

Сравнительная характеристика генетической изменчивости у лабораторных мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j из разных популяций

И. Н. Вагина, Л. М. Морозова, О. А. Ковалева¹, Т. Т. Глазко¹

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина
E-mail: alexei@imbg.org.ua

¹ Институт агроэкологии и биотехнологии УААН
Ул. Метрологическая, 12, Киев, 03143, Украина

Изучали генетическую изменчивость у мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j из «старой» и «новой» популяций. Цитогенетический анализ выявил, что мыши обеих линий «новой» популяции отличаются от мышей «старой» популяции повышенной частотой встречаемости цитогенетических аномалий в клетках как костного мозга, так и крови.

Стабильность генетической структуры популяции в течение продолжительного времени — необходимое условие получения точно воспроизводимых результатов в медико-биологических экспериментах. Даже при тщательном соблюдении всех правил разведения инбредных животных существует вероятность возникновения генетической изменчивости в популяциях высокоинбредных линий мышей [1, 2]. В том случае, если линия постоянно поддерживается инбредно, возникающие мутации могут элиминироваться или, перейдя в гомозиготное состояние, закрепляться в линии, изменив ее генотип [3]. Известно, что при передаче племенного материала инбредных линий из питомников в другие лаборатории могут образовываться сублинии [4, 5], так как в случае длительного раздельного размножения (более 12 поколений) групп животных одной линии накапливаются генетические различия между ветвями исходной линии.

Цель настоящей работы состояла в сравнении генетической изменчивости мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j «старой» и «новой» популяций. Для этого был проведен сравнительный анализ плодовитости самок, развития зародышей *in vitro* и цитогенетической изменчивости в клетках костного мозга и мазках периферической крови мышей.

Исследования проводили на инбредных мышках

двух линий BALB/c и C₅₇Bl/6j, поддерживаемых в виварии Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины более 20 лет («старая» популяция). За это время получено более 60 поколений линейных мышей и, возможно, под воздействием различных генотоксических факторов произошло изменение генетической структуры популяции. Поэтому решено было создать «новую» популяцию мышей на основе племенных ядер, завезенных из питомника «Светлые Горы» (Московская область). За прошедший период получены четыре поколения инбредных мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j.

Плодовитость самок «старой» и «новой» популяций мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j изучали, подсчитывая количество детенышей на момент родов и в месячном возрасте, а также при отсадке.

Для анализа развития зародышей исследуемых линий *in vitro* двухклеточных зародышей вымывали из яйцеводов суперовулированных самок [6] и культивировали их до стадии бластоцисты в среде M-16 по стандартной методике [7—9].

Чтобы оценить изменчивость различных цитогенетических характеристик и генотипических особенностей мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j «старой» и «новой» популяций проводили сравнительный анализ выявленных нарушений. Препараты клеток костного мозга готовили общепринятым способом [10] без применения колхицина. Рассматривали такие цитогенетические характеристики:

анеуплоидию — рассчитывали в двух вариантах (А1 — с числом хромосом 35—46 и А2 — с числом хромосом 39—41); полиплоидию (ПП); хромосомные aberrации (ХА) — хромосомные, хроматидные разрывы, фрагменты, кольцевые хромосомы; межхромосомные ассоциации по типу робертсоновских транслокаций (РБ); асинхронность расщепления центромерных районов хроматид (АРЦХ).

Количество митозов (МИ) и частоту встречаемости двуядерных лимфоцитов (ДЛ) рассчитывали на 1000 клеток, микроядра в одноядерных лимфоцитах (ЛМЯ) — по числу лимфоцитов с микроядрами на 1000 одноядерных лимфоцитов. Для микроядерного теста в периферической крови мышей готовили мазки и подсчитывали количество эритроцитов с микроядрами (ЭМЯ), одноядерных лейкоцитов с микроядрами (ЛМЯ), ДЛ, апоптотных клеток (АП) среди 3000 эритроцитов и лейкоцитов; результаты пересчитывали на 1000 клеток (%). Статистическую обработку проводили по [11, 12].

