

## СПОНТАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА У МЫШЕЙ ЛИНИЙ СВА И СВА/Н-Т6



*Выполнен сравнительный анализ частот встречаемости разных типов цитогенетических аномалий в клетках костного мозга мышей линий СВА и СВА/Н-Т6. В результате получены данные, свидетельствующие об определенном дестабилизирующем влиянии носительства транслокации Т6 на аппарат клеточного деления, что может приводить к появлению дополнительных цитогенетических аномалий.*

© О.А. КОВАЛЕВА, Т.Т. ГЛАЗКО, И.Н. ВАГИНА, 2006

**Введение.** В литературе достаточно давно накапливаются данные о том, что носительство конститутивных цитогенетических аномалий по одним хромосомам сопровождается дестабилизацией всего хромосомного аппарата и повышенной частотой встречаемости цитогенетических аномалий по другим хромосомам. Такие наблюдения проведены на модельных объектах, у дрозофилы, мыши, а также у человека [1–4]. Например, в работе [4] получены данные о том, что в спермиях носителей конститутивной транслокации t(3;15) обнаруживается статистически достоверное увеличение частот встречаемости дисомии по хромосоме 21, а также повышенная частота диплоидных спермиев. В то же время в другой работе [5] авторы отмечают, что повышенная частота нерасхождения на фоне конститутивных транслокаций отмечалась для хромосом 21-й пары, но не для хромосом пар 13 и 18. Однако до сих пор этот вопрос остается дискуссионным [5].

В настоящей работе выполнен сравнительный анализ частот встречаемости разных типов цитогенетических аномалий в клетках костного мозга мышей линий СВА и СВА/Н-Т6. Инбредная линия СВА выведена в 1920 г. в результате скрещивания самки Bagg albino и самца линии DBA. Для самок этой линии характерна высокая частота опухолей молочной железы, для самцов — спонтанных гепатом (<http://www.jax.org>). Мыши этой линии широко используются в различных генетико-физиологических исследованиях. Одна из основных сублиний, СВА/Н-Т6, несет транслокацию между 14-й и 15-й хромосомами (14:15) (рисунок). Носители транслокации, полученные доктором М.Ф. Lyon, имеют хромосомный маркер — уменьшенную в результате реципрокной транслокации хромосому Т6. Животных линии СВА/Н-Т6 используют, в частности, для получения химер с линией СВА в исследованиях клеточного происхождения опухолей, в которых хромосома Т6 служит маркером для отличия происходящих от линии СВА/Н-Т6 клеток от других клеток.

В настоящей работе эти линии были использованы для того, чтобы оценить влияние носительства конститутивной цитогенетической аномалии на общую стабильность хромосомного аппарата.

**Материалы и методы.** Выполнен цитогенетический анализ клеток костного мозга у мы-

шей линии СВА/Н-Т6, взятых в анализ в ноябре 2004 г. из вивария Института молекулярной биологии и генетики (7 животных), и линии СВА, взятых в анализ в январе 1998 г. из вивария Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Каецкого (4 животных). Все животные 11–14-месячного возраста.

Препараты клеток костного мозга готовили общепринятым способом (без применения колхицина): из бедренных костей задних лапок мышей вымывали гипотоническим раствором КС1 (0,54 %) костный мозг, клетки суспендировали и инкубировали в этом растворе при 37 °С в течение 20 мин, затем фиксировали смесью метилового спирта и уксусной кислоты (3:1), далее готовили препараты и окрашивали их красителем Гимза («Мерск», Германия). Количество двухъядерных лимфоцитов и одноядерных лимфоцитов с микроядрами подсчитывали на тех же препаратах в лимфоцитах, сохранивших цитоплазму, по стандартной методике.

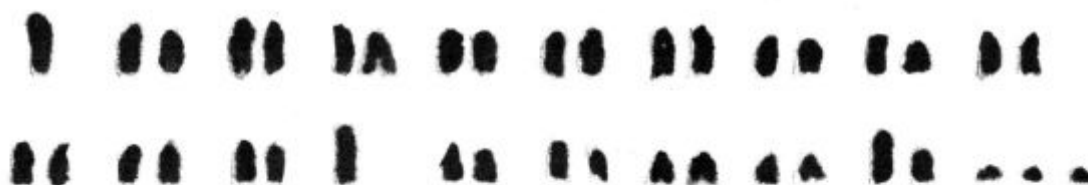
Для анализа цитогенетической изменчивости рассматривали следующие характеристики дестабилизации генетического аппарата клеток: анеуплоидия, рассчитанная в двух вариантах (А1, с числом хромосом  $\pm 6$  к диплоидному числу — 40 хромосом мыши; и А2, с

числом хромосом  $\pm 1$  к диплоидному числу хромосом), полиплоидия (ПП), хромосомные aberrации (ХА) (хромосомные, хроматидные разрывы, фрагменты, кольцевые хромосомы), асинхронность расщепления центромерных районов хромосом (АРЦХ), межхромосомные ассоциации по типу робертсоновских транслокаций (РБ). Количество митозов (МИ) и частоту встречаемости двухъядерных лимфоцитов (ДЛ) рассчитывали на 1000 клеток, микроядра в одноядерных лимфоцитах (ЛМЯ) — по числу лимфоцитов с микроядрами на 1000 одноядерных лимфоцитов.

