

УДК 575.16:612.825.3:599.323

БАТАРЕЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ 1×СЗ СОХРАНЕНИЕ ИЛИ ОТСУТСТВИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ОДНОЙ ИЗ РОДИТЕЛЬСКИХ ЛИНИЙ

© 2009 г. О. С. Бояршинова¹, А. М. Малашенко², Ф. З. Бизикоева³,
А. В. Ревин⁴, И. Г. Лильп³, И. И. Полетаева¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
кафедра высшей нервной деятельности, Москва 119911;
e-mail: inga@protein.bio.msu.ru

²Всероссийский научный центр биомедицинских технологий Российской академии медицинских наук,
Московская область, Красногорский р-н, п. отд. Отрадное 143412

³Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва 115522

⁴Институт биологии гена Российской академии наук, Москва 119334

Поступила в редакцию 10.09.2007 г.

Мыши ранее выведенных рекомбинантных инбредных линий (РИЛ), полученных от скрещивания мышей 101/НУ (несущих аллель *mut-1*, определяющий повышенную чувствительность к мутагенному действию алкилирующих соединений) и СЗН/Sn (с отсутствием этого признака), были тестированы на наличие у них двух неврологических аномалий – аудиогенной эпилепсии и расщепления слоя пирамидных клеток поля СА3 гиппокампа (свойственных только линии 101/НУ). Оказалось, что расщепление РИЛ по этим признакам не зависело от наличия или отсутствия аллеля *mut-1*. Это свидетельствует о возникновении у мышей линии 101/НУ независимых от *mut-1* мутаций, ведущих к возникновению неврологических аномалий. Появление таких мутаций может быть следствием дефекта генетической репарации, обнаруженного ранее у мышей данного генотипа.

Соматические и половые клетки мышей инбредной линии 101/НУ обладают повышенной чувствительностью к химическим мутагенам, в том числе к кластогенному эффекту алкилирующего агента тиофосамаида, что предположительно связано с мутацией в локусе *mut-1* и/или дефектом эксцизионной репарации ДНК, обнаруженным у мышей данного генотипа [1, 2]. У мышей этой же линии в серии исследований был продемонстрирован целый ряд отклонений от нормы в функциях ЦНС [3]. К этим отклонениям относятся: повышенная по сравнению с мышами других генотипов склонность к развитию состояния тревоги [3], наличие аномальных попятных движений [4], расщепление пирамидного слоя клеток в поле СА3 гиппокампа [5], а также склонность к аудиогенным припадкам [6]. Одной из возможных причин наблюдаемых отклонений в поведении мышей 101/НУ может быть плейотропное действие мутации локуса *mut-1* (*mutator-1*) на физиологические реакции этих животных. Альтернативным объяснением продемонстрированных особенностей у мышей 101/НУ может быть повышенная частота появления мутаций, в том числе и затрагивающих функции ЦНС, обусловленная тем же локусом *mut-1*, который определяет высокую чувствительность соматических клеток к химическим мутагенам [1].

Мы попытались выяснить, оказывает ли локус *mut-1* влияние на такие признаки, как склонность мышей к аудиогенным припадкам и расщепление слоя пирамидных клеток гиппокампа. Одним из путей проверки подобного предположения может быть оценка наличия или отсутствия данных аномальных признаков ЦНС у мышей рекомбинантных инбредных линий (РИЛ) 101×СЗН. Данная группа РИЛ была получена от скрещивания мышей линий 101/НУ и СЗН/Sn – контрастных по упомянутой выше генетически детерминированной чувствительности к химическим мутагенам [7]. У мышей линии СЗН/Sn (с низкой чувствительностью клеток к действию тиофосамаида) в отличие от мышей 101/НУ отсутствует предрасположенность к аудиогенной эпилепсии, а слой пирамидных нейронов поля СА3 имеет нормальное строение. В соответствии с методикой выведения РИЛ [8], мышей-гибридов, начиная с F₂, размножали инбредно, формируя тем самым новые инбредные линии.