Анализ плодовитости самок мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j не выявил различий между «старой» и «новой» популяциями (табл. 1).

Полученные результаты также согласуются с данными литературы [1]. Известно, что плодовитость млекопитающих определяется их генопитом и в то же время зависит от многих биологических и средовых факторов. Взаимодействие различных звеньев воспроизведения определяет адекватную складывающимся условиям окружающей среды степень реализации репродуктивного потенциала популяции [13, 14].

По результатам культивирования *in vitro* зародышей мышей двух исследуемых линий с двухклеточной стадии до стадии бластоцисты не обнаружено существенных различий между «старой» и «новой» популяциями. Успех культивирования *in vitro* составил 58—56 % для линии BALB/c и 82—79 % — для линии C₅₇Bl/6j. При этом успех развития зародышей линии BALB/c был значительно ниже по сравнению с таковым для линии C₅₇Bl/6j. Ранее показано [15], что в культуре скорость клеточных делений у зародышей линии BALB/c замедлена по сравнению с зародышами других линий, что может привести к повышению эмбриональных потерь при имплантации.

Сравнительный анализ цитогенетических характеристик клеток костного мозга (табл. 2) свидетельствует о том, что у мышей линии BALB/c «новой» популяции частота клеток с межхромосомными ассоциациями по типу РБ достоверно выше (P < 0,01) по сравнению с мышами «старой» популяции, а также отмечена тенденция к повышению частот встречаемости метафаз с ХА. Мыши линии

Таблица 1
Плодовитость самок мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j

Линия мышей	Средняя величина помета на самку	
	На момент родов	При отсадке
BALB/c («старая» популяция)	6,7±0,3	5,8±0,4
BALB/c («новая» популяция)	6,8±0,2	6,3±0,3
BALB/c*	6,0±0,4	5,4±0,5
C ₅₇ Bl/6j («старая» популяция)	6,5±0,5	5,1±0,4
C ₅₇ Bl/6j («новая» популяция)	6,5±0,3	5,9±0,2
C ₅₇ Bl/6j*	6,6±0,2	6,2±0,4

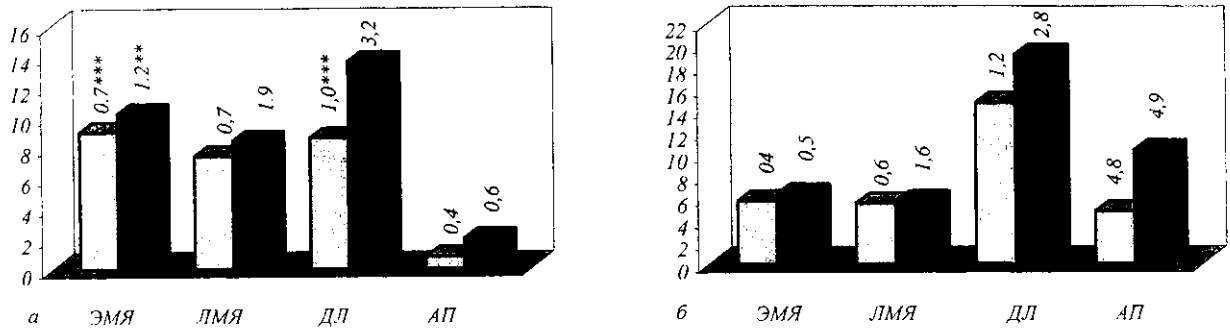
Примечание. *По данным [1].

C₅₇Bl/6j «новой» популяции отличаются от мышей «старой» популяции достоверным повышением частоты клеток с анеуплоидией 2-го типа (P < 0,05) и ДЛ (P < 0,01). При анализе мазков периферической крови использовали микроядерный тест. Присутствие клеток с микроядрами может свидетельствовать о недостаточной эффективности защитных свойств организма, так как в норме большинство таких aberrантных клеток элиминируется [16]. В мазках периферической крови у мышей обеих линий «новой» популяции также обнаруживается тенденция к повышению частот встречаемости фактически всех исследованных типов цитогенетических аномалий (рисунок).

