

Оценка содержания ДНК в гемоцитах двусторчатого моллюска *Ruditapes philippinarum* в свете проблемы поиска биомаркеров состояния морских экосистем

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

Институт Мирового океана, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия,
anisan77@mail.ru



Работа посвящена оценке возможностей метода проточной цитометрии в анализе генетической стабильности гемоцитов *Bivalvia* на примере *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve, 1850) при разных подходах к измерению содержания ДНК, а также диагностической значимости цитогенетических маркеров в отношении биоиндикации загрязнений морской среды или иных неблагоприятных факторов, целесообразности их применения в мониторинге состояния морских экосистем.



Материал и методы

Основным методологическим подходом послужило сравнение цитогенетических показателей – коэффициента вариации (КВ) размера генома, ДНК-индекса и ДНК-профиля гемоцитов *R. philippinarum* из фоновой б. Киевка и четырех станций б. Новик (о-в Русский, зал. Петра Великого) (Рис. 1), параллельно протестированных на предмет уровня биоаккумуляции тяжелых металлов (Fe, Mn, Cu, Zn, Cd, Ni) в тканях моллюсков. В б. Новик исследованы четыре станции – м. Узкий, о-в Елены, пос. Подножье и м. Старицкого (Табл. 1).



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

- Гемолимфу отбирали из мускула-аддуктора в 0.3 М ЭДТА и фиксировали 4 % ПФА. Для предотвращения влияния аутофлуоресценции гемоцитов на результат измерения содержания ДНК мы разработали и использовали методику извлечения чистых ядер из клеток путем их обработки раствором детергента Triton X-100 на фосфатном буфере (0.01 М, pH 7.4).
- Были апробированы концентрации детергента 1, 2.5 и 5 %, время инкубации составило 30 мин при 37 °С. Полученные суспензии (клетки и ядра в одном образце) анализировали методом световой микроскопии (AxioImager A1, Carl Zeiss) с использованием фазового контраста на предмет эффективности извлечения ядер и методом проточной цитометрии (BD Accuri C6) на предмет содержания ДНК после окрашивания образцов йодистым пропидием (PI) в присутствии внутреннего гаплоидного стандарта (сперматозоиды *R. philippinarum*), отдельно учитывая ядерный и клеточный сигналы.
- Уровень биоаккумуляции тяжелых металлов в тканях определяли методом атомной абсорбционной спектроскопии (Shimadzu AA-6800).

Акватория	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

Таблица 1 – Концентрации тяжелых металлов в тканях *R. philippinarum* из б. Новик, мкг/г сух. массы.

Результаты

Оценка эффективности метода извлечения клеточных ядер гемоцитов *R. philippinarum* при разных режимах обработки Triton X-100

- После инкубации гемоцитов в 1 % растворе Triton X-100 на микрофотографиях определялись как целые клетки, так и чистые ядра. С повышением концентрации детергента до 2.5 и особенно до 5 % наблюдали деструкцию хроматина и ядерных мембран (Рис. 2).
- Ядра, выделенные с помощью 1 и 2.5 % раствора Triton X-100, хорошо дифференцировались от клеток методом проточной цитометрии по сниженным показателям переднего (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния (Рис. 3, А), а также по убыванию площади сигнала йодистого пропидия (PI-A) при сохранении его высоты (PI-H) (Рис. 3, Б), что объясняется относительно низким вкладом цитоплазматического сигнала в общий уровень флуоресценции окрашенных PI клеток на одном оптическом срезе по сравнению с полным объемом цитоплазмы. При обработке 5 % раствором детергента дифференцировать ядра от клеток не удалось, а коэффициент вариации размера генома возрастал в связи с разрушением ядра при сохранении целостности плазмалеммы.

