

УДК 57.043:574.5+576

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS* GOULD, 1850 ПОСЛЕ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

© 2019 г. Н. А. Одинцова*

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: nelodin@mail.ru

Поступила в редакцию 20.02.2019 г.

После доработки 05.04.2019 г.

Принята к публикации 30.05.2019 г.

В данной работе продолжено исследование путей гибели клеток морских беспозвоночных в ответ на холодовой стресс. Анализ изменений, происходящих в клетках мидии *Mytilus trossulus* после холодового стресса, проведенный с помощью разных методов, может стать ключом для идентификации механизмов приспособления морских гидробионтов к изменению условий среды. К сожалению, с помощью тестируемых ингибиторов апоптоза в культурах клеток личинок этого двустворчатого моллюска после криоконсервации не удалось уменьшить апоптоз, а также увеличить жизнеспособность клеток. Возможно, апоптоз в данных культурах был редок или же у моллюсков имеется более мощная, чем у млекопитающих, антиапоптотная система.

Ключевые слова: двустворчатые моллюски, холодовой стресс, культуры клеток

DOI: 10.1134/S0134347519060068

Развитие методов криоконсервации морских организмов позволит снять географические, сезонные и временные ограничения при проведении экспериментальных исследований, расширив идеи классика применения криоконсервации для сохранения генофонда разных видов гидробионтов Б.Н. Вепринцева (Вепринцев, Ротт, 1985). У прибрежных организмов, включая моллюсков, программы клеточной смерти могут быть активированы при резких перепадах температуры (Sokolova, 2009). Вероятно, морские организмы должны обладать механизмами противодействия факторам стресса (Halpin et al., 2002; Lockwood et al., 2015). Известно, что вещества, содержащиеся в гемолимфе этих животных, защищают фосфолипидные везикулы от слияния и разрушения (Loomis et al., 1988). У моллюсков рода *Mytilus* высокотемпературный стресс может индуцировать изменения в экспрессии генов и белков (Lockwood et al., 2010). Уровни убиквитированных белков мидии *Mytilus trossulus* значительно выше при тепловой акклимации, чем при холодовой (Buckley et al., 2001). Подтверждением служит установленная позже толерантность гемоцитов мидий *M. galloprovincialis* и *M. californianus*, по крайней мере в течение короткого времени, именно к холодовому стрессу (Yao, Somero, 2012).

При охлаждении клеток важно избежать образования внутриклеточного льда. Вероятно, поэтому в состав криопротекторных растворов

должны входить вещества, защищающие клетки от разрушения при холодовом стрессе. Компоненты данных растворов обладают способностью существенно изменять форму и размеры микрочастиц льда (Андреев и др., 2017). Как показано ранее, для замораживания клеток личинок мидии *M. trossulus* оптимальными условиями являются использование проникающего через клеточные мембраны криопротектора 5–10% диметилсульфоксида (ДМСО) на морской воде и многоступенчатые режимы с низкими (до 2°C/мин) скоростями замораживания (Odintsova et al., 2017). Установлено, что клетки мидии погибали в результате механического разрушения, вызванного процессом замораживания, а также при апоптозе и/или некрозе, которые развивались в культурах после оттаивания (Odintsova et al., 2017). Индукцию этих процессов в значительной части клеток наблюдали сразу после оттаивания, и она зависела от типа использованного криопротектора.

Молекулярные механизмы, отвечающие за контроль стрессовых условий, у млекопитающих во многом определены (Wu, 2012), но у моллюсков механизмы холодового повреждения до сих пор неизвестны. Если ингибиторы апоптоза могли бы заблокировать апоптоз после замораживания клеток личинок двустворчатых моллюсков, это способствовало бы более высокому выходу жизнеспособных клеток. Однако уменьшить апо-

птоз после замораживания-оттаивания нам пока не удалось.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования использовали личинок мидии *Mytilus trossulus* Gould, 1850 (Bivalvia). Взрослых животных собирали в зал. Восток Японского моря (Морская биологическая станция “Восток” ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН) в мае 2017–2018 гг., помещали в ванны с проточной морской водой и перед началом эксперимента два-три раза промывали фильтрованной морской водой, обработанной ультрафиолетом. Нерест индуцировали термическим шоком; материал получали в результате искусственного оплодотворения. Личинок культивировали в 5-литровых аквариумах в термостате при температуре 16–17°C. На стадии трохофоры (22 ч после оплодотворения при 17°C) личинок собирали на газ для получения первичных культур клеток, как описано ранее (Odintsova et al., 2017).

