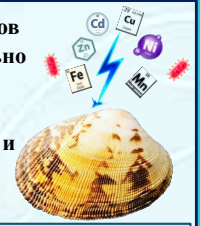


Оценка возможностей метода проточной цитометрии в отношении цитогенетического анализа гемоцитов *Bivalvia* в морской экотоксикологии

А. В. Синенко*, Н. К. Христофорова, А. А. Анисимова

Институт Мирового океана, Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, sinenko.avia@dvfu.ru*

Работа посвящена анализу результатов измерения содержания ДНК в гемоцитах двусторчатых моллюсков *Ruditapes philippinarum* с четырех станций б. Новик (о-в Русский, зал. Петра Великого) (Рис. 1), предварительно исследованных на предмет биоаккумуляции тяжелых металлов (Fe, Mn, Cu, Zn, Cd, Ni) (Табл. 1) мягкими тканями. Дана оценка диагностической значимости маркеров генотоксического повреждения гемоцитов – профиля митотического цикла (ДНК-профиль), среднего значения содержания ДНК (*c*-индекс) и коэффициента вариации (КВ) размера генома – при их определении методом проточной цитометрии в зависимости от способа подготовки образцов.



Акватория	Концентрация тяжелых металлов, мкг/г сух. массы					
	Fe	Mn	Cu	Zn	Cd	Ni
м. Узкий	377±68	9.8±2.2	7.85±1.03	76.1±5.2	0.91±0.16	3.88±0.94
о-в Елены	473±124	11.7±2.7	8.12±1.53	81.3±7.0	1.83±0.66*	4.23±1.79
пос. Подножье	545±191	9.7±2.4	8.2±1.78	62.7±13.2	1.09±0.44	3.99±1.25
м. Старицкого	284±70	6.4±2.0	8.56±0.84	62.5±9.3	0.85±0.27	3.25±0.72

Рисунок 1 – Станции сбора материала в бухте Новик. 1 – м. Узкий, 2 – о-в Елены, 3 – пос. Подножье, 4 – м. Старицкого.

У особой со станции «о-в Елены» было отмечено достоверно более высокое содержание Cd, что позволяет считать данную акваторию самой загрязненной станцией из всех исследованных.

1. Методом проточной цитометрии гемоциты *R. philippinarum* были дифференцированы по параметрам светорассеяния на три структурных типа – регионы R1, R2 и R3, соответствующие трем морфотипам, определяемым микроскопически – гемобластам, гиаиноцитам и гранулоцитам (Рис. 2).

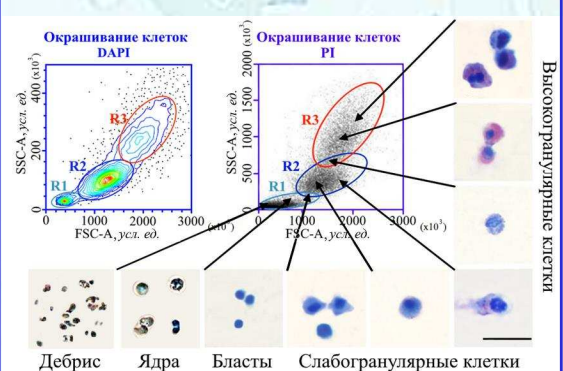


Рисунок 2 – Позиционирование объектов, выявляемых в образцах гемолимфы *R. philippinarum*, на гистограммах распределения событий по переднему (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. Размерный отрезок – 10 мкм.

4. Результаты проточной цитометрии отличались в зависимости от того, какой краситель был применен для окрашивания ДНК – 4',6-диамидин-2-фенилиндол (DAPI) или йодистый пропидий (PI). Окрашивание клеток PI предполагает использование детергента Triton X-100, что приводило к повреждению гемоцитов и высвобождению клеточных ядер. Последние по своим физическим характеристикам близки к гемобластам и попадают в R1 (Рис. 2). При окрашивании PI число событий в R1 всегда было в разы выше, чем при окрашивании DAPI, максимальные различия, достигающие шести крат, были зарегистрированы в выборке со станции «м. Узкий», что можно связать с повышенной готовностью клеток к разрушению в связи с гипоксией.

5. Выход ядер из клеток в результате пробоподготовки влиял на характер распределения событий по содержанию ДНК и, соответственно, на показатели *c*-индекса. При измерении целых клеток на станциях «м. Узкий» и «м. Старицкого» он оказался самым высоким – больше 3. При измерении чистых ядер на всех станциях произошло смещение частот в пользу диплоидных событий, что снизило *c*-индекс. На станции «м. Узкий» это было связано с разрушением двуядерных клеток и суммированием выпавших ядер в единый диплоидный пик (Рис. 5), однако даже при таком раскладе доля тетраплоидных значений все равно была выше, что говорит о вкладе полиплоидии в высокий *c*-индекс. На остальных станциях наблюдали снижение *c*-индекса ядер, связанное только с устраниением цитоплазмы.

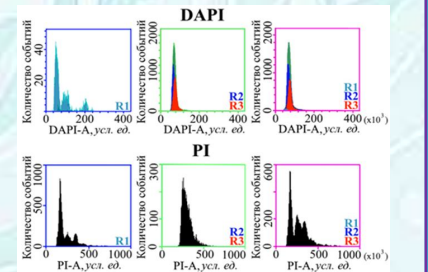


Рисунок 5 – ДНК-профиль моллюска со станции «м. Узкий» при использовании двух методик.

