухолей у животных данной линии более старшего возраста. Новообразования в легких мышей во всех исследуемых группах имели сходное гистологическое строение и были классифицированы как высокодифференцированная аденокарцинома.

Выводы. Полученные результаты позволяют предположить, что химическое ингаляционное и радиационное (1 Гр) воздействия в данном эксперименте являлось причиной возникновения генетически-детерминированного образования опухолей в более раннем возрасте.

Ключевые слова: мыши линии Af, аденома легких, ионизирующее излучение, ингаляционное воздействие.

© N. I. Timokhina, E. A. Nadyrov*, N. N. Veyalkina, S. N. Sushko, S. V. Goncharov, K. M. Fabusheva, 2018

Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

**Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus*

Genetically-Caused Tumor Formation in Lungs of Mice of Line Af Under Influence of Radiation and Chemical Factors, and at Aging

Experimental models of tumor formation using laboratory mice are most often used in the study of mechanisms of carcinogenesis. The line of Af mice is characterized by developing spontaneous tumors in intact animals during development.

The aim of the research was to study chemical- and radio-induced carcinogenesis in lungs of mice line Af *in vivo*.

Material and methods. The experiments were performed on mice line Af. Single exposure of irradiation of mice was performed in a dose of 1 Gy. The inhalation effect of sulfur dioxide and ammonia was carried out an hour once. The concentrations of gases in the chamber were 1 mg/m³ and 5 mg/m³. The frequency of tumor formation in the lungs of mice of this line was also analyzed at 12 and 16 months of age. The incidence of tumors (%) and the number of tumors per mouse were evaluated, histological analysis of the detected tumors was performed.

Results. In the groups subjected to radiation or inhalation exposure, the proportion of animals with lung adenomas were significantly increased compared to the control group. Neoplasms in the lungs of mice in all studied groups had a similar histological structure and were classified as highly differentiated adenocarcinoma.

Conclusions. The obtained results suggest that the chemical inhalation and radiation (1 Gy) effect in this experiment was the cause of genetically determined formation of tumors at an earlier age.

Keywords: mouse line Af, lung neoplasms, adenoma, ionizing radiation, inhalation.

Введение

В последние десятилетия рак легких занимает лидирующие позиции среди онкологических заболеваний. При этом определяется постоянный рост, как заболеваемости, так и смертности от злокачественных новообразований легкого во всем мире [7]. В Беларуси в

2014 году среди всех злокачественных новообразований опухоли легкого составили 9.5% [3]. Заболеваемость среди мужчин более чем в 5 раз превышала таковую у женщин и находилась на втором месте, уступив первое злокачественным новообразованиям предстательной железы. Воздействие продуктов сгорания табака (активное или пассивное куре-

ние) считается основной доказанной причиной рака легкого, около 85% всех случаев рака легких связывают с курением и лишь 15% случаев соотносят с влиянием радона, асбеста, вирусных инфекционных заболеваний и ионизирующей радиации [3]. Однако в настоящее время имеется все больше доказательств значительной роли генетической предрасположенности к развитию злокачественных новообразований легкого в ответ на влияние канцерогенных факторов [4, 10].

Несмотря на большой прогресс, достигнутый в онкологии, отношение смертности от рака легкого к заболеваемости остается высоким во всем мире, что свидетельствует о существующих проблемах лечения опухолей данной локализации [3].

Экспериментальные модели образования опухолей с использованием лабораторных мышей наиболее часто применяются при изучении механизмов канцерогенеза, прогрессирования и метастазирования злокачественных новообразований, что обеспечивает понимание биологии канцерогенеза человека. Также экспериментальные модели *in vivo* широко используются для изучения влияния факторов окружающей среды на образование и развитие опухолей [8].

В экспериментальных моделях рака легких наиболее часто используются инбредные линии мышей, восприимчивые к спонтанному канцерогенезу [6, 8]. Заболеваемость спонтанными опухолями легких является зависимой от линии и пола. В высокочувствительном штамме A/J начало проявления опухолей легкого происходит в возрасте 3–4 месяцев, а затем в возрасте 18–24 месяцев частота образования опухолей возрастает вплоть до 100%. В то время как другие линии варьируют от менее чувствительных (BALB/c) до более устойчивых (CBA и C3H) и, до практически полной устойчивости к опухолеобразованию в легких (C57BL/6 и DBA) [8].

Линия мышей Af характеризуется тем, что в процессе развития у интактных животных возникают спонтанные опухоли легких, число которых увеличивается под действием мутагенных и канцерогенных факторов [2].