Контрольные незамороженные клетки личинок мидии и клетки после замораживания-оттаивания культивировали при концентрации $120\text{--}150 \times 10^3$ клеток/на лунку в стерильной морской воде с 2% эмбриональной сывороткой коров (Sigma, США) в присутствии антибиотиков (100 У/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) в 6-луночных плато (TPP, Швейцария) при 17°C в течение 4–48 ч. Для индукции апоптоза клетки инкубировали со стауроспорином (STS, 1–5 мкМ), растворенным в ДМСО (1 мМ) и хранившимся при температуре –20°C. Для индукции окислительного стресса к клеткам добавляли перекись водорода до конечной концентрации 125 мкМ. Чтобы уменьшить уровень апоптоза после цикла замораживания-оттаивания, клетки моллюсков инкубировали с ингибиторами апоптоза, хорошо известными для клеток млекопитающих (указана конечная концентрация, все ингибиторы получены из Sigma): Y-27632 (10–50 мкМ, Y), циклический пифитрин- α (5 мкМ, Альфа) или CHIR99021 (1–5 мкМ, CHIR). В качестве положительного контроля для анализа эффектов ингибиторов апоптоза (для подтверждения их активности и методов оценки) использовали клетки млекопитающих (первичную культуру мышинных эмбриональных фибробластов и опухолевые клетки человека линии HCT 116, Sigma, Германия). Эти клетки инкубировали либо только с ингибиторами апоптоза, либо с ингибиторами апоптоза в присутствии STS. Эффекты ингибиторов апоптоза для клеток млекопитающих описаны ранее (Mehlen et al., 1996; Pirnia et al., 2002; Marión et al., 2009; Peh et al., 2015).

Приготовленная на стерильной морской воде (соленость 34‰) криопротекторная смесь содержала лишь ДМСО (Sigma-Aldrich, США). В опытах использовали трехступенчатый режим с низкими скоростями замораживания (Odintsova et al., 2017).

Жизнеспособность клеток оценивали тремя способами: с помощью теста по исключению красителя трипанового синего с прямым подсчетом клеток в камере Горяева; колориметрическим МТТ-методом (Mosmann, 1983), основанным на измерении метаболической активности митохондриальных ферментов в жизнеспособных клетках; окраской флуоресцентным красителем DAPI с последующим анализом на проточном цитометре CytotFlex (Beckman-Coulter, США).

Чтобы определить возможное изменение клеток и оценить уровень апоптоза в культурах клеток моллюсков до и после замораживания-оттаивания, использовали проточную цитометрию. Цитометрический анализ клеток, окрашенных зелеными флуоресцентными красками H₂DCFDA-, FLICA®- или YO-PRO™-1 (лазер с длиной волны 488 нм) и ультрафиолетовой краской DAPI (лазер с длиной волны 405 нм) проводили в течение 20 мин после окраски. В каждом образце оценивали не менее 20000 событий. Анализ клеточных образцов, проведенный с помощью двух разных комбинаций окраски: FLICA–DAPI и YO-PRO-1–DAPI, отражал количество клеток на стадии раннего и позднего апоптоза, а также количество мертвых клеток в культурах клеток моллюсков. Временное окно для детекции апоптоза за счет связывания с FLICA-реагентом или окраски YO-PRO-1 было намного шире, чем при оценке связывания с обычно применяемым маркером апоптоза аннексином V (Pozarowski et al., 2003; Wlodkowic et al., 2011). Идентификацию типов клеток и контроль их состояния проводили с помощью световой и электронной микроскопии, используя инвертированный микроскоп Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия) и трансмиссионный электронный микроскоп Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss), в Центре коллективного пользования “Дальневосточный центр электронной микроскопии” ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Для электронной микроскопии образцы клеток моллюсков, взятые через 30 мин и 4 ч после оттаивания, центрифугировали при 600 г в течение 5 мин. Полученные осадки вкалывали в кусочки агарозы (0.8%, 3–5 мм³) и после промывки морской водой фиксировали в течение 2 ч при 16°C в растворе промывающего буфера (ПБ), содержащем 2% глутаральдегид (Sigma), 100 мМ HEPES-КОН (pH 7.4), 350 мМ NaCl и 140 мМ маннитол, затем снова несколько раз промывали в ПБ. Осмотичность растворов для фиксации и промывок соответствовала осмотичности морской воды (34‰). Полученные на ультрамикротоме Leica EM UC6 (Leica Microsystems, Германия) ультратонкие срезы красили уранил ацетатом с последующей обработкой цитратом свинца, как описано ранее (Yakovlev, 2016).