Статистическую достоверность различий по цитогенетическим аномалиям между группами животных оценивали по критерию Стьюдента ( $t_s$ ).

**Результаты исследований и их обсуждение.** В целях увеличения количества цитогенетических аномалий, доступных для подсчета («разрешаемости» метода), в анализ были включены животные в возрасте 11–14 мес, поскольку принято считать, что с возрастом количество клеток с цитогенетическими аномалиями увеличивается.

В результате выполненного сравнения самцов и самок линии СВА/Н-Т6 обнаружено, что эти две группы не отличались статистически достоверно друг от друга по частотам встре-



Кариограмма мыши линии СВА/Н-Т6 (самец)

Таблица 1

Частота встречаемости метафаз с цитогенетическими характеристиками у мышей линии СВА/Н-Т6 (11–13 мес)

№ животного	Количество метафаз	Метафаз 2n = 40, %	Полипloidия, %	Доля метафаз, %					Частота на 1000 одноядерных лейкоцитов, ‰				
				А-I	А-II	ХА	РБ	АРЦХ	ЛМЯ	ДЛ	Апоптозов	Метафаз	Анафаз
1. ♂	100	55,0	12,0	29,0	15,3	3,0	3,0	9,0	5,0	3,3	1,0	3,0	3,0
2. ♂	100	51,0	10,0	38,0	21,5	4,0	8,0	6,0	2,0	8,6	0,6	1,3	3,0
3. ♂	62	62,0	16,1	20,9	11,3	3,2	8,0	3,2	4,0	6,3	2,3	1,6	1,3
Ср♂		56,0 ± 3,2	12,7 ± 17	29,3 ± 4,9	16,0 ± 2,9	3,4 ± 0,3	7,0 ± 1,7	6,0 ± 1,6	3,6 ± 0,8	6,0 ± 1,5	1,3 ± 0,5	1,9 ± 0,5	2,4 ± 0,5
4. ♀	100	51,0	16,0	33,0	27,0	7,0	7,0	2,0	4,3	10,6	2,3	2,0	5,0
5. ♀	100	55,0	8,0	37,0	12,0	4,0	13,0	2,0	2,3	12,6	0	0,6	1,6
6. ♀	100	54,0	10,0	35,0	16,9	2,0	5,0	3,0	4,0	8,3	1,0	1,0	2,0
7. ♀	100	55,0	4,0	41,0	25,6	3,0	6,0	2,0	7,0	11,0	1,0	3,0	3,3
Ср♀		53,7 ± 0,9	9,5 ± 3,4	36,5 ± 1,7	20,3 ± 3,5	4,0 ± 1,0	7,7 ± 1,7	2,2 ± 0,2	4,4 ± 0,9	10,6 ± 0,8	1,0 ± 0,4	1,6 ± 0,4	2,9 ± 0,7
Σср.		54,7 ± 1,3	10,8 ± 1,6	33,4 ± 2,5	18,5 ± 2,3	3,7 ± 0,6	7,1 ± 1,1	3,8 ± 1,0	4,0 ± 0,6	8,6 ± 1,1	1,1 ± 0,2	1,7 ± 0,3	2,7 ± 0,4

Таблица 2

Средние значения частот метафаз с цитогенетическими характеристиками у самцов мышей линий СВА/Н-Т6 и СВА

№ животного	Количество метафаз	Метафаз 2n = 40, %	Полипloidия, %	Доля метафаз, %					Частота на 1000 одноядерных лейкоцитов, ‰				
				А-I	А-II	ХА	РБ	АРЦХ	ЛМЯ	ДЛ	Апоптозов	Метафаз	Анафаз
СВА/Н-Т6 (11–13 мес)													
Ср♂	262	56,0 ± 3,2	12,7 ± 17	29,3 ± 4,9	16,0 ± 2,9	3,4 ± 0,3	7,0 ± 1,7	6,0 ± 1,6	3,6 ± 0,8	6,0 ± 1,5	1,3 ± 0,5	1,9 ± 0,5	2,4 ± 0,5
СВА (12–14 мес)													
Ср♂	200	59,0 ± 6,0	5,0 ± 2,0	36,0 ± 4,0	12,0 ± 4,0	6,0 ± 1,0	2,0 ± 1,0	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,6	5,0 ± 1,1	0,7 ± 0,4	2,7 ± 0,6	

чаемости в клетках костного мозга таких цитогенетических аномалий, как типы анеуплоидии I и II, полиплоидные клетки, метафазы с хромосомными aberrациями (ХА), центрическими слияниями по типу робертсоновских транслокаций (РБ), лейкоциты с микроядрами (ЛМЯ). Сходными у разных полов были количество делящихся (метафаз, анафаз) и апоптозных клеток (табл. 1). В то же время у самцов частота встречаемости метафаз с асинхронным расщеплением центромерных

районов хромосом была статистически достоверно выше (АРЦХ, P < 0,05), а частота встречаемости двухъядерных лейкоцитов ниже (ДЛ, P < 0,05), чем у самок, т.е. в клетках костного мозга у самцов обнаруживалось повышенное количество метафаз с АРЦХ, которое ранее мы наблюдали у некоторых лабораторных линий мышей, подвергавшихся действию повышенного ионизирующего облучения [6], а у самок — увеличение количества ДЛ на один митоз, свидетельствующее о замедлении про-

хождения клетками этапа цитокинеза (табл. 1).

