

УДК 597.851:575.17

ЗАКОНОМЕРНОСТИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ У ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК ГИБРИДНОГО КОМПЛЕКСА *RANA ESCULENTA* (AMPHIBIA, RANIDAE)

И. И. Козиненко, Е. И. Жалай, Н. С. Заводникова

*Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины,
ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев, 01601 Украина
E-mail: zhalai@ukr.net*

Принято 10 октября 2007

Закономерности ксенотрансплантации у зеленых лягушек гибридного комплекса *Rana esculenta* (Amphibia, Ranidae). Козиненко И. И., Жалай Е. И., Заводникова Н. С. — Для решения вопросов формирования гибридного комплекса *Rana esculenta* применен иммуногенетический метод пересадки кожи, позволяющий определять изменчивость гибридов и родительских видов по антигенам гистосовместимости. Обмен ксенографтами проведен между лягушками и их гибридом; исследованы животные из различных типов гибридных систем, известных для Украины. Для аллодиплоидных гибридов установлено доминирование генов главного комплекса гистосовместимости прудовой лягушки над озерной.

Ключевые слова: гибридный комплекс *Rana esculenta*, иммуногенетические исследования, ксенотрансплантация.

Regularities of Xenotransplantation in the Hybrid Complex of Water Frogs *Rana esculenta* (Amphibia, Ranidae). Kozinenko I. I., Zhalai E. I., Zavodnikova N. S. — Certain issues concerning the development of the hybrid complex of *Rana esculenta* were resolved by applying the immunogenetic method of skin transplantation, which allows to identify the variability of hybrids and parent species according to antigens of histocompatibility. The exchange of xenografts was accomplished between the frogs and their hybrids; the study involved animals representing various hybrid systems known in Ukraine. For alloidiploid hybrids the domination of genes of the major complex of histocompatibility of *R. lessonae* over *R. ridibunda* has been established.

Key words: *Rana esculenta* hybrid complex, immunogenetic studies, xenotransplantation.

Введение

Многочисленными исследованиями доказано (Uzzell et al., 1980; Боркин и др., 1987; Виноградов и др., 1988; Tunner, Heppich-Tunner, 1991), что стабильная аллодиплоидная структура гибридов поддерживается за счет элиминации на премейотических стадиях генома одного из родительских видов. При этом геном другого вида передается потомкам без рекомбинации (Tunner, 1974). В связи с этим можно предположить разную степень родства между гибридом (*Rana* kl. *esculenta*) и двумя видами зеленых лягушек — озерной (*R. ridibunda* Pallas, 1771) и прудовой (*R. lessonae* Camerano, 1882). Поскольку исследования целесообразно проводить не по отдельным локусам, предложен иммуногенетический анализ по главному комплексу гистосовместимости, который отличается полигенностью (наличием нескольких неаллельных близкосцепленных генов, белковые продукты которых сходны в структурном отношении и выполняют идентичные функции) и большим полиморфизмом — присутствием многих аллельных форм одного и того же гена.

В задачи исследования входило установление для аллодиплоидных гибридов доминирования генов главного комплекса гистосовместимости родительских видов. В связи с предполагаемой избирательностью ответа гибридов на тканевые антигены озерной и прудовой лягушек, также важно было оценить, насколько чужеродным воспринимают гибрид родительские виды и связана ли направленность элиминации генома у гибрида с доминированием генов главного комплекса гистосовместимости.

Материал и методы

Опыты проведены на европейских зеленых лягушках гибридного комплекса *Rana esculenta*: озерной, прудовой, а также на аллодиплоидных гибридах. В ходе эксперимента по ксенотрансплантации изучали реакции родительских видов на гибрид и гибрида на родительские виды. Эксперименты поставлены в 2003—2005 гг. на животных (всего 192 экз.) из 6 популяций, разных по составу населения гибридных систем: REL (озерная — «R», прудовая — «L» лягушки и их межвидовой гибрид — «E»), RE (озерная и гибрид), LE (прудовая и гибрид). Выбор опытных участков обусловлен прохождением зон гибридизации зеленых лягушек (Межжерин и др., 2005). Изучены гибридные популяции Среднего Приднепровья, низовий Дуная, равнинного Закарпатья и бассейна Северского Донца.