Не смотря на то, что данная линия мышей давно используется в экспериментальных исследованиях, нет четкого описания частоты образования опухолей в легких при старении и в зависимости от химических и радиационных воздействий. Также проблемой является морфологическая характеристика указанных новообразований, что отмечается многими исследователями [9], при этом подчеркивается, что отсутствие информации о структурных особенностях спонтанных опухолей у лабораторных животных значительно усложняет целенаправленное моделирование и повышает вероятность ошибки в интерпретации результатов эксперимента [1].

Целью работы было исследование влияния химического и радиационного факторов на образование опухолей в легких мышей линии Af *in vivo*.

Материал и методы исследования

Эксперименты проведены на белых лабораторных мышах линии Af обоего пола, в возрасте 2.5–3 месяцев. Животных содержали в условиях стационарного вивария ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси» на полноценном стандартном пищевом рационе и свободного доступа к воде, 12/12-часовом режиме освещения и темноты, согласно установленным нормам. Эксперименты выполнялись в соответствии с международными рекомендациями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [5].

Были сформированы следующие группы животных: 1-я – интактный контроль (9 самок, 10 самцов), 2-я – облучение (10 самок, 9 самцов) и 3-я – ингаляционная затравка (9 самок, 10 самцов).

Однократное общее облучение мышей в дозе 1 Гр, с мощностью 46 сГр/мин. проводили на гамма-установке «ИГУР» (источник ^{137}Cs). Однократное ингаляционное воздействие диоксида серы (SO_2) и аммиака (NH_3) осуществляли на установке УИН-2М в течение 1 часа. Концентрации газов в камере составляли: $\text{CNH}_3 = 1 \text{ мг/м}^3$, $\text{CSO}_2 = 5 \text{ мг/м}^3$.

Выведение животных из эксперимента проводили через 5 месяцев после радиационного или химического воздействия путем декапитации под эфирным наркозом. Контрольная группа животных содержалась в аналогичных условиях и была выведена из эксперимента также через 5 месяцев.

Дополнительно была изучена частота спонтанного образования опухолей у мышей линии Af в возрасте 12 и 16 месяцев, группы животных состояли из 15 самцов и 14 самок в возрасте 12 месяцев, и 19 самцов и 18 самок в возрасте 16 месяцев.

Легкие животных фиксировали в 10% формалине и затем изучали при помощи бинокулярного микроскопа (увеличение 8×4). Оценивали частоту появления опухолей (%) и количество опухолей на одну особь.

Для гистологического анализа фиксированный в формалине материал проводили по стандартному протоколу и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике и изучали под световым микроскопом.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программных пакетов IBM SPSS Statistics 21. При оценке частоты

Таблица

Образование опухолей в легких мышей линии Af

Группа /показатель	Доля мышей с опухолями, % (95%, доверительный интервал)			Р	Кол-во опухолей на мышь
	Самцы	Самки	Всего		
Контроль (8 месяцев)	11.1 (0.28–48.25)	0.0 (0–30.85)	5.3 (0.13–26.03)		0.05
Облучение, 1 Гр	33.3 (7.49–70.07)	40.0 (12.16–73.76)	36.8 (16.29–61.64)	0.042	0.36
Ингаляция	40.0 (12.16–73.76)	37.5 (8.52–75.51)	38.9 (17.30–64.25)	0.019	0.41
Контроль (12 месяцев)	20.0 (4.33–48.09)	35.7 (12.76–64.86)	27.6 (26.14–29.55)	0.068	0.28
Контроль (16 месяцев)	42.1 (20.25–66.50)	44.4 (21.55–69.24)	43.2 (41.97–44.64)	0.005	0.67

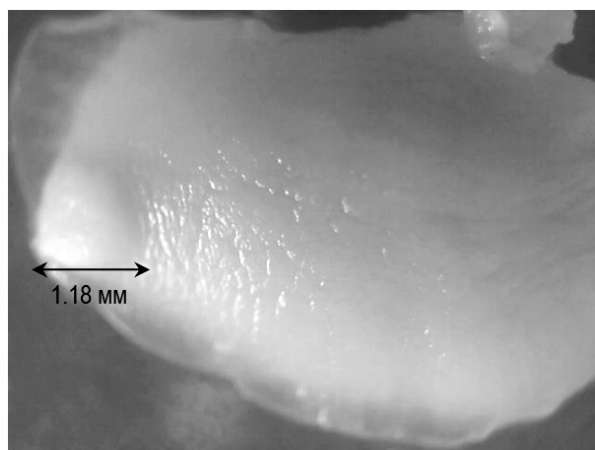


Рис. 1. Внешний вид доли легкого мыши линии Af с опухолью. Ув.×8.