Полученные линии (к моменту тестирования их подверженности действию мутагена они прошли более 20 поколений инбридинга) “распались” на две группы. У мышей одной группы линий (1×СЗ-6, 1×СЗ-9, 1×СЗ-17) признак повышенной чувствительности клеток к химическим мутагенам обнаружился, а в другой (1×СЗ-1,

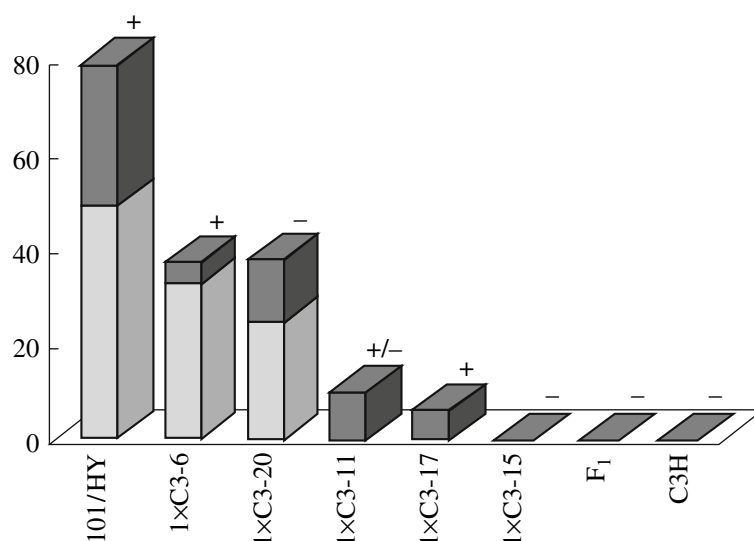


Рис. 1. Предрасположенность к аудиогенной эпилепсии у 2-месячных самцов пяти рекомбинантных линий 1×СЗ, обнаруживших и не обнаруживших повышенную чувствительность к мутагенному действию тиофосфамида, а также у мышей линий 101/НУ, СЗН и их гибридов F₁. По оси ординат – доли животных, чувствительных к звуку (в %). Обозначения: ■ – двигательное возбуждение; □ – судорожный припадок и/или гибель животного. +, ±, – – высокая, средняя и низкая чувствительность клеток костного мозга мышей соответствующей линии к кластогенному эффекту тиофосфамида (3 мг/кг массы тела [7]).

1×СЗ-2, 1×СЗ-4, 1×СЗ-5, 1×СЗ-10, 1×СЗ-11, 1×СЗ-12, 1×СЗ-14, 1×СЗ-15, 1×СЗ-18, 1×СЗ-19, 1×СЗ-20) – отсутствовал [7]. Это означает, что в первой группе произошла фиксация аллеля *mut-1* линии 101/НУ, тогда как в линиях второй группы фиксации данного аллеля не произошло, т.е. у них присутствовал аллель “дикого типа” другой родительской линии – СЗН.

В настоящей работе у мышей этих РИЛ были проанализированы предрасположенность к аудиогенной эпилепсии, а также наличие или отсутствие расщепления слоя пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа. Аудиогенную чувствительность (рис. 1) определяли у мышей родительских линий, их F₁, а также у пяти РИЛ (1×СЗ-6, 1×СЗ-20, 1×СЗ-11, 1×СЗ-17 и 1×СЗ-15), контрастных по признаку чувствительности к тиофосфамиду (далее **ЧТ** – чувствительные и **НЧТ** – нечувствительные линии) [7].

Аудиогенная эпилепсия. Тестирование проводили в звукоизолирующей камере, где животного подвергали действию сильного звука (120 дБ). В ответ на звук у мыши мог развиваться аудиогенный судорожный припадок, начальная фаза которого – быстрый беспорядочный бег (двигательное возбуждение) – могла смениться клоническими и тоническими судорогами, после которых в некоторых случаях наступала смерть животного.

Морфологическое исследование. Животных анестезировали нембуталом в дозе 50 мг/кг массы тела, после чего проводили транскардиальную перфузию мозга (0.2 М фосфатный буфер и 4%-

ный раствор параформальдегида). Срезы мозга (40 мкм) получали на замораживающем микротоме и окрашивали крезил-виолетом по методу Ниссля.