Среднее Приднепровье. Популяции: REL (пос. Новобеличи, Киевская обл., окр. Киева); LE (пгт Барышевка, Киевская обл. и г. Нежин, Черниговская обл.) и L (прудовые лягушки) (с. Лесники, Обуховский р-н Киевская обл.). Последние необходимы при ксенотрансплантациях, проведенных на выборках из RE-популяции, в которых отсутствуют прудовые лягушки.

Низовья Дуная. RE-популяция (г. Вилково, Кикийский р-н, Одесская обл.)¹.

Равнинное Закарпатье. RE-популяция (с. Цеглинка, Ужгородский р-н, Закарпатская обл.).

Бассейн Северского Донца. RE-популяция (с. Гайдары, Змиевский р-н, Харьковская обл.).

За основу взят классический метод трансплантации тканей (skin grafting) (Hildemann, Haas, 1959), разработанный на головастиках *R. catesbeiana* и модифицированный для лягушек, прошедших метаморфоз (Plyuscz, Semik, 1980; Козиненко и др., 2006).

В качестве контроля определяли уровень внутривидовой изменчивости озерной $R_x \leftrightarrow R_y$; прудовой $L_x \leftrightarrow L_y$ лягушек и гибрида $E_x \leftrightarrow E_y$ при аллотрансплантациях. Также осуществлен обмен ксенографтами между видами.

Результаты оценивали по продолжительности латентной фазы (период распознавания иммунокомпетентными клетками реципиента чужеродных антигенов).

Данные обработаны статистически. Схема обмена ксенографтами между видами и гибридом представлена на рисунке 1.

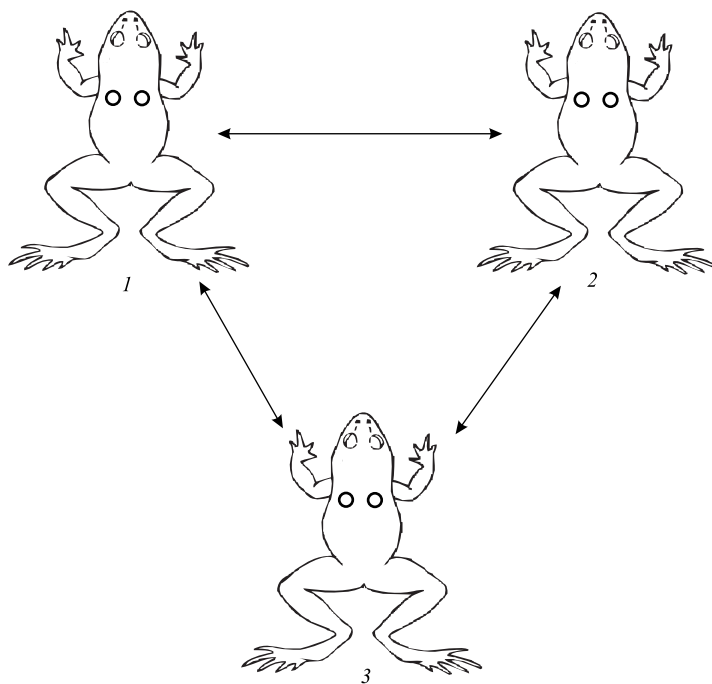


Рис. 1. Схема обмена графтами при ксенотрансплантациях: 1 — озерная лягушка; 2 — прудовая лягушка; 3 — гибрид.

Fig. 1. Scheme of graft exchange for purposes of xenotransplantation: 1 — *R. ridibunda*; 2 — *R. lessonae*; 3 — hybrid.