Сравнительный анализ частот встречаемости цитогенетических аномалий в клетках костного мозга самцов мышей линий СВА/Са и СВА/Н-Т6 свидетельствует о том, что у самцов — носителей конститутивной транслокации Т6 по сравнению с исходной родительской линией выше частота встречаемости метафаз с центрическими слияниями по типу робертсоновских транслокаций и с АРЦХ (табл. 2), но статистически достоверно ниже — с ХА ( $P < 0,05$ ).

Повышенная частота центрических слияний у мутантной линии хорошо согласуется с описанным в литературе увеличением частоты нерасхождения хромосом у носителей конститутивных транслокаций у человека [1—5]. Повидимому формирование таких транслокаций ассоциировано с дефектами аппарата клеточного деления, что может приводить к появлению дополнительных цитогенетических аномалий. Поскольку исследованная группа мышей линии СВА/Н-Т6 не давала потомство, можно предположить, что наблюдаемый у мутантной линии такой комплекс цитогенетических аномалий ведет к снижению репродуктивной функции животных.

Обращает также на себя внимание то, что в клетках костного мозга мутантной линии присутствует необычно большое количество анафаз у мышей обоего пола (табл. 1). В клетках родительской линии, не несущей конститутивных транслокаций, анафазы ни в одном из случаев не встречаются с частотой, сопоставимой с частотой метафаз. При расчете количества анафаз в промилле с учетом 3000 лейкоцитов, как правило, частота встречаемости анафаз близка к 0,3%. В наших исследованиях особой отличительной чертой носителей конститутивной транслокации мышей линии СВА/Н-Т6 (по сравнению с родительской линией) является сопоставимость частот встречаемости анафаз и метафаз, т.е. определенная задержка прохождения стадии анафазы.

**Выводы.** Носители конститутивной транслокации Т6 отличаются от родительской линии замедлением прохождения некоторых этапов митоза, а также повышением центрических слияний по типу робертсоновских транслокаций. У самцов мутантной линии об-

наруживается также повышенная частота асинхронного расщепления центромерных районов хромосом в конце метафазы, а у самок более выражено замедление стадии цитокинеза. Формирование транслокации Т6 ассоциировано с дефектами аппарата клеточного деления, что приводит к появлению дополнительных цитогенетических аномалий.

*SUMMARY.* Comparative analysis of cytogenetic characteristics in bone marrow cells of the mouse lines СВА and СВА/Н-Т6 has been carried out. It was shown that translocation Т6 effects the apparatus of cell division and can cause additional cytogenetic abnormalities.

*РЕЗЮМЕ.* Виконано порівняльний аналіз частот зустрічальності різних типів цитогенетичних аномалій в клітинах кісткового мозку мишей ліній СВА та СВА/Н-Т6. В результаті отримано дані, які свідчать про певний дестабілізуючий вплив присутності транслокації Т6 на апарат клітинного поділу, що може призводити до появи додаткових цитогенетичних аномалій.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grell R.F.* Distributive pairing in man? // *Ann. Genet.* — 1971. — **14**. — P. 165—171.
2. *Ford C.E., Evans E.P.* Robertsonian translocations in mice: segregational irregularities in male heterozygotes and zygotic imbalance // *Chromosome Today.* — 1973. — **4**. — P. 387—397.
3. *Goldman A.S.H., Hulten M.A.* Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a human male reciprocal translocation heterozygote, t(1;11)(p36.3;q13.1), using fluorescence in situ hybridization // *Cytogenet. Cell. Genet.* — 1993. — **63**. — P. 16—23.
4. *Blanco J., Egozcue J., Vidal F.* Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei // *Hum. Genet.* — 2000. — **106**. — P. 500—505.
5. *Estop A.M., Cieply K., Munne S., Surti U., Wakim A., Feingold E.* Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies // *Hum. Genet.* — 2000. — **106**. — P. 517—524.
6. *Глазко Т.Т., Ковальова О.А., Придатко О.Є.* Мінливість різних характеристик дестабілізації каріотипу у зв'язку з віком, сезоном дослідження та в умовах хронічного іонізуючого опромінення у мишей ліній ВАLB/с, С57ВL/6 та СС57W/Мv // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.* — К.: Логос, 2001. — **4**. — С. 140—145.

Поступила 16.02.06