Файлы, полученные с помощью программного обеспечения CytExpert v.2.0 (Beckman-Coulter, США), анализировали в программе Kaluza v.2.1.

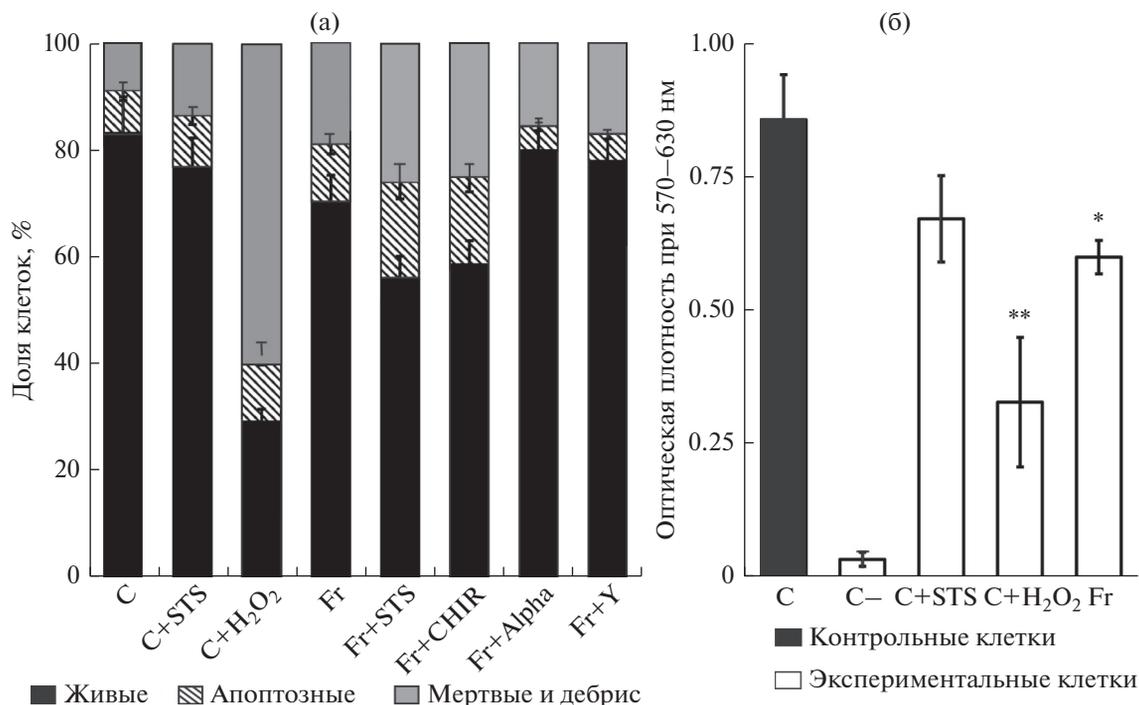


Рис. 1. Жизнеспособность клеток личинок мидии *Mytilus trossulus* до и после замораживания-оттаивания (30 мин), определенная с помощью проточной цитометрии (а) и колориметрического МТТ-метода (б). Ключ обработок: контрольные незамороженные клетки (С); среда без клеток (С-); незамороженные клетки после воздействия индуктора химического апоптоза стауроспорина (С + STS); незамороженные клетки после воздействия окислительного стресса (С + H₂O₂); клетки после замораживания-оттаивания: в присутствии 7% ДМСО (FR), в присутствии STS (1 мкМ) и ингибиторов апоптоза: CHIR (1 мкМ), Альфа (5 мкМ), Y (10 мкМ). Уровень значимости выбран как * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$.