образования опухолей использовали точный критерий Фишера. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0.05.

Результаты и их обсуждение

Изучено образование опухолей в легких мышей линии Af после облучения в дозе 1 Гр или ингаляционной затравки смеси аммиака и диоксида серы.

На момент окончания эксперимента возраст животных составлял 8 месяцев, гибели животных в ходе эксперимента не отмечено. Из 3-й группы 1 самка была досрочно удалена по не связанным с экспериментом причинам. Доля животных с опухолями легких в группе контроля составила 5.3% (табл.). У мышей контрольной группы фиксировали не более одного новообразования в легких, в диаметре не превышающего 0.5–1.7 мм (рис. 1). Данный уровень образования опухолей соответствует возрастному контролю. Необходимо отметить отсутствие значимых различий в зависимости от пола.

В группах, подвергнутых облучению или ингаляционной затравке, доля животных с новообразованиями легких значительно возрастала по сравнению с контрольной группой и составляла 36.8% ($p=0.042$) и 38.9%

($p=0.019$) соответственно. Не отмечено статистически значимых различий внутри групп в зависимости от пола животных.

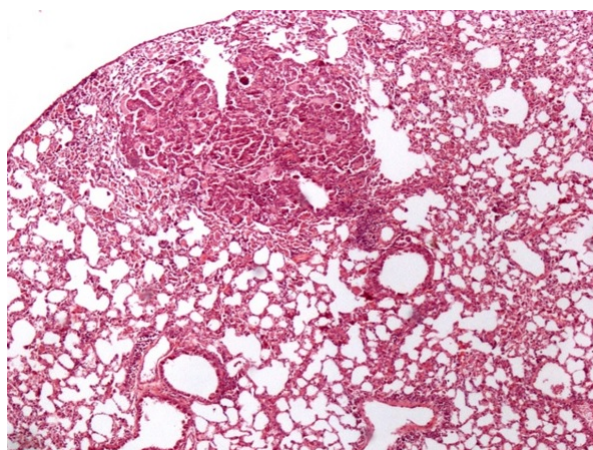
Значительное увеличение количества мышей линии Af с опухолями легких, связанное с возрастом, отмечалось у 12-месячных животных и старше. При этом доля животных с опухолью легкого составляла 27.6 % ($p=0.068$) и 43.2% ($p=0.005$) у животных в возрасте 12 и 16 месяцев соответственно.

В интактной группе животных паренхима легких состояла из легочных альвеол и бронхов разного калибра. Межальвеолярные перегородки тонкие, просветы альвеол свободные, альвеолярный эпителий включал уплощенные и округлые клетки. Бронхиальный эпителий многорядный, без признаков пролиферации. В состав слизистой оболочки крупных и средних бронхов входила лимфоидная ткань в виде редких скоплений лимфоидных фолликулов и межфолликулярных лимфоцитов.

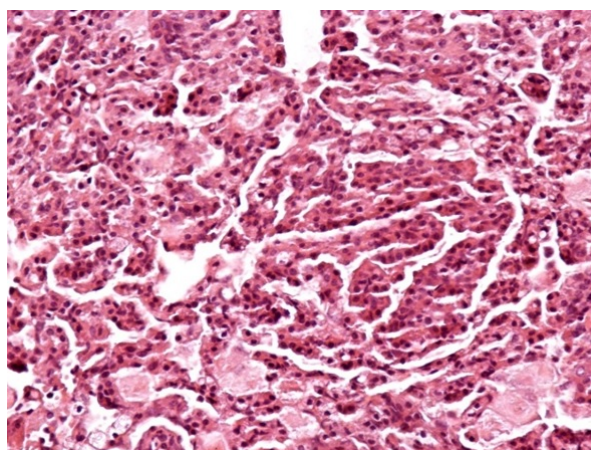
Новообразования в легких мышей, выявленные в возрастных группах и в группах, подвергшихся радиационному воздействию или ингаляционной затравке, имели сходное строение и были классифицированы как высокодифференцированная аденокарцинома (рис. 2).

Новообразования располагались субплеврально и выбухали над поверхностью органа. Соединительнотканная капсула вокруг опухолевых узлов не визуализировалась. Ядра опухолевых клеток были округлой и овальной формы с отчетливой кариолеммой, имели хорошо видимые ядрышки. Фигуры митоза обнаруживались редко. Внутри опухолевой ткани встречались отдельные сосуды, заполненные форменными элементами крови. Паренхима легкого вне пределов опухоли была без видимых изменений.