Тестирование аудиогенной эпилепсии мышей исследуемых генетических групп показало, что гибриды F₁ были нечувствительны к звуку. Это свидетельствует о рецессивном характере наследования данного признака. Проанализированные РИЛ разделились по этому признаку на три группы в зависимости от чувствительности к звуку, т.е. с высокой, средней и “нулевой” чувствительностью. К первой группе мы отнесли мышей линии 101/НУ, 1×СЗ-6 (ЧТ) и 1×СЗ-20 (НЧТ), ко второй – линии 1×СЗ-11 (НЧТ) и 1×СЗ-17 (ЧТ), к третьей – 1×СЗ-15 (НЧТ), F₁ и СЗН (рис. 1). Подобное распределение РИЛ свидетельствует, что аудиогенная эпилепсия у мышей 101/НУ контролируется более чем одним рецессивным геном.

Как можно видеть на рис. 1, распределение РИЛ по чувствительности клеток к действию химических мутагенов не совпало со степенью выраженности у них аудиогенной эпилепсии, что свидетельствует о независимом наследовании этих двух признаков, т.е. аудиогенная эпилепсия у мышей линии 101/НУ обусловлена мутантными аллелями в генах, не сцепленных с локусом, контролирующим повышенную чувствительность клеток к тиофосфамиду. Таким образом, наличие в генотипе локуса *mut-1* не является обязательным условием проявления аудиогенной эпилепсии в этой батарее РИЛ.