Полученные данные свидетельствуют о том, что для обеих линий характерна повышенная частота встречаемости аномалий как в клетках костного мозга, так и в клетках периферической крови в «новых» популяциях по сравнению со «старыми». Возможно, это связано со спецификой спектра спонтанных мутаций у мышей «новых» популяций, завезенных из питомника.

Интересно отметить, что для линии BALB/c более типичны межгрупповые отличия по цитогенетическим аномалиям, связанным с внутриврохромосомными повреждениями (РБ, ХА), а для линии C₅₇Bl/6j — с изменчивостью по числу хромосом.

Проведен также сравнительный анализ межлинейных отличий по частоте встречаемости клеток с цитогенетическими аномалиями в костном мозге и периферической крови у мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j из «старой» и «новой» популяции. Так, у мышей BALB/c из «старой» популяции в костном мозге выявлена тенденция к более высокой частоте встречаемости клеток с ХА, РБ, АРЦХ и клеток А2 (различия достоверны, P < 0,05) по сравнению с мышами линии C₅₇Bl/6j. В мазках периферической крови у мышей линии BALB/c также наблюдалось достоверное повышение ЭМЯ (P < 0,05), прослеживалась тенденция к повышению ЛМЯ, а по частоте



Частота встречаемости клеток с цитогенетическими аномалиями в периферической крови мышей линий BALB/c (а) и C₅₇Bl/6j (б) «старой» и «новой» популяций: светлые столбики — BALB/c, C₅₇Bl/6j («старая» популяция); темные — BALB/c, C₅₇Bl/6j («новая» популяция). По оси ординат — частота встречаемости клеток с цитогенетическими аномалиями (%); по оси абсцисс — типы цитогенетических аномалий (ЭМЯ — эритроциты с микроядрами; ЛМЯ — лимфоциты с микроядрами; ДЛ — двуядерные лимфоциты; АП — апоптотные клетки). Достоверность различий по частоте встречаемости клеток с цитогенетическими аномалиями между мышами линий BALB/c и C₅₇Bl/6j — **P < 0,01; ***P < 0,001

Таблица 2

Частота встречаемости метафаз с цитогенетическими аномалиями (%) в клетках костного мозга мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j «старой» и «новой» популяций

Линия мышей	A1	A2	ПП	ХА	РБ	АРЦХ	ЛМЯ	ДЛ	МИ
BALB/c («старая» популяция)	39,6±7,0	12,5±5,0 ^б	2,3±1,0	4,1±2,0 ^е	7,2±2,0 ^а	3,7±2,0 ^и	4,2±0,8	5,6±0,8 ^к	2,6±0,5
BALB/c («новая» популяция)	39,6±4,0	6,6±1,0 ^б	1,4±1,0	9,3±2,0 ^е	14,5±0,4 ^б	6,4±2,0 ^и	7,6±1,7	7,1±2,1 ^к	2,1±0,5
C ₅₇ Bl/6j («старая» популяция)	36,0±5,0	0,9±1,0 ^г	2,6±1,0	0	2,9±2,0 ^а	0	3,8±1,2	6,8±1,1 ^к	5,0±2,3
C ₅₇ Bl/6j («новая» популяция)	36,6±6,0	10,4±4,0 ^б	2,3±2,0	0,7±0,4 ^и	4,2±0,8 ^а	1,1±0,7 ^з	4,2±0,7	10,8±1,4 ^з	3,8±2,2

Примечание. В каждой колонке значения со статистически достоверным различием по частоте встречаемости метафаз с цитогенетическими аномалиями отмечены разными буквами. Обозначения: A1 и A2 — анеуплоидия с числом хромосом 35—46 и 39—41; ПП — полиплоидия; ХА — хромосомные aberrации; РБ — робертсоновские транслокации; АРЦХ — асинхронность расщепления центромерных районов хроматид; ЛМЯ — лимфоциты с микроядрами; ДЛ — двуядерные лимфоциты; МИ — количество митозов.

