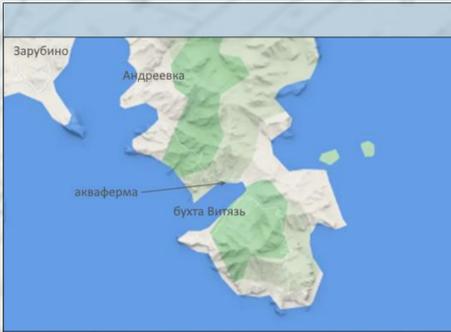


Анализ клеточной популяции гемоцитов приморского гребешка из зоны аквакультуры в б. Витязь в связи с подозрением на гемическую неоплазию

А. А. Анисимова, М. Н. Дягилева, И. А. Железнов, Д. В. Носков, В. Г. Спудулите

Институт Мирового океана, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия,

anisan77@mail.ru



В ходе скрининга природных популяций двусторчатых моллюсков залива Петра Великого на предмет состояния системы клеточного иммунитета в некоторых его районах были обнаружены патологические изменения гемоцитов у приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*, соответствующие картине гемической неоплазии.



Факт быстрого распространения этого заболевания в морских акваториях вызывает настороженность в отношении здоровья моллюсков в аквакультуре. Настоящая работа посвящена комплексному анализу гемоцитов приморского гребешка, выращиваемого в б. Витязь, в связи с сообщением о массовой гибели особей в одном из хозяйств (Рис. 1).

Рисунок 1 – Место сбора материала в бухте Витязь (отмечено местоположение аквафермы “Гребеньфарм”, ООО “Эффективная энергия”).

Анализ цельной гемолимфы

На мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, микроскопический анализ показал массовое присутствие клеток атипичной морфологии в гемолимфе гребешков (до 99 % у отдельных особей), некоторые из них содержали митотические фигуры (Рис. 2А).

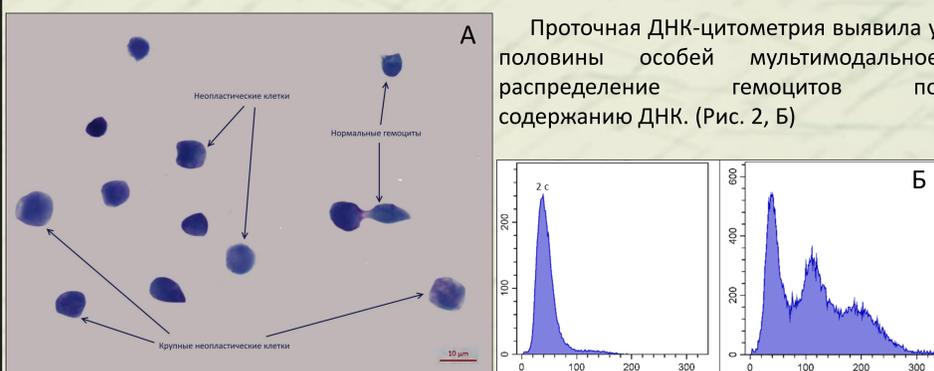


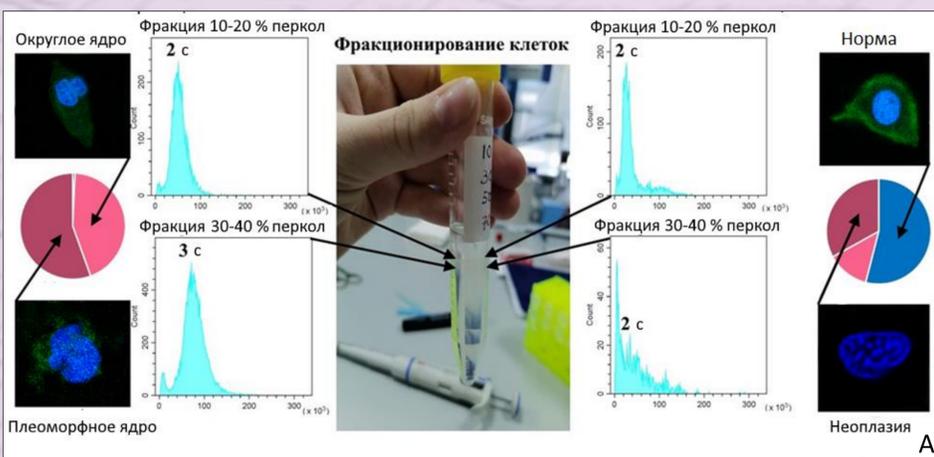
Рисунок 2 – Морфология (А) и содержание ДНК (Б) в гемоцитах приморского гребешка, взятого из аквафермы “Гребеньфарм”.