Статистическую обработку результатов выполняли с применением ANOVA и с последующим множественным сравнением с помощью программы Excel 2013 (Microsoft, США). Каждый эксперимент выполнен не менее трех раз. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Замораживание в жидком азоте культур клеток, полученных из соматических тканей моллюсков, позволяет сохранить жизнеспособными более 75–80% клеток (Odintsova, Tsal, 1995; Poncet et al., 2002; Poncet, Lebel, 2003; Hanquet-Dufour et al., 2006; Walker et al., 2009; Stickle et al., 2010). В отличие от соматических клеток, клетки ранних стадий развития гидробионтов намного чувствительнее к низким температурам (Roux et al., 2008; Przeslawski et al., 2015). После замораживания-оттаивания сохраняется не более 15–20% клеток личинок моллюсков, замороженных при тех же условиях, что и их соматические клетки (Odintsova, Tsal, 1995; Naidenko, 1997). Эти проблемы при сохранении личиночного материала моллюсков заставили искать новые подходы.

Для контрольных незамороженных клеток личинок мидии *Mytilus trossulus* характерна высокая жизнеспособность. Согласно нашим данным,

жизнеспособность клеток после замораживания-оттаивания значительно различалась в зависимости от методов воздействия и оценки (рис. 1). Стауроспорин после замораживания достоверно увеличивал количество клеток, находящихся в апоптозе (рис. 1а), тогда как ингибиторы апоптоза не снижали это количество и не увеличивали число жизнеспособных клеток.

Несмотря на все преимущества проточной цитометрии, стандартом для конечной классификации путей гибели клеток считают трансмиссионную электронную микроскопию (Pozarowski et al., 2003). На этом основании мы провели ультраструктурный анализ морфологии клеток мидии после замораживания-оттаивания (рис. 2). На обоих сроках тестирования (30 мин и 4 ч после оттаивания) морфология клеток в культурах мидии была сходной, поэтому мы представляем результаты, полученные в культурах клеток личинок мидии через 30 мин после оттаивания. Как и в предыдущей работе (Odintsova et al., 2017), в препаратах мидии после замораживания-оттаивания присутствовали четыре основные популяции клеток: живые клетки (рис. 2а); мертвые клетки, погибшие в результате процесса замораживания (рис. 2б) или некроза (рис. 2в); редко встречающиеся апоптозные клетки (рис. 2г) (Odintsova et al., 2017).

Мы надеялись, что доля культивируемых клеток мидии, погибающих путем апоптоза после за-