встречаемости клеток с ДЛ отмечено достоверное снижение (P < 0,01) относительно тех же показателей в мазках крови мышей линии C₅₇Bl/6j из «старой» популяции.

Сходные межлинейные отличия выявлены и при сравнении мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j «новых» популяций. Полученные данные (табл. 2,) согласуются с литературными данными о том, что в костном мозге у мышей линии BALB/c достоверно выше частота клеток с ХА (P < 0,01) [16, 17].

Кроме того, у мышей этой линии достоверно выше частота клеток с межхромосомными ассоциациями по типу РБ (P < 0,001) и частота встречаемости клеток с АРЦХ (P < 0,05). В мазках периферической крови также наблюдалось достоверное повышение частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами у мышей линии BALB/c по сравнению с линией C₅₇Bl/6j (ЭМЯ, P < 0,05).

Возможно, более высокий уровень цитогенети-

ческих аномалий у мышей линии BALB/c связан со сниженной активностью ферментов репарации ДНК [18, 19].

Обнаружено, что для клеток костного мозга мышей линии BALB/c характерна более низкая, чем у мышей линии C₅₇Bl/6j, частота ДЛ. Для выяснения причин таких различий сравнивали частоту ДЛ на один митоз у двух линий. Оказалось, что у мышей линии BALB/c на один митоз приходится 3,4 ДЛ в «новой» популяции и 2,1 ДЛ в «старой». Для мышей линии C₅₇Bl/6j количество ДЛ на одну метафазу оказалось меньше, чем у линии BALB/c: на один митоз приходится 2,8 и 1,4 ДЛ в «старой» и «новой» популяциях соответственно. Учитывая множественные межлинейные отличия по частотам встречаемости клеток с разными цитогенетическими аномалиями, можно предположить наличие связи между повреждениями хромосомного аппарата: чем дольше продолжительность

цитокинеза (больше количество ДЛ на один митоз), как, например, у линии BALB/c, тем больше клеток с цитогенетическими повреждениями.

Необходимо отметить, что в периферической крови при отсутствии делящихся клеток ДЛ наблюдаются приблизительно в 1,8 раза чаще, чем в костном мозге. Это свидетельствует, по-видимому, о том, что часть ДЛ, обнаруженных и в крови, и в костном мозге может возникать в результате патологического замедления хода цитокинеза.

Из полученных результатов следует, что плодovitость самок мышей линий BALB/c и C₅₇Bl/6j из «старой» и «новой» популяций не различается.

Успех культивирования зародышей в системе *in vitro* в существенной мере обусловлен их генотипическими особенностями. В данной работе не обнаружено различий по результатам культивирования зародышей двух исследуемых линий мышей между «старой» и «новой» популяциями.

Мыши обеих линий «новой» популяции отличаются от мышей «старой» популяции повышенной частотой встречаемости цитогенетических аномалий как в клетках костного мозга, так и в клетках крови, что может быть обусловлено линейными особенностями уровня изменчивости рассматриваемых цитогенетических характеристик под влиянием различных экзогенных воздействий. Мыши линии BALB/c как из «старой», так и из «новой» популяций отличаются от мышей линии C₅₇Bl/6j не только по частоте клеток с ХА, но и по целому комплексу других типов цитогенетических аномалий. Для линии BALB/c более типичны нарушения, связанные с внутриврохромосомными повреждениями (РБ, ХА), а для линии C₅₇Bl/6j — с изменчивостью по числу хромосом (анеуплоидия).

I. N. Vagina, L. M. Morozova, O. A. Kovaleva, T. T. Glazko

Comparison of genetic variability in BALB/c and C₅₇Bl/6j mouse lines from diverse populations

Summary

Genetic variability in mouse lines BALB/c and C₅₇Bl/6j from «old» and «new» populations has been studied. A cytogenetic analysis has shown that mice from the both lines of «new» population differ from those of «old» population by a higher frequency of cytogenetic anomalies in bone marrow and blood cells.