Дифференциальная оценка морфологии и генетического статуса гемоцитов при их разделении в градиенте плотности перколла.

Было проведено фракционирование клеток трех образцов гемолимфы путем центрифугирования в градиенте плотности перколла 10–20–30–40 % с последующей проточной цитометрией в присутствии внутреннего гаплоидного стандарта (сперматозоиды *M. yessoensis*). В каждом случае был получен результат, подтверждающий как внутри-, так и межиндивидуальную генетическую вариабельность атипичных клеток (Рис. 3).

Пример 1

Пример 2



В первом образце наблюдали разделение гемоцитов на две мажорные фракции. Легкая фракция (10–20 %) была представлена диплоидными клетками, тяжелая (30–40 %) – триплоидными (Рис. 3, А).

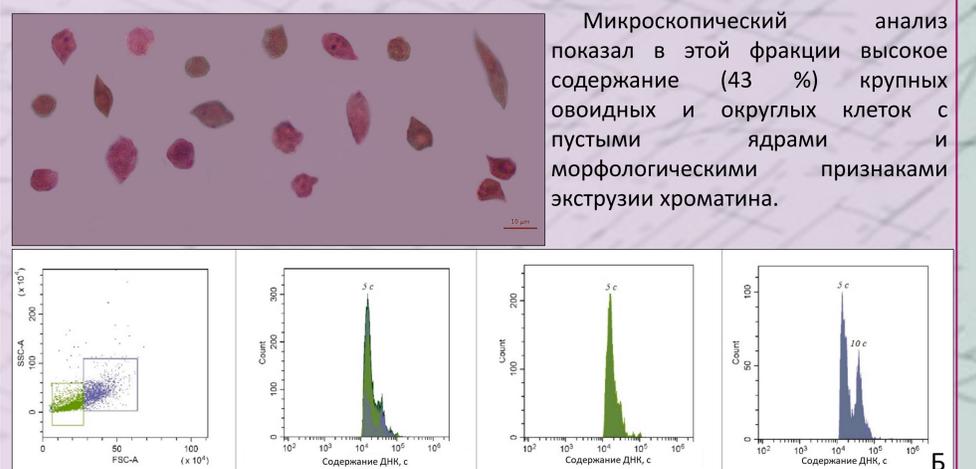
Во втором образце: на уровне 10–20 % оседали диплоидные гемоциты, а фракция 20–30 % состояла из клеток с вариабельным содержанием ДНК менее 2 с, что соответствует апоптозу (Рис. 3, Б).

При этом в первом образце численное преимущество имели клетки атипичной морфологии, а во втором больше половины гемоцитов имели нормальный фенотип. Следовательно, накопление триплоидных гемоцитов в первом образце может быть связано с отсутствием апоптотического контроля процесса злокачественной трансформации клеток.

Рисунок 3 – Характеристика гемоцитов приморского гребешка из аквафермы “Гребеньфарм” методами фракционирования клеток в градиенте плотности перколла с последующей проточной цитометрией и световой микроскопией.

Пример 3

В третьем образце клетки разделялись на четыре фракции в зависимости от соотношения целого ряда параметров: размера и компактности самих клеток, структурных характеристик ядерного аппарата, ядерно-цитоплазматического отношения и собственно уровня плоидности.