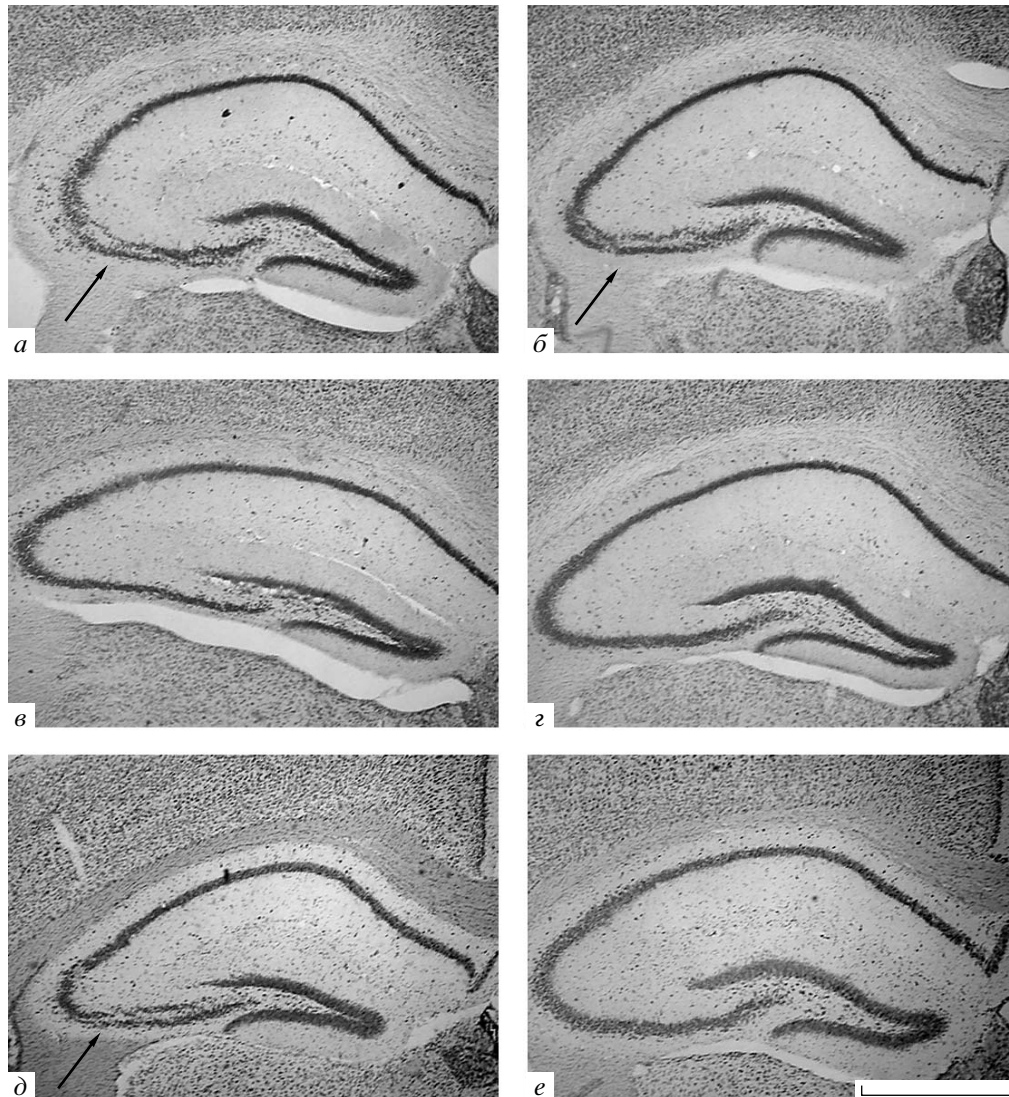


Рис. 2. Микрофотографии срезов мозга мышей (окраска по методу Ниссля) линий 101/НУ, СЗН и четырех РИЛ. Линии: *a* – 1×СЗ-9, *б* – 1×СЗ-14, *в* – 1×СЗ-6, *г* – 1×СЗ-15, *д* – 101/НУ, *е* – СЗН/Sp. Шкала – 500 мкм. Стрелкой показано расщепление слоя пирамидных клеток поля СА3 гиппокампа.

Морфология гиппокампа была проанализирована нами у четырех РИЛ из семи (по 4 мозга в каждой из линий). На рис. 2 представлены микрофотографии срезов мозга мышей четырех генотипов – 1×СЗ-6 (ЧТ), 1×СЗ-9 (ЧТ), 1×СЗ-14 (НЧТ) и 1×СЗ-15 (НЧТ). Как можно видеть, морфологическая аномалия мозга, т.е. расщепление пирамидного слоя поля СА3 гиппокампа (как и у мышей линии 101/НУ) (рис. 2, *д*), имеется у линии 1×СЗ-9 (ЧТ) и линии 1×СЗ-14 (НЧТ) из исследуемой батареи РИЛ (рис. 2, *а* и *б* соответственно). В то же время у одной ЧТ линии (1×СЗ-6) и у одной НЧТ линии (1×СЗ-15) (рис. 2, *в, г*) морфология гиппокампа соответствовала норме и была такой же, как и у мышей линии СЗН (рис. 2, *е*). Более того, мы не обнаружили какой-либо корреляции между дефектом строения гиппокампа и склонностью

мышей к аудиогенным припадкам – мыши РИЛ 1×СЗ-6, чувствительные к звуку, не обнаружили никаких отклонений в строении гиппокампа. Следовательно, мутация, контролирующая расщепление слоя пирамидных клеток (а это может быть мутация *Hld* – hippocampal lamination defect [9]), не влияет на повышенную чувствительность мышей к аудиогенной эпилепсии.

Таким образом, появление двух аномальных неврологических признаков – аудиогенной эпилепсии и расщепления слоя пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа – не связано, по всей видимости, с плейотропным эффектом аллеля *mut-1*. Возможно, что этот вывод можно распространить и на другие аномальные признаки, свойственные мышам линии 101/НУ. В процессе формирования РИЛ данные аномалии ЦНС распреде-

лились по новым линиям независимо от локуса *mut-1*. Можно предположить, что эти аномалии обусловлены более частым возникновением мутаций у мышей линии 101/НУ, возможно, из-за обнаруженного у них дефекта генетической репарации. Полученная в данной работе информация важна для понимания генетических основ поведения животных, в том числе особенностей поведения и морфогенеза мозга у мышей линии 101/НУ, которых рассматривают в качестве одной из немногих лабораторных моделей ряда наследственных заболеваний человека, сопровождающихся хромосомной нестабильностью и неврологическими отклонениями [2, 3].