I. M. Vagina, L. M. Morozova, O. A. Kovaleva, T. T. Glazko

Порівняльна характеристика генетичної мінливості у лабораторних мишей ліній BALB/c і C₅₇Bl/6j з різних популяцій

Резюме

Вивчали генетичну мінливість у мишей ліній BALB/c і C₅₇Bl/6j із «старої» і «нової» популяцій. Цитогенетичний аналіз виявив, що миші обох ліній «нової» популяції відрізняються від мишей «старої» популяції підвищеною частотою

зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах як кісткового мозку, так і крові.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бландова З. К., Душкин В. А., Малащенко А. М., Шмидт Е. Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований.—М.: Наука, 1983.—192 с.
2. Федоров В. К., Еремеев Н. С., Ивонин А. А. К вопросу об установлении и сохранении линейных особенностей у животных // Биология лаб. животных.—М.: Наука, 1971..
3. Михайлова Т. Н., Зингер Т. В., Шубина Т. С. Характеристика некоторых нормативных показателей линейных мышей // Использование лаб. животных в разработке, производстве и контроле биол. мед. препаратов.—М., 1976.—С. 208—210.
4. Bailey D. W. Rates of subline divergence in highly inbred strains of mice // J. Hered.—1959.—50.—Р. 26—30.
5. Шмидт Е. Ф., Буцолит Э., Надудвари И., Семин Г. В. Дивергенция инбредных линий и нелинейных лабораторных животных // Биол. характеристика лаб. животных и экстраполяция на человека эксперим. данных.—М., 1980.—С. 108—110.
6. Hogan B., Constantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1986.—332 p.
7. Whittingham D. G. Culture of mouse ova // J. Reprod. Fertil.—1971, Suppl. 14.—Р. 7—21.
8. Lawitts J. A., Biggers J. D. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods // J. Reprod. Fertil.—1991.—91.—Р. 543—556.
9. Lawitts J. A., Biggers J. D. Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media // Mol. Reprod. and Devel.—1992.—31.—Р. 189—194.
10. Орлов В. Н., Чудиновская Г. А., Крюкова Е. П. Исследование хромосомных наборов млекопитающих.—М.: Наука, 1976.—36 с.
11. Плохинский Н. А. Биометрические методы в генетических исследованиях.—М.: Изд-во МГУ, 1966.—601 с.
12. Лакин Г. Ф. Биометрия.—М.: Высш. шк., 1990.—352 с.
13. Евсиков В. И. Генетика и феногенетика плодovitости млекопитающих: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—Новосибирск: ИГиГ СО АН СССР, 1975.—36 с.
14. Евсиков В. И. Генетико-физиологические взаимоотношения мать—плод и их влияние на адаптивные признаки потомков // Онтогенез.—1998.—29, № 6.—С. 405—417.
15. Smith R., McLaren A. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocel // J. Embryol. and Exp. Morphol.—1977.—41.—Р. 79—92.
16. Корогодина Ю. В., Лилья И. Г. Мутабельность соматических клеток мышей разных линий. Сообщ. II // Цитология и генетика.—1978.—12, № 2.—С. 134—136.
17. Глазко Т. Т., Сафонова Н. А., Бунтова Е. Г., Глазко Г. В., Созинов А. А. Гетерогенность цитогенетической изменчивости в клетках костного мозга лабораторных и диких грызунов в условиях зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // Цитология и генетика.—1996.—30.—С. 25—34.
18. Sato S., Takizawa H., Inui N. Mouse strain differences in induction of micronuclei by base analogues and nucleosides // Mutat. Res.—1993.—301.—Р. 45—49.
19. Okayasu R., Suetomi D., Yu Y., Silver A., Bedford J. S., Coxnub R., Ultrich R. L. A deficiency in DNA repair and DNA-PKcs expression in the radiosensitive BALB/c mouse // Cancer Res.—2000.—60.—Р. 4342—4345.

УДК 575.22

Надійшла до редакції 27.05.04