¹ При гибридизации элиминируется геном озерной лягушки, в остальных случаях — прудовой.

Результаты и обсуждение

Общепринято, что различия по тканевым антигенам между видами превосходят внутривидовые (Hildemann, 1962, 1972; Сюзюмова, 1971; Płytycz, Semik, 1980). В гибридном комплексе зеленых лягушек, взаимоотношение генетических форм в котором отличается сложностью, сроки распознавания чужеродных антигенов при межвидовых пересадках не всегда достоверно снижаются по сравнению с внутривидовыми. Безусловно, имеет значение и статус холодно-кровных животных, и уровень развития иммунной системы в целом, а также степень иммуногенности чужеродных антигенов (Hildemann, 1962).

Установлено, что длительность латентной фазы у гибрида при распознавании тканевых антигенов родительских видов различается. По антигенам гистосовместимости гибриды обнаруживают большее родство с прудовой лягушкой. Закономерность установлена для зеленых лягушек разных типов гибридных систем: не только в популяции REL-типа, в которой представлены гибрид и оба вида, но и в популяциях, где отсутствует либо прудовая (RE), либо озерная (LE) лягушки (табл. 1–3). Распознавание антигенов прудовой лягушки совпадает по срокам с распознаванием иммунокомпетентными клетками гибрида аллогraftов, пересаженных от других гибридных особей. Этот факт дополнительно свидетельствует о схожести прудовой лягушки и гибрида по антигенам гистосовместимости.

Родство гибридной формы по антигенам гистосовместимости с прудовой лягушкой никак не коррелирует и с направленностью элиминации родительских геномов, т. е. геном какого вида, озерной или прудовой лягушки, элиминируется в процессе гибридогенеза.

Различия выявлены также и между видами по скорости отторжения пересаженных им graftов гибрида. В данном случае ткани гибрида, как близкородственные, воспринимает озерная лягушка. Для прудовой лягушки тканевые антигены гибрида в такой же степени чужеродны, как и антигены озерной. Аналогично озерная лягушка воспринимает graftы гибрида и прудовой лягушки, сроки их распознавания достоверно не различаются. Результаты обмена ксенографтами между прудовой и озерной лягушками свидетельствуют о разной степени их иммуногенности. Поскольку, являясь по видоспецифичным антигенам друг для друга равно чужеродными, прудовая отторгает ткани озерной достоверно раньше. Описанные тенденции, как и реакция гибрида на антигены

Таблица 1. Динамика отторжения кожных graftов у зеленых лягушек рода *Rana* и их гибридов в популяции REL-типа.

Table 1. Dynamics of the rejection of skin grafts in *Rana* waterfrogs and their hybrids in populations of REL-type

Реципиент	Донор	Год	Средняя длительность латентной фазы, сут			
			n	Min–max, сут	M ± m	CV
Гибрид	Озерная	2003	10	12–26	14,60 ± 1,30	28,22 ± 6,31
		2004	19	12–26	16,53 ± 0,86	22,57 ± 3,66
	Прудовая	2003	8	16–28	24,63 ± 1,78	3,41 ± 0,85
		2004	18	15–28	21,17 ± 1,13	22,72 ± 3,79
	Гибрид	2003	18	16–27	24,33 ± 1,03	18,00 ± 3,00
		2004	18	9–33	23,33 ± 1,78	26,19 ± 5,35
Озерная	Прудовая	2004	6	20–22	22,56 ± 1,21	22,70 ± 3,78
		2004	6	20–22	21,33 ± 0,42	4,83 ± 1,39
	Озерная	2004	6	20–22	21,33 ± 0,42	4,83 ± 1,39
Прудовая	Гибрид	2003	12	9–33	23,33 ± 1,78	26,19 ± 5,35
		2004	18	9–33	22,56 ± 1,21	22,70 ± 3,78
	Озерная	2004	6	20–22	21,33 ± 0,42	4,83 ± 1,39
		2003	12	10–22	17,58 ± 0,98	19,34 ± 3,95
	Прудовая	2003	9	12–17	14,33 ± 0,60	12,56 ± 2,96
Прудовая	Гибрид	2004	15	12–22	15,93 ± 0,83	20,21 ± 3,69
		2004	5	14–22	18,40 ± 1,57	19,08 ± 6,03
	Озерная	2003	17	16–29	21,12 ± 0,94	18,42 ± 3,16