Ионизирующая радиация – один из самых мощных и наиболее изученных канцерогенных факторов физической природы. Аммиак и диоксид серы являются широко распространенными загрязнителями атмосферы. Токсикологические свойства этих газов изучены и описаны, но имеются противоречивые



А



Б

Рис. 2. Микрофотография опухоли легкого мыши линии Af. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100 (А), 400 (Б).

данные относительно их генотоксического и канцерогенного потенциала.

На сегодняшний день доказана роль генетической предрасположенности к образованию опухолей, как у человека, так и у животных. Мышиные линии, восприимчивые к спонтанным опухолям легких, более чувствительны к химически индуцированным нарушениям пролиферации [2, 4, 8].

Химическое ингаляционное и радиационное (1 Гр) воздействие в данном эксперименте вызывало значительное возрастание частоты образования опухолей у мышей линии Af, но не было отмечено возрастания количества опухолей на животное. Тогда как при действии химического канцерогена уретана, способность которого вызывать новообразование в легком лабораторных животных доказана большим количеством исследований, доля мышей данной линии с опухолями легких составляла до 100% [2]. При этом отмечалось значительное возрастание количества опухолей на животное от 0.33–0.95 в контроле до 17.0 при введении уретана.

Заключение

Химическое ингаляционное и радиационное (1 Гр) воздействие в данном эксперименте вызывало значительное возрастание частоты образования опухолей у мышей линии Af. Но при этом не было отмечено увеличения количества опухолей на животное, что характерно для индуцированного образования опухолей. Полученные результаты позволяют предположить, что данное воздействие, как радиационное, так и химическое являлось причиной возникновения генетически детерминированного образования опухолей в более раннем возрасте. Ионизирующая радиация и химическое загрязнение воздуха являются не только мощными факторами, влияющими как на жизнедеятельность, так и на состояние живых организмов, но и служат дополнитель-

ными факторами риска развития злокачественных новообразований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Ибадуллаева Е. С., Джадранов Е. С., Ергазина М. Ж., Красноштанов А. В., Красноштанов В. К., Ильясова Ж. Ж., Кулпенова С. Т. Структурные особенности метастатических поражений легких лабораторных крыс и мышей при развитии различных видов опухолей. Вестник КазНМУ. 2016; 4: 297–302.
2. Маленченко А. Ф., Конопля Е. Ф., Сушко С. Н., Савин А. О., Кадукова Е. М., Гончаров С. В. Влияние экологических факторов Полесского государственного радиационно-экологического заповедника на спонтанный и химически индуцированный мутагенез и опухолеобразование. Радиационная биология. Радиоэкология, 2009; 9(3): 317–323.
3. Океанов А. Е. Злокачественные новообразования трахеи, бронхов и легкого (МКБ – 10 С33–С34). В кн.: О.Г. Суконко. ред. 25 лет против рака. Успехи и проблемы противораковой борьбы в Беларуси за 1990–2014 годы. Минск: ГУ РНМБ; 2016: 185–195.
4. Chalela R., Curull V., Enríquez C., Pijuan L., Bellosillo B., Gea J. Lung adenocarcinoma: from molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy. J Thorac Dis. 2017; 9(7): 2142–2158.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. Of Europe, Strasbourg, 1986. 53р.
6. Foley J. F., Anderson M. W., Stoner G. D., Gaul B. W., Hardisty J. F., Maronpot R. R. Proliferative lesions of the mouse lung: Progression studies in strain A mice. Exp. Lung Res. 1991; 17: 157–168.
7. Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. URL: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/lung-new.asp> (дата обращения 19.04.2018).