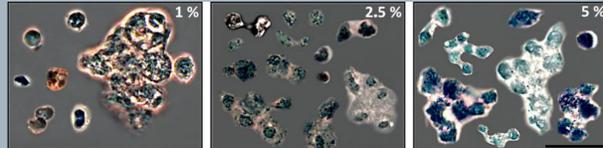


Рисунок 2 – Гемоциты *Ruditapes philippinarum* со станции м. Узкий, обработанные раствором Triton X-100 разной концентрации (1, 2.5 и 5 %). Окраска по Романовскому-Гимзе. Фазовый контраст. Увеличение 100x.

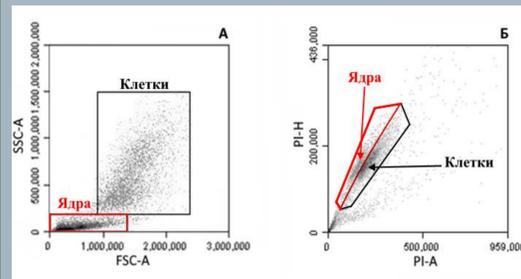


Рисунок 3 – Дифференциация целых клеток и извлеченных ядер методом проточной цитометрии в суспензиях гемоцитов *Ruditapes philippinarum*, обработанных раствором Triton X-100. А – распределение клеток и ядер по переднему (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию; Б – распределение клеток и ядер по площади (PI-A) и высоте (PI-H) сигнала йодистого пропидия.

Дифференциальная оценка содержания ДНК в целых клетках и чистых ядрах, а также суммарная оценка флуоресценции PI в смешанных клеточно-ядерных суспензиях без дифференциации событий на клетки и ядра показали, что точность определения КВ размера генома (разброс значений массы ДНК в пределах пика G0/G1 основного класса пloidности), ДНК-индекса (отношения усредненного по всем клеткам содержания ДНК к гаплоидному значению) и ДНК-профиля (паттерна частотного распределения клеток по содержанию ДНК) существенно зависит от того, какой объект выбирается для измерения – целые гемоциты или чистые ядра, а также от соотношения ядер и клеток в смешанных суспензиях.

Оценка коэффициента вариации (КВ) G₁-пика

- Оценка по целым клеткам показала высокие значения (более 10 %) во всех исследованных районах, включая контрольную б. Киевка (Табл. 2), при том, что общепринятой нормой для данного показателя считается значение не более ~ 4.5 %; превышение этого значения свидетельствует о разрывах цепей ДНК и хромосомных aberrациях в результате генотоксического повреждения.
- При измерении целых клеток три выборки из б. Новик (о-в Елены, пос. Подножье и м. Старицкого) показали расширение пика G₁/G₁ по сравнению с контрольной б. Киевка (Табл. 2).
- После пересчета по чистым ядрам эти различия исчезли, но появились различия между станциями м. Узкий (минимальный КВ, 9.12 ± 0.17) и о-в Елены (максимальный КВ, 10.45 ± 0.23 %) (Табл. 2), что отражало разницу в уровне биоаккумуляции металлов. У особой со станции о-в Елены было отмечено достоверно более высокое содержание Cd в тканях, чем у моллюсков из других мест сбора (Табл. 1).
- Несмотря на то, что ни в одной из акваторий уровень биоаккумуляции металлов не превышал предельно допустимых значений, гемоциты рудитапесов повсеместно показали превышение нормы КВ размера генома, что потенциально характеризует их как чувствительный биоиндикатор генотоксических воздействий.

CV 2c	м. Узкий (б. Новик)	о-в Елены (б. Новик)	Подножье (б. Новик)	м. Старицкого (б. Новик)	б. Киевка
Целые клетки	11.15 ± 0.46	11.30 ± 0.25	12.05 ± 0.28	12.21 ± 0.92	10.76 ± 0.95
Клетки + ядра	9.12 ± 0.17	10.10 ± 0.40	10.21 ± 0.27	11.49 ± 0.64	11.11 ± 0.37
Ядра	9.8 ± 0.11	10.45 ± 0.23	10.81 ± 0.50	10.44 ± 0.60	9.85 ± 0.36

*Указаны средние значения в сопровождении стандартных ошибок.