Таблица 2. Динамика отторжения кожных графтов у зеленых лягушек рода *Rana* и их гибридов в популяции RE-типаTable 2. Dynamics of the rejection of skin grafts in *Rana* waterfrogs and their hybrids in populations of RE-type

Реципиент	Донор	Средняя длительность латентной фазы, сут			
		n	Min–max, сут	M ± m	CV
Выборка из RE-популяции г. Вилково, 2004 г.					
Гибрид	Озерная	15	13–17	14,47 ± 0,41	11,06±2,02
	Прудовая	15	15–20	17,13 ± 0,52	11,68±2,13
Озерная	Гибрид	12	15–25	18,75 ± 0,84	15,45±3,15
	Гибрид	19	15–27	18,32 ± 0,68	16,27±2,64
	Прудовая	19	13–27	16,95 ± 0,98	25,13±4,08
Прудовая	Озерная	9	11–15	13,22 ± 0,70	15,94±3,76
	Гибрид	18	13–20	16,06 ± 0,60	15,88±2,65
	Озерная	19	10–17	14,42 ± 0,48	14,49±2,35
Выборка из RE-популяции с. Цегливка, 2004 г.					
Гибрид	Озерная	8	9–14	11,50 ± 0,60	14,70±3,68
	Прудовая	8	16–23	19,88 ± 0,83	11,87±2,97
Озерная	Гибрид	4	16–19	16,75 ± 0,75	8,96±3,17
	Прудовая	4	21–26	22,75 ± 1,18	10,37±3,67
Прудовая	Гибрид	7	7–12	10,43 ± 0,78	19,85±5,31
	Озерная	8	7–14	10,00 ± 1,00	28,30±2,59
Выборка из RE-популяции с. Гайдары, 2005 г.					
Гибрид	Озерная	26	11–18	13,96±0,41	14,97±2,08
	Прудовая	26	13–22	16,88±0,44	13,21±1,83
Озерная	Гибрид	27	13–27	18,19 ± 0,87	24,90±3,39
	Прудовая	27	13–27	20,30 ± 0,74	18,97±2,58
Прудовая	Гибрид	27	11–19	12,52 ± 0,37	15,26±2,08
	Озерная	25	11–15	11,84 ± 0,23	9,63±1,36

Таблица 3. Динамика отторжения кожных графтов у зеленых лягушек рода *Rana* и их гибридов в популяции LE-типаTable 3. Dynamics of the rejection of skin grafts in *Rana* waterfrogs and their hybrids in populations of LE-type