8. Meuwissen R., Berns A. Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev.* 2005; 19: 643–664.
9. Nikitin A. Y., Alcaraz A., Anver M. R., Bronson R. T., Cardiff R. D., Dixon D., Fraire A. E., Gabrielson E. W., Gunning W. T., Haines D. C., Kaufman M. H., Linnoila R. I., Maronpot R. R., Rabson A. S., Reddick R. L., Rehm S., Rozengurt N., Schuller H. M., Schmidt E. N., Travis W. D., Ward J. M., Jacks T. Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse: Recommendations of the Mouse Models of Human Cancers Consortium. *Cancer Res.* 2004; 64: 2307–2316.
10. Yang I. A., Holloway J. W., Fong K. M. Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *J Thorac Dis.* 2013; 5(5): 454–462.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experim. and other scientific purposes. Coun. of Europe, Strasbourg, 1986. 53p.
6. Foley J.F., Anderson M.W., Stoner G.D., Gaul B.W., Hardisty J.F., Maronpot R.R. Proliferative lesions of the mouse lung: Progression studies in strain A mice. *Exp. Lung Res.* 1991; 17: 157–168.
7. Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Available at: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/lung-new.asp> (accessed: 19.04.2018).
8. Meuwissen R., Berns A. Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev.* 2005; 19: 643–664.
9. Nikitin A.Y., Alcaraz A., Anver M.R., Bronson R.T., Cardiff R.D., Dixon D., Fraire A.E., Gabrielson E.W., Gunning W.T., Haines D.C., Kaufman M.H., Linnoila R.I., Maronpot R.R., Rabson A.S., Reddick R.L., Rehm S., Rozengurt N., Schuller H.M., Schmidt E.N., Travis W.D., Ward J.M., Jacks T. Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse: Recommendations of the Mouse Models of Human Cancers Consortium. *Cancer Res.* 2004; 64: 2307–2316.
10. Yang I. A., Holloway J. W., Fong K.M. Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *J Thorac Dis.* 2013; 5(5): 454–462.

References

1. Ibadullaeva E.S., Dzhadranov E.S., Ergazina M.Zh., Krasnoshtanov A.V., Krasnoshtanov V.K., Il'yasova Zh.Zh., Kulpenova S.T. Strukturnye osobennosti metastaticheskikh porazhenii legkikh laboratornykh krysi i myshei pri razvitii razlichnykh vidov opukholei [Structural features of metastatic lesions of light laboratory rats and mice in the development of various types of tumors]. *Vestnik KazNMU.* 2016; 4: 297–302 (in Russian).
2. Malenchenko A.F., Konoplya E.F., Sushko S.N., Savin A.O., Kadukova E.M., Goncharov S.V. Vliyaniye ekologicheskikh faktorov Poleskogo gosudarstvennogo radiatsionno-ekologicheskogo zapovednika na spontannyy i khimicheskii indutsirovannyi mutagenez i opukholeobrazovanie [The influence of ecological factors of Polesky State Radioecological Reserve on spontaneous and chemically induced mutagenesis and tumor formation]. *Radiats Biol Radioecol.* 2009; 9(3): 317–323 (in Russian).
3. Okeanov A.E. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya trakhei, bronkhov i legkogo (МКВ – 10 S33-S34) [Malignant neoplasms of the trachea, bronchi and lung (ICD-10 C33-C34)]. V kn.: O.G. Sukonko. red. 25 let protiv raka. Uspekhi i problemy protivorakovoi bor'by v Belarusi za 1990-2014 gody. Minsk: GU RNMB; 2016: 185–195 (in Russian).
4. Chalela R., Curull V., Enríquez C., Pijuan L., Bellosillo B., Gea J. Lung adenocarcinoma: from molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy. *J Thorac Dis.* 2017; 9(7): 2142–2158.

Сведения об авторах

Тимохина Наталия Ильинична – зам. директора по научной работе ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси». 246007, Беларусь, г. Гомель, ул. Федюнинского, 4.

Надыров Эльдар Аркадьевич – преподаватель кафедры патологической анатомии УО «Гомельский государственный медицинский университет». 246000, Беларусь, г. Гомель, ул. Ланге, 5.

Веялкина Наталия Николаевна – зав. лабораторией экспериментальных биологических моделей ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси». 246007, Беларусь, г. Гомель, ул. Федюнинского, 4.

Сушко Светлана Николаевна – зав. лабораторией комбинированных воздействий ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси». 246007, Беларусь, г. Гомель, ул. Федюнинского, 4.

Гончаров Сергей Васильевич – научный сотрудник лаборатории комбинированных воздействий ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси». 246007, Беларусь, г. Гомель, ул. Федюнинского, 4.

Фабушева Ксения Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных биологических моделей ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси». 246007, Беларусь, г. Гомель, ул. Федюнинского, 4.

Поступила в редакцию 4.06.2018 г.

Для цитирования: Тимохина Н.И., Надыров Э.А., Веялкина Н.Н., Сушко С.Н., Гончаров С.В., Фабушева К.М. Генетически-обусловленное образование опухолей в легких мышей линии Af при влиянии радиационного и химического факторов, и старении. *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2018; 7(3): 56–60. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-56-60.

For citation: Timokhina N.I., Nadyrov E.A., Veyalkina N.N., Sushko S.N., Goncharov S.V., Fabusheva K.M. Genetically-caused tumor formation in lungs of mice of line Af under influence of radiation and chemical factors, and at aging. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2018; 7(3): 56–60. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-3-56-60.