Таблица 2 – Коэффициенты вариации (CV) G₁-пика гемоцитов *R. philippinarum* из пяти исследованных районов, рассчитанные разными способами.

Оценка ДНК-индекса

- При оценке ДНК-индекса по целым клеткам различия обнаружились между моллюсками из акватории м. Узкий и всеми остальными выборками, которые, в свою очередь, не показали различий между собой. Выборка со станции м. Узкий характеризовалась повышенным ДНК-индексом – 2.6 против 2.3 для станции о-в Елены, 2.2 для станций пос. Подножье и м. Старицкого и 2.4 для контрольной б. Киевка (Табл. 3).
- При анализе чистых ядер общая тенденция сохранилась, но исчезли различия между выборками со станций м. Узкий и м. Старицкого (Табл. 3). Таким образом, ДНК-индекс оказался максимально высоким в наиболее чистых акваториях и особенно в районе м. Узкий.

ДНК-индекс	м. Узкий (б. Новик)	о-в Елены (б. Новик)	Подножье (б. Новик)	м. Старицкого (б. Новик)	б. Киевка
Целые клетки	2.58 ± 0.04	2.29 ± 0.05	2.18 ± 0.05	2.24 ± 0.07	2.37 ± 0.06
Клетки + ядра (с коррекцией)	2.74 ± 0.02	2.48 ± 0.08	2.34 ± 0.05	2.40 ± 0.03	2.42 ± 0.06
Клетки + ядра (без коррекции)	3.39 ± 0.04	2.68 ± 0.07	2.79 ± 0.07	2.57 ± 0.09	2.75 ± 0.05
Ядра	2.84 ± 0.03	2.58 ± 0.09	2.58 ± 0.11	2.60 ± 0.09	2.57 ± 0.0

*Указаны средние значения в сопровождении стандартных ошибок.

Таблица 3 – Коэффициенты вариации (CV) G₁-пика гемоцитов *R. philippinarum* из пяти исследованных районов, рассчитанные разными способами.

Анализ ДНК-профиля

- У рудитапесов из м. Узкий повышение ДНК-индекса сопряжено с системной полиплоидизацией значительной части клеток до уровней 3 – 4 – 5 n (c) (Рис. 4, А, Б); для других станций были характерны асимметричные одномодальные (Рис. 4, В, Ж, И) или бимодальные (Рис. 4, Г, Д, Е, З, К) распределения гемоцитов по содержанию ДНК.

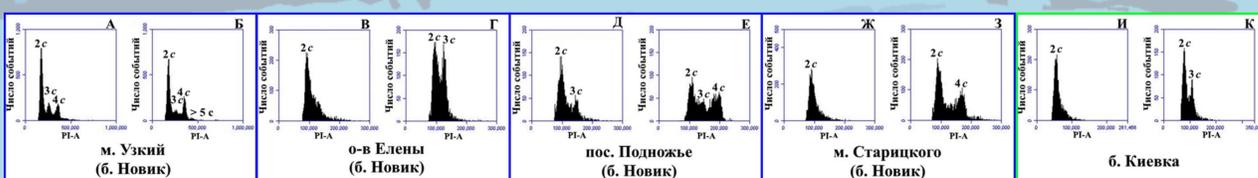


Рисунок 4 – Типичные варианты распределения гемоцитов *R. philippinarum* по содержанию ДНК с четырех станций б. Новик и из фоновой б. Киевка.

- Учитывая низкий уровень биоаккумуляции металлов в тканях рудитапесов со станции м. Узкий (Табл. 1), в данном случае следует заподозрить иные, возможно, биогенные причины умножения числа геномов. Доля клеток с содержанием ДНК 4 c в гемолимфе особей из района м. Узкий была рекордно высока (18.5 ± 0.92 %) на фоне остальных исследованных акваторий, что может указывать как на тетраплоидию, так и на высокую митотическую активность клеток и побуждает рассмотреть сценарий распространения гемической неоплазии в этой популяции *R. philippinarum*.