2. Дифференциальная оценка содержания ДНК в клетках разных регионов показала, что пролиферативная активность свойственна только гемобластам из региона R1 (Рис. 3).

Доля клеток в разных фазах митотического цикла варьировала от полного отсутствия G₂/M-клеток (пролиферации нет) (Рис. 3, б1) до симметричного распределения клеток на два пика (тотальная пролиферация) (Рис. 3, б5) или преобладания полиплоидных клеток классов 3 и 4 с (Рис. 3, б6).

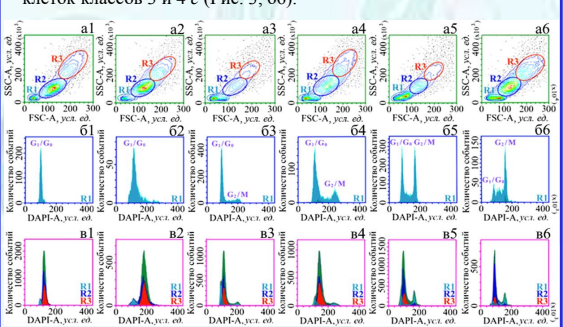


Рисунок 3 – Вариабельность параметров популяции гемоцитов *R. philippinarum* на примере шести особей (1–6) со станции «пос. Подножье».

3. Полиплоидные и анеуплоидные значения регистрировались в клетках регионов R2 и R3 (Рис. 3, в), а количество событий в R3 прямо коррелировало с количеством гемоцитов с признаками незавершенного или асимметричного митоза – наличием крупных (Рис. 4, а) и плеоморфных ядер (Рис. 4, б) дополнительных ядер (Рис. 4, в), микроядер и ядерных пузырьков (Рис. 4, г).

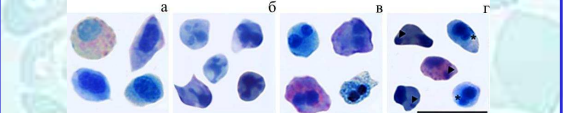


Рисунок 4 – Ядерные aberrации в гемоцитах *R. philippinarum*. Окраска по Романовскому-Гимзе. Размерный отрезок – 10 мкм.

Таким образом, ядра разрушенных гемоцитов могли изменять пропорцию выявляемых классов плоидности. Это приводило к занижению *c*-индекса, определяемого на гистограммах распределения событий региона R1 по содержанию ДНК. Эти результаты указывают на источники дополнительного цитоплазматического свечения в гемоцитах рудитапесов со станций «о-в Елены» и «пос. Подножье».

6. При измерении содержания ДНК в целых клетках достоверные различия в значениях КВ размера генома обнаружены не были, но при пересчете КВ по отдельным ядрам выявлялись различия между выборками со станций «м. Узкий» и «о-в Елены». КВ размера генома у моллюсков со станции «о-в Елены» при анализе ядер показал наибольшее значение среди всех, что было скоррелировано с повышенным содержанием кадмия.

7. На всех станциях кроме «м. Узкий» гемоциты были заражены риккетсиоподобными организмами (РПО), вызывающими разрушение клеток и их ядер, агрегацию и дегрануляцию гемоцитов (Рис. 6). У зараженных особей в клетках R2 и R3 наблюдали увеличение КВ содержания ДНК, сдвиг модального значения ДНК вправо от диплоидного эталона и увеличение *c*-индекса, что связано с наличием чужеродной ДНК (Рис. 7).

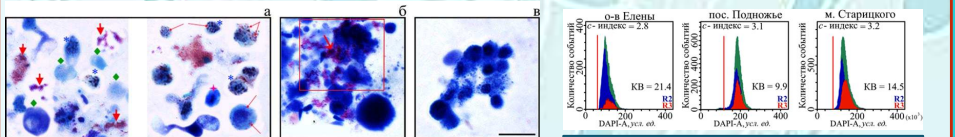


Рисунок 6 – Риккетсиоподобные организмы (РПО) в гемолимфе (толстые стрелки) и внутри гемоцитов (тонкие стрелки) (а), и вызванные ими агрегация (б) и дегрануляция (в) гемоцитов. Окраска по Романовскому-Гимзе. Размерный отрезок – 10 мкм.

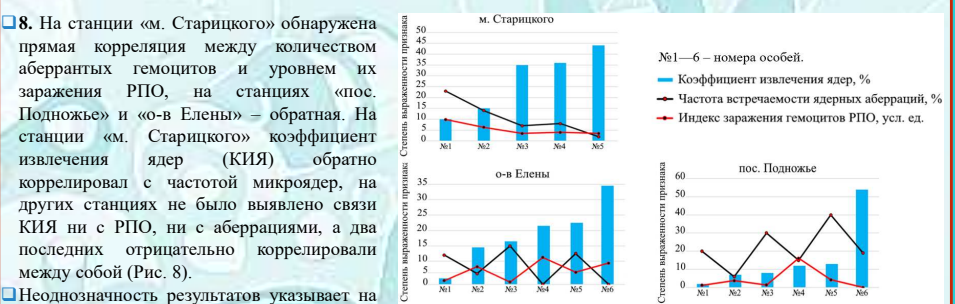


Рисунок 8 – Связь между уровнем заражения внутриклеточными РПО, ядерными aberrациями и коэффициентом излучения ядер (КИЯ) у гемоцитов *R. philippinarum* с трех станций б. Новик. №1–6 – номера особей.