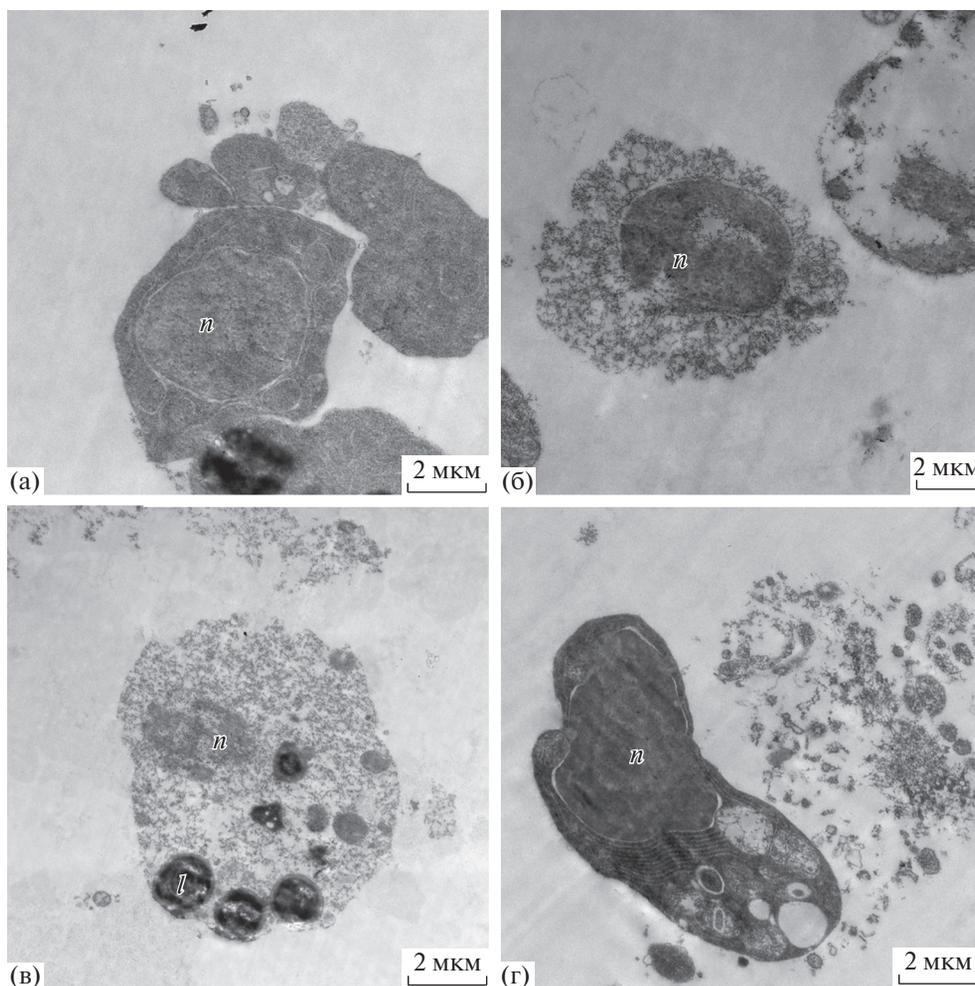


Рис. 2. Ультраструктура клеток личинок мидии *Mytilus trossulus* через 30 мин после замораживания-оттаивания в присутствии ДМСО: а – живая клетка; б – разрушенная мертвая клетка без цитоплазмы; в – клетка, погибшая в результате некроза; г – апоптотная клетка (Odintsova et al., 2017). Образцы анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе Zeiss Libra 120 (Германия). Обозначения: *n* – ядро; *l* – липофусциновые гранулы. Масштабная линейка – 1 мкм.

мораживания-оттаивания, может быть снижена за счет введения ингибиторов апоптоза. Однако таким способом нам не удалось повысить жизнеспособность клеток мидии после цикла замораживания-оттаивания, возможно, потому, что апоптоз в этих культурах был редок, или благодаря наличию у моллюсков более мощной, чем у млекопитающих, антиапоптотной системы (Zhang et al., 2012).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей в качестве объектов. Все эксперименты на животных проведены согласно Положению комиссии по биоэтике ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-50-00034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев А.А., Садикова Д.Г., Ивлиева Н.А., Борода А.В. Формирование частиц льда в криозащитных растворах // Биофизика. 2017. Т. 62. № 2. С. 213–220.
- Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Проблема сохранения генофонда. М.: Знание. 1985. 64 с.
- Buckley B.A., Owen M.-E., Hofmann G.E. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history // J. Exp. Biol. 2001. V. 204. P. 3571–3579.
- Hanquet-Dufour A.C., Kellner K., Heude C. et al. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: Viability and metabolic activity // Cryobiology. 2006. V. 53. P. 28–36.

