



Исследование гомозиготности двух сублиний BALB/cY и BALB/cP высоко инбредной линии BALB/c

Х.Х.Семенов, Н.Н.Каркищенко, Т.Б.Бескова, Е.Л.Матвеев

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Настоящая работа посвящена исследованию гомозиготности мышей двух сублиний: BALB/cY – поддерживаемой в ГУ НЦБМТ РАМН лабораторией генетики, и BALB/cP – находящейся на размножении в питомнике лабораторных животных филиала ФИБХ РАН. Исследование проводилось методом изотрансплантации кожи. Установлено, что у мышей BALB/cY трансплантаты прижились стопроцентно. Это означает, что мыши линии BALB/cY – гомозиготны, генетически стандартны. Согласно результатам исследования между мышами линии BALB/cY и BALB/cP проявилась сублинейная гистонесовместимость. Вместе с тем, генетически неоднородными оказались мыши внутри самой сублинии BALB/cP.

Ключевые слова: трансплантация, гомозиготность, инбредные мыши, сублиния.

Иммуногенетика – наука, включающая в себя методы и принципы как генетики, так и иммунологии. Одно из главных направлений в иммуногенетике составляет генетика совместимости тканей. Основные данные, которые определяют современный уровень в этой области знаний были получены в результате изучения одного объекта – лабораторной мыши [6]. Причина выбора мышей в качестве объекта исследований заключается в том, что уже в первой половине прошлого столетия было выведено большое количество инбредных линий мышей [8], а также в исключительных успехах генетики мыши [5]. Использование генетически контролируемых животных составляет необходимое условие успешного развития генетики совместимости тканей.

Гомозиготность, генетическая стандартность линейных животных поддерживается строгим соблюдением правил

разведения инбредной линии – постоянным, тесным инбридингом, методом братско-сестринского скрещивания. Однако даже при тщательном соблюдении всех правил существует опасность возникновения гетерозиготности в высоко инбредных линиях животных. Причиной тому могут явиться как спонтанные мутации, вызванные естественным фоном радиации и другими вредными факторами окружающей среды, так и случайные скрещивания [7]. Поэтому необходимым условием для производства качественных лабораторных животных является обеспечение постоянного контроля генетической чистоты инбредных линий по генам гистосовместимости.

Материалы и методы

Для исследования были использованы мыши двух сублиний высоко инбред-

ной линии BALB/c – BALB/cY, которая поддерживается в коллекционном фонде мышей инбредных линий НЦБМТ РАМН. Мыши BALB/c поступили из Джексоновской лаборатории США в 1958 г. на 70-м поколении инбридинга (F70) в филиал «Столбовая». В Научный центр (ранее НИЛЭБМ РАМН) линия была передана из филиала «Столбовая» на 105-м поколении инбридинга (F105). В настоящее время инбредный возраст линии BALB/cY достиг 188 поколения (F188). Племенное ядро мышей линии BALB/cY поддерживается в лаборатории генетики Центра в конвенциональных условиях на гранулированном комбикорме ПК-120, в клетках фирмы Велаз Т-2, имеют сублинейный символ Y (Юрлово). Контроль гомозиготности, осуществленный в 2005 г., подтвердил идентичность мышей BALB/cY по генам гистосовместимости (Н-генам) как в племенном ядре Центра, так и у животных, разводимых в филиале «Столбовая».

Вторая сублиния BALB/c – мыши, которых разводят в питомнике лабораторных животных филиала института Биоорганической химии им. академиков М.М.Шемакина и Ю.А.Овчинникова (ФИБХ РАН, Пущино), куда они поступили в 2006 г. из питомника Charles River Laboratory (США). Пущинскую сублинию мы условно обозначили символом P – BALB/cP. Чтобы избежать влияния H-Y-антигенов, трансплантанты от самцов на самок не пересаживают: в выборку включают либо самок, либо самцов [4, 9]. В опыт для длительного наблюдения удобнее брать самок, так как половозрелые самцы агрессивны. Поэтому для исследования были отобраны 9 самок из племенного ядра инбредной линии BALB/cY так, чтобы в опыты включить мышей от

максимального количества размножающихся пар. Из питомника лабораторных животных филиала ФИБХ РАН было получено 4 самки линии BALB/cP.

Таким образом, обмен кожными трансплантатами с хвоста на бок выполняли на мышах одного пола.

Для контроля гомозиготности генетической однородности мышей инбредных линий был использован метод изотрансплантации кожи. Ценность этого метода заключается в том, что он: 1) позволяет контролировать гомозиготность по большому числу генов, так как совместимость тканей – полигенный признак; 2) дает возможность выявить очень слабые генетические различия между животными одной линии, обусловленные остаточной гетерозиготностью или спонтанными мутациями; 3) технически достаточно прост и не требует больших материальных затрат; 4) чтение результатов однозначно – приживление или отторжение пересаженной кожи; 5) генетическое засорение выявляется в короткие сроки.