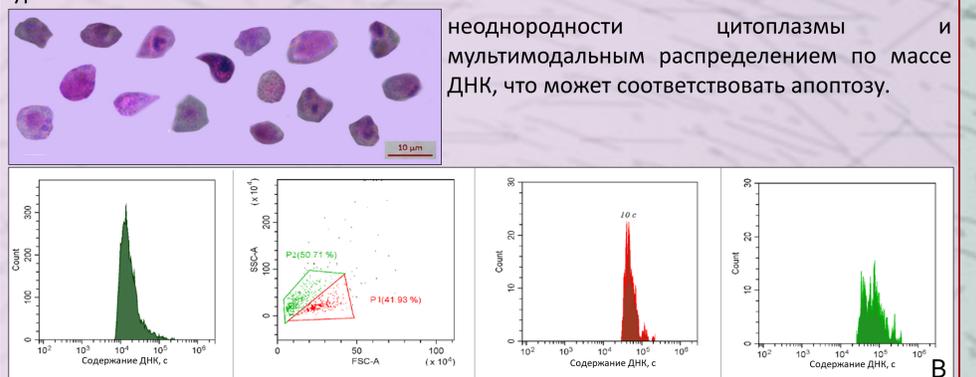


Микроскопический анализ показал в этой фракции высокое содержание (43 %) крупных овоидных и округлых клеток с пустыми ядрами и морфологическими признаками экструзии хроматина.

Клетки популяции 1 попадали в мажорный пентаплоидный пик, клетки популяции 2 делились на два класса, 5 и 10 с.

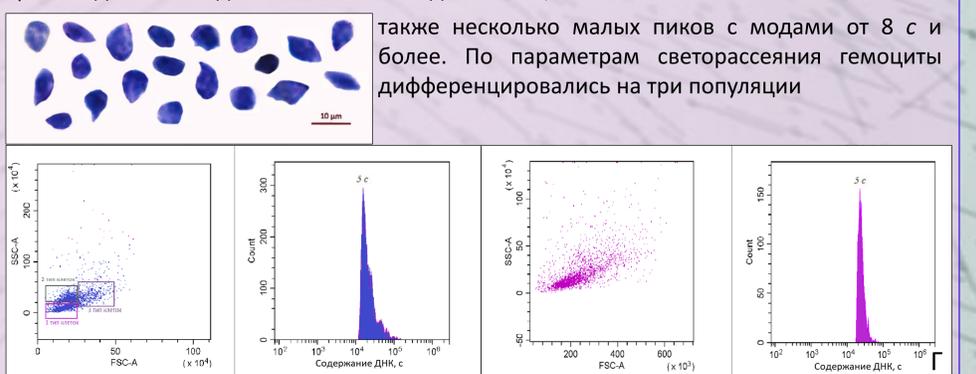
Самая легкая фракция, показала бимодальное распределение по содержанию ДНК, а по параметрам светорассеяния дифференцировались на две популяции: 1) относительно небольшие клетки с низким уровнем структурной сложности; 2) крупные клетки с высоким уровнем структурной сложности.

Клетки фракции 10–20 % имели оформленное ядро, а по массе ДНК укладывались в один триплоидный пик с протяженным правым плечом, клетки которого распались на две популяции: 1) крупные клетки с массой ДНК 10 с, 2) небольшие клетки с высоким уровнем



неоднородности цитоплазмы и мультимодальным распределением по массе ДНК, что может соответствовать апоптозу.

Клетки фракции 20–30 % имели крупные ядра и формировали асимметричный триплоидный пик с дополнительным подпиком 5 с, а



также несколько малых пиков с модами от 8 с и более. По параметрам светорассеяния гемоциты дифференцировались на три популяции

В зону 40 % практически в чистом виде проходили пентаплоидные клетки с компактным ядром и высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

Таким образом, морфологическая атипичность гемоцитов в сочетании с картинами митоза, проявлениями апоптоза и высоким уровнем генетической вариабельности дает основание констатировать факт поражения гребешков гемической неоплазией.