- Halpin P.M., Sorte C.J., Hofmann G.E., Menge B.A.* Patterns of variation in levels of Hsp70 in natural rocky shore populations from microscales to mesoscales // *Integr. Comp. Biol.* 2002. V. 42. P. 815–824.
- Lockwood B.L., Connor K.M., Gracey A.Y.* The environmentally tuned transcriptomes of *Mytilus* mussels // *J. Exp. Biol.* 2015. V. 218. P. 1822–1833.
- Lockwood B.L., Sanders J.G., Somero G.N.* Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success // *J. Exp. Biol.* 2010. V. 213. P. 3548–3558.
- Loomis S.H., Carpenter J.F., Crowe J.H.* Identification of strombine and taurine as cryoprotectants in the intertidal bivalve *Mytilus edulis* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1988. V. 943. P. 113–118.
- Marión R.M., Strati K., Li H. et al.* A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPSC cell genomic integrity // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1149–1153.
- Mehlen P., Schulze-Osthoff K., Arrigo A.-P.* Small stress proteins as novel regulators of apoptosis: Heat Shock Protein 27 Blocks Fas/Apo-1- and Staurosporine-Induced cell death // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 16510–514.
- Mosman T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cyto-toxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
- Naidenko T.Kh.* Cryopreservation of *Crassostrea gigas* oocytes, embryos and larvae using antioxidant echinochrome A and antifreeze protein AFP1 // *Cryo-Lett.* 1997. V. 18. P. 375–382.
- Odintsova N., Tsal L.* Cryopreservation of primary cell cultures of Bivalvia // *Cryo-Lett.* 1995. V. 16. P. 13–20.
- Odintsova N.A., Boroda A.V., Maiorova M.A., Yakovlev K.V.* The death pathways in mussel larval cells after a freeze-thaw cycle // *Cryobiology.* 2017. V. 77. P. 41–49.
- Peh G.S.L., Adnan K., George B.L. et al.* The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 9167.
- Pirnia F., Schneider E., Betticher D.C., Borner M.M.* Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway // *Cell Death Differ.* 2002. V. 9. P. 905–914.
- Poncet J.-M., Serpentine A., Boucaud-Camou E., Lebel J.-M.* Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Haliothis tuberculata* (Gastropoda) and postthawed primary cell cultures // *Cryobiology.* 2002. V. 44. P. 38–45.
- Poncet J.-M., Lebel J.-M.* Influence of cryoprotective agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the mollusk *Haliothis tuberculata* // *Cryobiology.* 2003. V. 47. P. 184–189.
- Pozarowski P., Huang X., Halicka D. et al.* Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: A caution in data interpretation // *Cytometry.* 2003. V. A55. P. 50–60.
- Przeslawski R., Byrne M., Mellin C.* A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae // *Global Change Biol.* 2015. V. 21. P. 2122–2140.
- Roux A., Sandenbergh L., Roodt-Wilding R.* Preliminary investigation to determine the cytotoxicity of various cryoprotectants on southern African abalone (*Haliothis midae*) embryos // *Cryobiology.* 2008. V. 57. P. 308–311.
- Sokolova I.* Apoptosis in molluscan immune defense // *Invert. Survival J.* 2009. V. 6. P. 49–58.
- Stickle W.B., Lindeberg M., Rice S.D.* Seasonal freezing adaptations of the mid-intertidal gastropod *Nucella lima* from southeast Alaska // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2010. V. 395. P. 106–111.
- Walker C., Böttger S.A., Mulhern J. et al.* Mass culture and characterization of tumor cells from a naturally occurring invertebrate cancer model: Applications for human and animal disease and environmental health // *Biol. Bull.* 2009. V. 216. P. 23–39.
- Wlodkowic D., Telford W., Skommer J., Darzynkiewicz Z.* Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death // *Meth. Cell Biol.* 2011. V. 103. P. 55–98.
- Wu J.* Molecular responses to environmental stresses // *J. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 4. P. 60–65.
- Yakovlev K.V.* Localization of germ plasm-related structures during sea urchin oogenesis // *Dev. Dynam.* 2016. V. 245. P. 56–66.
- Yao C.-L., Somero G.N.* The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M. californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signalling pathways // *J. Exp. Biol.* 2012. V. 215. P. 4267–4277.
- Zhang G., Fang X., Guo X. et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation // *Nature.* 2012. V. 490. P. 49–54.

Cultivated Cells of the *Mytilus trossulus* Gould, 1850: Effect of Cold Stress

N. A. Odintsova

National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Vladivostok 690041, Russia

This study continues our previous work on the death pathways of marine invertebrate cells in response to cold stress. An analysis of changes in molluscan cells after cold stress, carried out with the use of various methods, can be the key to revealing the mechanisms of adaptation of marine hydrobionts to changes in environmental conditions. Unfortunately, using tested apoptosis inhibitors, we could not get either a decrease in apoptosis or an increase in cell viability in primary cell cultures of bivalve larvae after the freeze-thaw cycle. Probably, apoptosis is rare in these cell cultures or mollusks possess a more powerful anti-apoptotic system than that of mammals.

Keywords: bivalves, cold stress, cell cultures