Критерием гомозиготности инбредных животных при контроле методом трансплантации кожи служит 100%-приживление трансплантатов в пределах линии [3]. Для контроля на гомозиготность племядра были отобраны 2-3-х месячные мыши. Трансплантация кожи с хвоста на бок с правой стороны в области грудной клетки осуществлялась по общепринятой методике [2] в современной модификации [1]. Наблюдение за состоянием трансплантатов проводилось ежедневно в течение 30 дней, начиная с момента снятия повязки, затем 1 раз в неделю, после 200 дней 1 раз в месяц. Общий срок наблюдения при проверке на гомозиготность племенного ядра инбредной линии составляет 250-300 дней.

Как правило, в инбредной линии у мышей неприживание трансплантатов на 7-9-й день после операции происходит по техническим причинам, таким как слабое наложение повязки, случайное приклеивание коллодием трансплантата к повязке, кровоточащее ложе, сдвиг трансплантата при наложении повязки. Иногда отрицательный результат бывает из-за того, что после снятия повязки животные чешутся и срывают трансплантаты. В наших опытах отторжений по техническим причинам не наблюдалось. На пересаженной коже шерсть начинает расти на 14-20-й день после операции.

Если животные инбредной линии действительно гомозиготны, то все трансплантаты будут в хорошем состоянии в течение всего срока наблюдения, покрытые волосками, характерными для хвоста. Если наблюдается отторжение трансплантатов в ранние сроки наблюдения, то оно протекает по типу острой реакции: трансплантат воспален, образуется струп, реакция кончается полным некрозом трансплантата. Такой тип отторжения может быть в ранние сроки наблюдения (8-14-й день) и поздние (35-40-й день). Если все или большинство трансплантатов отторгается по типу острой реакции, следует делать вывод о гистонесовместимости по причине генетического засорения линии и животных такой линии считать генетически нестандартными. Иногда наблюдаются единичные случаи отторжения, как правило, от одного или двух родственных доноров. В этом случае можно полагать, что в линии возникла мутация сильного гена гистосовместимости. Животных сублинии, несущей эту мутацию, выводят из размножения, тем самым гомозиготность племенного ядра инбредной линии

восстанавливается.

Иногда наблюдают хроническое отторжение трансплантата: медленное облысение, шелушение эпидермиса, в конце концов трансплантат превращается в лысый блестящий рубец. Такую картину можно наблюдать, начиная с 40-го дня по 100-й и после 200-го дня наблюдения. Причиной является слабая гистонесовместимость, как результат мутирования слабых H-генов. Такие сублинии также выводятся из размножения в племенном ядре.

Во всех случаях отторжения трансплантатов по техническим или иммуногенетическим причинам делают повторную трансплантацию кожи от того же донора, но не раньше, чем через 14 дней после регистрации отторжения.

Результаты исследований

Результаты проверки гомозиготности мышей двух сублиний BALB/cY и BALB/cP приведены в таблице. В первом опыте, в который были включены только мыши внутри самой сублинии BALB/cY, изотрансплантация кожи показала высокую степень гомозиготности – прижились стопроцентно все 14 трансплантатов, что свидетельствует об отсутствии каких-либо изменений в локусе H-генов.

Во втором опыте был осуществлен контроль гомозиготности мышей сублиний BALB/cY и BALB/cP, у которых провели пересадку кожных локусов как в прямой, так и в обратной комбинации. В итоге более 80% трансплантатов были отторгнуты мышами как одной, так и второй сублинии. Наблюдаемое отторжение трансплантатов происходило, начиная с 37-40-го дня и шло по хроническому типу: облысение, шелушение эпидермиса, медленное превращение

Таблица

Результаты контроля гомозиготности у мышей сублиний BALB/cY и BALB/cP

№ опыта	Вариант пересадки	Число трансплантатов			
		всего	прижилось	отторглось	% отторжения
1	Y→Y	14	14	-	-
2	Y→P	12	3	9	81,8
	P→Y	10	1	9	
3	P→P	4	2	2	50

трансплантата в лысый блестящий рубец. Возможной причиной является гистонесовместимость, как результат мутирования слабых H-генов.

Аналогичную картину можно было наблюдать и в третьем опыте, где исследовались на гистосовместимость мыши внутри самой сублинии – BALB/cP. Отторжение трансплантатов у самок шло по тому же типу, что и между сублиниями BALB/cY и BALB/cP, т.е. имело место хроническое отторжение трансплантатов. Результаты этого опыта лишь подтверждают наше предположение о том, что у мышей сублинии BALB/cP произошла мутация в локусе слабых H-генов, которая и явилась причиной слабой гистонесовместимости их как с мышами сублинии BALB/cY, так и внутри самой сублинии BALB/cP.