Реципиент	Донор	Средняя длительность латентной фазы, сут			
		n	Min–max, сут	M±m	CV
Выборка из LE-популяции пгт. Барышевка, 2004 г.					
Гибрид	Озерная	19	8–22	15,37 ± 0,91	25,67 ± 4,16
	Прудовая	20	13–20	17,15 ± 0,45	11,72 ± 1,85
	Гибрид	20	11–24	17,25 ± 0,72	18,61 ± 2,94
Озерная	Гибрид	18	8–20	16,67 ± 0,94	23,82 ± 3,97
	Прудовая	19	11–22	15,90 ± 0,67	18,24 ± 2,96
Прудовая	Гибрид	20	8–15	11,65 ± 0,61	23,35 ± 3,69
	Озерная	18	11–15	12,56 ± 0,41	14,01 ± 2,34
	Прудовая	16	15–24	21,56 ± 0,57	10,60 ± 1,87
Выборка из LE-популяции г. Нежин, 2005 г.					
Гибрид	Озерная	9	6–16	11,72 ± 1,02	26,06 ± 6,14
	Прудовая	9	12–18	15,44 ± 0,87	16,84 ± 3,97
	Гибрид	15	8–14	11,47 ± 0,58	20,23 ± 3,69
Озерная	Гибрид	9	11–17	12,56 ± 0,63	14,97 ± 3,53
	Прудовая	9	12–16	13,78 ± 0,49	10,74 ± 2,53
Прудовая	Гибрид	9	6–16	11,11 ± 1,11	29,97 ± 7,06
	Озерная	9	6–14	10,56 ± 0,82	23,30 ± 5,49
	Прудовая	13	8–16	11,39 ± 0,76	23,88 ± 4,68

Примечание. В пересадках использованы озерные лягушки из REL-популяции, пос. Новобеличи.

родительских видов, справедливы для всех изученных типов популяций, вне зависимости от их географической локализации и видового состава гибридного комплекса.

Таким образом, установлены различия как по реакции гибрида на тканевые антигены двух родительских видов, так и неодинаковое восприятие озерной и прудовой лягушками тканевых антигенов гибрида. При сравнении реакции на ксенографты между видами установлено, что прудовая раньше отторгает графты озерной, возможно, в силу большей иммуногенности последней.

Гибриды аллодиплоиды формально являются генетически равноудаленными от родительских видов. Если это так, то можно ожидать, что для гибридов ткани обоих видов будут чужеродными в равной степени. Тем не менее по морфологии гибриды могут быть приближены к озерной или к прудовой лягушке, по экологическим характеристикам они более похожи на прудовых лягушек (Berger, 1988). Это связано с проявлением доминирования генов одного вида над другим. Установленный факт разной степени родства по антигенам гистосовместимости межвидового гибрида с видами, его образовавшими, также свидетельствует о доминировании генов прудовой лягушки. Следовательно, у гибридов зеленых лягушек наследование генов главного комплекса гистосовместимости идет не путем кодоминирования, как отмечено для млекопитающих (Buus et al., 1987).

Противоположные данные получены польскими исследователями (Semik, 1983). Авторы изучали становление трансплантационного иммунитета у земноводных, и в частности зеленых лягушек гибридного комплекса *Rana escukenta*. Для южнопольской популяции зеленых лягушек большой антагонизм по антигенам гистосовместимости выявлен между гибридом и прудовой лягушкой. Кроме того, подчеркивается, что гибриды отторгают родительские графты всегда быстрее, нежели аллографты, пересаженные от других гибридных особей. То есть установлена закономерность обратная, полученной нами.

К сожалению, недостаточно данных, которые бы позволили объяснить такие различия. Возможно, большее родство гибрида с озерной лягушкой по антигенам гистосовместимости характерно только для данной популяции. К тому же исследовано незначительное количество особей и проведен только качественный анализ результатов. И самое главное, неизвестна генетическая структура популяции.

Что же касается реакции родительских видов на тканевые антигены гибрида, то озерные лягушки, как из южнопольской, так и из описанных нами популяций, характеризуются большей продолжительностью латентной фазы, нежели прудовые. Причем длительность распознавания озерными лягушками чужеродных тканевых антигенов одинакова при пересадке как ксенотрансплантатов гибрида, так и прудовой лягушки.

Выводы

Иммуногенетический анализ зеленых лягушек гибридного комплекса *Rana esculenta*, проведенный по результатам ксенотрансплантаций, позволяет сделать следующие выводы:

1. Гибриды отторгают ксенографты родительских видов, озерной и прудовой лягушек, дифференциально, обнаруживая по антигенам гистосовместимости родство с прудовыми лягушками.