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-01287, 08-04-00881-а, 07-04-12120-офи, 07-04-00835-а), Российского гуманитарного научного фонда (грант № 06-06-00351а) и Швейцарского национального научного фонда (грант № IB74ВО-111081) и Госконтракта № 02.512.11.2224 от 4.07.2008 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бескова Т.Б., Малащенко А.М. Кластогенный эффект тиофосфамида в сперматогониях мышей инбредных линий // Генетика. 1991. Т. 27. № 2. С. 38–45.
2. Сьякте Т.Г. Моделирование наследственных болезней человека с хромосомной нестабильностью на линейных мышах // Лабораторные животные. 1992. Т. 2. № 2. С. 19–24.
3. Лильн И.Г., Полетаева И.И., Бизикоева Ф.З., Иванов В.И. Поведение мышей линии 101/НУ – модели наследственных заболеваний человека с хромосомной нестабильностью // Генетика. 1992. Т. 28. № 3. С. 87–97.
4. Полетаева И.И., Лильн И.Г., Ирисова О.А., Иванов В.И. Необычный тип локомоции у мышей линии 101/НУ // Генетика. 1992. Т. 28. № 12. С. 14–149.
5. Лильн И.Г., Плещачева М.Г., Полетаева И.И. и др. Аномалии строения гиппокампа у мышей линии 101/НУ // Онтогенез. 2002. Т. 33. № 3. С. 206–212.
6. Полетаева И.И., Лильн И.Г., Бизикоева Ф.З., Иванов В.И. Аудиогенная эпилепсия у мышей линии 101/НУ в разные периоды постнатального онтогенеза // Онтогенез. 1996. Т. 27. № 3. С. 222–231.
7. Малащенко А.М., Бескова Т.Б. Изучение межлинейных различий у мышей по чувствительности к тио-ТЭФ: опыт с рекомбинантными линиями // Генетика. 1995. Т. 31. № 7. С. 965–970.
8. Nesbitt M.N. The value of recombinant inbred strains in the genetic analysis of behavior // Techniques for the genetic analysis of brain and behavior: focus on the mouse / Eds D. Goldovitz, D. Wahlsten, R.E. Wimer. N.Y.; L.e.a.: Elsevier. 1992. P. 141–161.
9. Nowakowski R.S. Development of hippocampal formation in mutant mice // Drug. Dev. Res. 1988. V. 15. № 1. P. 1–22.

The 1×С3 Panel of Recombinant Inbred Mouse Strains. Presence or Absence of Pathologic Neurologic Traits of One of Parental Strains

O. S. Boyarshinova^a, A. M. Malashenko^b, F. Z. Bizikoeva^c, A. V. Revischin^d,
I. G. Lilp^c, and I. I. Poletaeva^a

^aDepartment of Higher Nervous Activity, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 19991 Russia

e-mail: inga@protein.bio.msu.ru

^bAll-Russia Scientific Center for Biomedical Technologies, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow oblast, Krasnogorsk raion, Otradnoe, 143412 Russia

^cResearch Center for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia

^dInstitute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

Mice from the earlier developed recombinant inbred strains (RIS), which were derived by crossing 101/HY mice (carrying the *mut-1* allele determining increased susceptibility to the mutagenic action of alkylating compounds) with С3Н/Sn mice (lacking this trait), were tested for the presence of two neurological pathologies, audiogenic epilepsy and splitting of pyramidal cell layer of the CA3 hippocampal field (specific only to 101/HY mice). It was demonstrated that segregation of RIS relative to these traits was independent from the presence or absence of the *mut-1* allele. These findings suggested the appearance of *mut-1*-independent mutations in the 101/HY mice, which resulted in the development of neurological pathologies. The appearance of such mutations can be the consequence of the genetic repair defects, earlier observed in the mice with the same genotype, or they can be caused by other reasons.