Повторная трансплантация кожи от того же донора через 14 дней не повлияла на результаты опыта. Отторжение трансплантатов происходило, как и в первом варианте исследования. Животные таких сублиний выводятся из размножения в племенном ядре.

Обсуждение

Проведенный контроль гомозиготности двух сублиний высоко инбредной линии BALB/c подтвердил методически верное ведение генетико-селекционной

работы с племенными ядрами инбредных линий мышей коллекционного фонда НЦБМТ РАМН сотрудниками лаборатории генетики. Свидетельством тому может служить гомозиготность инбредной линии мышей BALB/cY, у которой прижились все трансплантаты. Что касается мышей сублинии BALB/cP из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, то необходимо отметить, что они оказались гистонесовместимыми не только с мышами BALB/cY, но и внутри самой сублинии BALB/cP. Приведенные факты позволяют дать объяснение полученным в настоящей работе результатам. Известно, что у животных долгое время разводимых в разных источниках, возможно проявление сублинейных различий, вызванных, как ранее было указано, мутацией слабых H-генов, возникающих под воздействием естественного фона радиации, и других вредных факторов окружающей среды.

Поскольку генетическая несовместимость мышей сублинии BALB/cP проявилась не только с мышами сублинии BALB/cY, т.е. взятой из другого источника (Юрлово), но и внутри самой сублинии BALB/cP, то животные такой сублинии не могут считаться генетически стандартными и, следовательно, подлежат выведению из размножения в племенном ядре.

Сотрудникам питомника лаборатор-

ных животных ФИБХ РАН следует регулярно (через 4 поколения) проводить генетический мониторинг, что позволит уберечь племенное ядро линии от всех форм генетических изменений.

Выводы

1. Результаты проведенного исследования выявили наличие сублинейного различия между мышами сублиний BALB/cY и BALB/cP, что было доказано отторжением трансплантатов при проведении изотрансплантации кожи между ними.

2. Выявлена гистонесовместимость мышей внутри сублинии BALB/cP из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, что является следствием произошедшей мутации в локусе слабых H-генов. Такие генетически нестандартные сублинии, как правило, выводятся из размножения племенного ядра.

3. Все трансплантаты, проведенной пересадки кожи, прижились стопроцентно; сублиния BALB/cY – гомозиготна, генетически стандартна – об этом свидетельствуют результаты контроля гомозиготности мышей из племенного ядра коллекционного фонда НЦБМТ РАМН, где поддерживается данная сублиния.

Литература

1. Бескова Т.Б. Модификация метода реципрокной трансплантации кожи у лабораторных мышей // *Биомедицина*, № 6, с.161-163, 2007.
2. Бландова З.К. Контроль гомозиготности инбредных линий мышей и крыс методом трансплантации кожи. Методические указания. – М., 1982.
3. Billingham R.E., Silvers W.K. Inbred animals and tissue transplantation

immunity // *Plast. and reconstr. surg. and transpl. bill.*, vol. 28, pp. 199-406, 1959.

4. Billingham R.E., Hodge B.A., Silvers W.K. An estimate of the number of histocompatibility loci in the rat // *Proc. nat. acad. sci. US*, vol. 48, pp. 138-147, 1962.

5. Green M.C. Mutant genes and linkages // *In Biology of the laboratory mouse* / ed. E.L.Green – N.Y.: McGraw-Hill, pp.87-151, 1966.

6. Snell G.D. The H-2 locus the mouse: Observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. – *Folia boil. (CSSR)*, v. 4, pp. 335-358, 1968.

7. Snell G.D. Note on results of Linder and Klein with coisogenic resistant of mice // *J. Nat. cancer inst.*, vol. 25, pp.1191-1193, 1960.

8. Staats J. Standardized nomenclature for inbred strains of mice: third listing // *Cancer res.*, vol. 24, pp. 147-168, 1964.

9. Ziess I.M. Demonstration of isohistogenicity in groups of rats from partionally inbred strains // *Transplantation*, vol. 4, pp. 506-509, 1966.

THE STUDY OF HOMOZYGOSIS IN TWO SUBSTRAINS BALB/cY AND BALB/cP OF HIGH INBREAD BALB/c STRAIN

H.H.Semenov, N.N.Karkischenko, T.B.Beskova, E.L.Matveenko

Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow

Homozygosis of two mice substrains (BALB/cY and BALB/cP) has been studied. The BALB/cY substrains is kept in the Scientific center of biomedical technologies RAMS. The BALB/cP substrain mice are breed in Branch of Institute of Bioorganic Chemistry RAS. Method of skin is transplantation used in these experiments. Transplants in the BALB/cP substrain mice survived in 100%. It means that BALB/cP substrain mice are homozygous and standard genetically. According to the study results between BALB/cY and BALB/cP revealed substrainical tissue incapability. Additionally, BALB/c substrain mice were heterogeneous genetically by themselves.

Key words: transplantation, homozygosis, substrain, inbred mice substrain.