2. Анализ трансплантационного ответа двух родительских видов выявил между ними различия по отношению к тканевым антигенам их межвидового гибрида. Прудовые лягушки распознают и отторгают ткани гибрида достоверно раньше, нежели озерные.

3. Для прудовой лягушки озерная и гибрид по антигенам гистосовместимости достоверно не различается. Иммунная система озерной лягушки также сходно воспринимает тканевые антигены прудовой и гибрида.

4. Отмеченные тенденции справедливы для всех трех типов гибридных популяционных систем — REL, RE, LE, вне зависимости геном какого вида элиминируется в процессе гибридогенеза.

Авторы искренне признательны С. Ю. Морозову-Леонову (Институт зоологии НАН Украины, Киев) и Ф. Ф. Куртяку (Ужгородский национальный университет) за предоставленный материал из Харьковской и Закарпатской областей.

- Боркин Л. Я., Виноградов А. Е., Розанов Ю. М., Цауне И. А.* Полуклональное наследование в гибридогенном комплексе *Rana esculenta*: доказательство методом проточной цитометрии // Докл. АН СССР. — 1987. — **295**, № 5. — С 1262—1264.
- Виноградов А. Е., Розанов Ю. М., Цауне И. А., Боркин Л. Я.* Элиминация генома одного из родителей до премейотического синтеза ДНК у гибридогенного вида *Rana esculenta* // Цитология. — 1988. — **30**, № 6. — С. 691—697.
- Козиненко И. И., Жалай Е. И., Заводникова Н. С.* Особенности аллотрансплантации в гибридном комплексе *Rana esculenta* (Amphibia, Ranidae) // Вестн. зоологии. — 2006. — **40**, № 1. — С. 49—53.
- Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю., Некрасова О. Д. и др.* Пространственная структура гибридного комплекса зеленых лягушек *Rana esculenta* L. на территории Украины // Материали Першої конф. укр. герпетол. тов-ва. — К., 2005. — С. 110—114.
- Сюзюмова Л. М.* Внутривидовые особенности тканевой совместимости у полевок в связи с генетической структурой их популяций и некоторыми вопросами микроэволюции : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Ин-т экологии растений и животных. — Свердловск, 1971. — 25 с.
- Berger L.* On the origin of the genetic systems in European water frog hybrids // Zool. Pol. — 1988. — **35**. — P. 5—32.
- Buus S., Sette A., Colon S. M. et al.* The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides // Science. — 1987. — **235**, N 4794. — P. 1353—1358.
- Hildemann W. H.* Immunogenetic studies of amphibians and reptiles // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1962. — **97**. — P. 139—152.
- Hildemann W. H.* Transplantation antigens — New York ; London : Acad. Press, 1972. — P. 2—17.
- Hildemann W. H., Haas R.* Homotransplantation immunity and tolerance in the bullfrog // The Journal of Immunology. — 1959. — **83**, N 5. — P. 478—485.
- Plytycz B., Semik D.* Rejection of skin allo- and xenografts in the grass frog, *Rana temporaria* and the edible frog, *Rana esculenta* // Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. — 1980. — N 28. — P. 625—634.
- Semik D.* Comparison of reactions to skin grafts in green frogs: *Rana lessonae* Cam., *R. esculenta* L. and *R. ridibunda* Pall. // Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. — 1983. — N 31. — P. 429—436.
- Tunner H. G.* Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation // Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch. — 1974. — **12**. — S. 309—314.
- Tunner H. G., Heppich-Tunner S.* A new population system of water frogs detected in Hungary : Abstract 6 Ord. Gen. Meet. Soc. Eur. Herp. (Budapest, 19—23 August, 1991). — Budapest, 1991.
- Uzzell T., Hotz H., Berger L.* Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid: evidence from electrophoresis of individual oocytes // J. of Experimental Zoology. — 1980. — **214**, N 3. — P. 251—259.